

Universitatea de Științe Vieții "Regele Mihai I" din Timișoara

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara



BOLDURA OANA-MARIA

TEZĂ DE DOCTORAT

**EVOLUȚIA EXPRESIEI GENICE ÎN CAZUL
UTILIZĂRII UNOR ANTIOXIDANȚI LA
MATURAREA *IN VITRO* A OVOCITELOR DE
SCROAFĂ**

Conducător științific:

Conf.Dr.Habil. MIRCU CĂLIN

Timișoara

2024

University of Life Sciences "King Mihai I" from Timisoara

Faculty of Veterinary Medicine Timișoara



BOLDURA OANA-MARIA

DOCTORAL THESIS

**EVOLUTION OF GENE EXPRESSION IN THE
CASE OF THE USE OF ANTIOXIDANTS IN THE
IN VITRO MATURATION OF SOW OOCYTES**

Scientific advisor:

Assoc.Prof.Habil. MIRCU CĂLIN, DVM, PhD.

**Timișoara
2024**

Abstract of the doctoral thesis

EVOLUTION OF GENE EXPRESSION IN THE CASE OF THE USE OF ANTIOXIDANTS IN THE IN VITRO MATURATION OF SOW OOCYTES

This thesis contains:

Abstracts in Romanian and English

Bibliographic research part: 33

The part of own research: 105

Tables: 10

Figures and photos: 32

Bibliographic sources: 151

Annexes

Motivation for choosing the doctoral theme

The topic of the doctoral thesis was chosen considering the major importance that assisted reproductive technologies have in reproductive biology, as well as the need to improve the efficiency of these technologies in order to optimize the production of high-quality oocytes. As in vitro maturation of oocytes is an essential process in assisted reproduction, the study of the use of natural antioxidants in this context offers new insights to understand how they can influence oocyte development and their fertilization potential.

Antioxidants such as vitamin C, quercetin, curcumin, and rosmarinic acid are recognized for their ability to combat oxidative stress, a major factor that affects the quality of oocytes. In addition, they have demonstrated beneficial properties in protecting cells against oxidative damage, making them ideal candidates for improving the in vitro maturation environment of porcine oocytes.

Previous studies have shown that pig oocytes represent a valuable model for reproductive biology research, due to their similarities to human oocytes in terms of the molecular mechanisms involved in maturation and fertilization. This is particularly important in the context in which pigs are widely used in biomedical research, including studies on organ transplantation and gene therapy. Thus, investigating the impact of natural antioxidants on porcine oocyte maturation not only makes a significant contribution to animal reproduction, but also offers the possibility to extrapolate these results to the field of human reproductive biotechnologies.

The choice of this theme is also justified by the high potential of this research to generate new therapeutic approaches to prevent the decline in oocyte quality associated with aging, a problem that affects both animal and human fertility.

The main goal of the thesis

To investigate the effects of the addition of antioxidants (vitamin C, rosmarinic acid, curcumin and quercetin) in the in vitro maturation media of sow oocytes on the expressions of genes involved in cellular senescence as well as on genes essential for the functioning of zona pellucida proteins, involved in the fecundation process. The research will focus on the analysis of gene expression associated with responses to oxidative stress, inflammation, cellular senescence and apoptosis, aiming to identify transcriptomic changes induced by the presence of these antioxidants in maturation environments. In parallel, the effect of these

changes will be evaluated through the analysis of the expression of genes that regulate the functioning of the *zona pellucida*, an essential component in fertilization.

The importance and timeliness of the theme

The theme chosen for this doctoral thesis is highly topical in the context of modern research in reproductive biology and biotechnologies. In an era where assisted reproductive technologies play a crucial role in both human and veterinary medicine, optimizing the in vitro oocyte maturation process is essential to improve oocyte quality and fertilization success rate. The use of natural antioxidants, such as vitamin C, quercetin, curcumin and rosemary acid, brings added scientific value, given their antioxidant and anti-inflammatory properties, known to protect cells against oxidative stress, one of the main factors that compromise the quality of oocytes.

The topicality of this subject is emphasized by the importance of research on the mechanisms that regulate oocyte maturation, given that pigs have become a relevant biomedical model for the study of reproductive processes. The use of porcine oocytes in research is particularly valuable not only for veterinary medicine, but also for human biotechnologies, where the applicability of in vitro maturation techniques to other species, including humans, is being studied. Porcine oocytes, due to their similarity to human ones, provide an excellent model for studies aimed at optimizing assisted reproductive technologies and improving the quality of oocytes used in in vitro fertilization.

In addition, modern molecular biology technologies, such as the analysis of the expression of genes involved in oxidative stress and oocyte senescence, allow a deeper understanding of the effects of natural antioxidants on oocyte maturation processes. The study proposed in this thesis has the potential to provide new and relevant data on how quercetin, curcumin and rosmarinic acid can be used effectively to improve the quality of oocytes and, implicitly, the chances of success in assisted reproductive biotechnologies.

The topic is particularly relevant for the field of reproductive biology, both in a veterinary and human context, contributing to the development of new therapeutic and technological strategies in supporting fertility and optimizing oocyte maturation processes.

Location of the experiments:

- The Laboratory of Molecular Biology /CLC Horia Cernescu / FMV Timișoara.
- Assisted Reproduction Laboratory/ CLC Horia Cernescu / FMV Timișoara

Applied Methodology (Chapter 4)

Biological material:

- Sow oocytes were the main biological material used in the study. The ovaries were collected from slaughtered sows, freshly taken and transported to the laboratory within about 30 minutes.
- The ovaries were stored in a saline solution of 0.9% NaCl at a temperature of about 32°C.

Oocytes collection:

- The oocytes were retrieved by aspiration of the ovarian follicles with a 5 ml syringe and an 18 G needle.
- The obtained material was sedimented in PBS solution to be subsequently evaluated and classified.

Classification of oocytes:

- The oocytes were classified into three quality classes according to the morphology and condition of the cumulus cells and cytoplasm.
- The expansion of cumulus cells around the oocyte and the homogeneity of the cytoplasm were followed.

In vitro maturation:

- The oocytes were cultured in vitro in media supplemented with various antioxidants (ascorbic acid, quercetin, curcumin, rosmarinic acid), and their effects were studied in detail.
- Media supplementation aimed to optimize the maturation process and evaluate the influence of antioxidants on oocyte quality.

Molecular techniques:

- For the analysis of gene expression associated with oxidative stress and inflammation, PCR (Polymerase Chain Reaction) techniques were used, using pairs of primers specific to the genes studied.
- The primer pairs were constructed using *in silico* analysis methods using existing information in the international databases GeneCard, SWIS Prot, NCBI Database and EMBL database.
- Gene expression was quantified by the RT-qPCR method, using SYBR Green as a fluorescent indicator of double-stranded amplicons.

Statistical analysis:**ANOVA (Analysis of Variance):**

- The results were analyzed using the ANOVA function in Microsoft Excel. This statistical method was used to assess significant differences between the environments of several experimental groups.
- ANOVA is suitable for parametric data analysis and has been applied where assumptions of normality have been met.

NormFinder:

1. The **NormFinder** program (MOMA, Aarhus, Denmark) was used for the analysis and establishment of reference genes for qPCR assays. This program allows the identification of the most stable reference genes, necessary for data normalization in gene expression experiments.

Kruskal-Wallis H Test:

1. For data that did not meet the assumptions of normality required for parametric tests, **the Kruskal-Wallis H test** was used. This is a non-parametric rank-based test that allows comparison of the distribution of data between independent groups.
2. The test was performed using **the SPSS Statistics software** and was applied to assess whether there were statistically significant differences between the medians of the experimental groups.
3. **Post-hoc pair comparisons** were made when the Kruskal-Wallis H test indicated significant differences. The significance level was set at a p-value < 0.05.

The thesis is divided into two major parts:

- Current state of knowledge
- Own research.

1. General part

Current state of knowledge

1. Theoretical aspects of in vitro fertilization in pigs

This section presents an overview of the history and development of in vitro fertilization (IVF) techniques in pigs, a topic of crucial importance in reproductive biology. The first attempts at in vitro fertilization in pigs were carried out in the 70s and 80s, with limited success, but with significant developments over time, culminating in the obtaining of viable embryos. Recent advances in the use of frozen and thawed sperm for fertilization are also presented.

2. Oxidative stress and its effects on oocytes

This section examines the mechanisms of cellular damage caused by oxidative stress, highlighting how it affects the quality of oocytes and the success of their maturation. Oxidative stress is one of the major factors that negatively influence the viability and maturity of oocytes, and this topic is particularly relevant in the context of the use of natural antioxidants to alleviate these effects. In the thesis, oxidative stress is analyzed in the context of sow oocyte maturation, a significant animal model for human and animal reproductive biology.

3. Use of Natural Antioxidants in Reproductive Biology and Parthenogenesis in Assisted Reproduction Studies

This section explores the use of antioxidants such as quercetin, curcumin, and rosmarinic acid, substances known for their antioxidant properties and ability to protect cells against oxidative stress. Studies are presented demonstrating how these natural compounds can improve the quality of oocytes and increase the success rate of in vitro fertilization. The use of antioxidants in culture media for porcine oocytes is an innovative approach in reproductive biotechnological research. The phenomenon of parthenogenesis – the development of an embryo from an unfertilized oocyte – and its relevance in assisted reproduction studies is also covered in this section.

2. Own research

In the second part of the doctoral thesis, the biological material and the experimental methodology approached in this thesis are presented; presentation and discussion of the results obtained for the *in vitro* culture of sow oocytes matured on media added with different substances with antioxidant role; presentation and discussion of the results regarding the construction of specific oligonucleotide sequences for RT-qPCR reactions and the study of the choice of the more suitable reference genes for experimental conditions. In the last two chapters, the results regarding the expression of genes involved in cellular senescence processes and those involved in the activation of *the zona pellucida* in the conditions of oocyte maturation on culture media supplemented with antioxidants are presented.

5. Morphological evaluation of matured sow oocytes in vitro

This chapter aims to explore and optimize the methods of in vitro maturation of sow oocytes, through the detailed evaluation of morphological parameters, and the influence of antioxidant supplementation. The main objective is to identify those morphological characteristics and

culture conditions that favour the development of high-quality oocytes, with a high degree of viability, thus contributing to the substantiation of efficient assisted reproduction techniques and biotechnologies applicable in reproductive research.

Objectives:

- Morphological evaluation of the oocytes harvested and matured in vitro, classifying them according to quality and maturity criteria.
- Investigation of the impact of antioxidants in the culture medium on oocyte quality, comparing different types of antioxidants.
- Correlation of oocyte morphology with in vitro maturation success, identifying morphological factors influencing viability for fecundation.
- Study of spontaneous parthenogenesis in oocytes matured in antioxidant-added media, exploring the conditions that favour this rare phenomenon in mammals.

Results:

This chapter focuses on the morphological evaluation of matured sow oocytes in vitro, describing detailed experiments aimed at optimizing culture techniques and evaluating factors influencing oocyte quality. The oocytes were harvested by the follicular aspiration technique, being morphologically evaluated and classified into three quality classes based on the characteristics of the cumulus-oocyte complex and the appearance of the cytoplasm. The classification allowed the calculation of the recovery rate, where classes I and II were associated with higher maturation rates and viability.

Next, the impact of antioxidants in the culture medium was investigated, the experiment being structured in such a way as to compare several media variants added with different antioxidants, including ascorbic acid and rosmarinic acid. The results showed that supplementing the culture medium with antioxidants contributed to a significant increase in the rate of oocyte maturation. Class I oocytes, characterized by a compact cumulus cell structure and homogeneous cytoplasm, showed very high maturation rates, reaching optimal maturity for fertilization in ascorbic acid environments.

The correlations between oocyte morphology and in vitro maturation were thus highlighted by the fact that oocytes of the higher quality classes, characterized by organized compact cumulus cells and homogeneous cytoplasm, more frequently reached the metaphase II stage, thus confirming the importance of morphology in determining reproductive potential. This section of the chapter emphasizes the decisive influence of in vitro maturation conditions and their duration on the success of the protocol and prevents cellular ageing, offering new perspectives for optimizing culture conditions and increasing the quality of matured oocytes.

6. Building Specific Primers for RT-qPCR and Choosing Reference Genes

This chapter aimed to establish the optimal methodology for the construction and validation of the specific primers, necessary for RT-qPCR experiments, and to identify the appropriate reference genes for the normalization of gene expression data in sow oocytes. This step is essential to ensure the specificity, efficiency and reproducibility of experimental data, contributing to the creation of a solid methodological basis for the precise analysis of gene expression in research on in vitro maturation and cellular response to antioxidants.

Objective:

- This chapter details the methodological approaches for the design and validation of specific primers for RT-qPCR experiments, with a focus on ensuring the specificity and efficiency of amplification reactions.

- We also aimed to identify and select stable reference genes for the normalization of gene expression data in sow oocytes, to eliminate technical variability and ensure the reproducibility of experimental results.

Results:

In the first part of the chapter, the detailed process of construction and validation of primer pairs for RT-qPCR is described, starting from known protein sequences and using advanced bioinformatics tools to identify the necessary complementary messenger RNA and DNA sequences. The primer pairs were selected according to strict criteria, ensuring specificity to the target sequence and avoiding the formation of non-specific dimers, which are essential for obtaining correct amplicons. In vitro validation was performed by endpoint PCR and migration of the products into agarose gel, the results confirming the obtaining of clear amplification products, without the formation of primer dimers, which attested their quality for subsequent experiments. Increased attention has been paid to the experimental adjustment of specific attachment temperatures, which are essential for optimizing reactions, as the predetermined temperatures of the primers do not always ensure the desired results.

Next, the study focused on the selection of reference genes needed to normalize gene expression data. Five candidate genes (PPIA, RPL4, GAPDH, YWHAZ and TBP) were identified and their stability was analysed in batches of sow oocytes matured in vitro in antioxidant and non-antioxidant environments. The *NormFinder* program was used to assess the stability of these genes, calculating intra- and intergroup variability to determine which of the candidate genes exhibited the lowest fluctuation in expression under the different experimental conditions. The data indicated that PPIA is the most stable reference gene, while GAPDH showed significant variation, thus being unsuitable for normalization. These findings emphasize the importance of validating each reference gene under the specific conditions of the experiment, avoiding misinterpretation and providing accurate data on gene expression.

The study demonstrated that rigorous design and careful validation of primers are essential to ensure the specificity and efficiency of PCR reactions, and the careful choice of appropriate reference genes, such as PPIA, contributes significantly to the accuracy of gene expression data. This approach provides a solid blueprint for the implementation of RT-qPCR gene expression techniques in future research.

7. Evaluation of the Expression of Genes Indicative of Senescence Processes

The aim of this chapter was to evaluate the expression of genes involved in senescence and apoptosis processes in matured sow oocytes in vitro, with a special focus on the influence of antioxidants on these processes. The chapter aims to analyse how genes associated with oxidative stress, inflammation and apoptosis regulation contribute to the maintenance or decline of oocyte quality, thus providing valuable clues for optimizing in vitro maturation conditions and for developing more efficient approaches in assisted reproduction and reproductive biotechnologies.

Objectives:

- Evaluation of the expression of genes involved in senescence, apoptosis and oxidative stress response in oocytes matured in vitro, in antioxidant environments.
- Investigation of the effects of antioxidants on the expression of key cell protection genes, including SOD, SIRT1, NRF2 and others.

- Comparison of gene expression between antioxidant-treated oocytes and control batches to determine their effectiveness in reducing oxidative stress and maintaining oocyte quality.

Results:

This chapter explores the impact of antioxidant treatment on the expression of genes involved in senescence and apoptosis of matured sow oocytes *in vitro*. The genes studied, including SOD, SIRT1, NRF2, MAPK38, NF- κ B50 and Casp1, highlighted the role of oxidative stress and inflammation on the viability of oocytes. Supplementing maturation media with antioxidants such as vitamin C, rosemary, quercetin, and curcumin had varied but significant effects on the expression of these genes. For example, vitamin C and quercetin have demonstrated a superior ability to reduce the overexpression of the SOD1 and MAPK38 genes, associated with oxidative stress, compared to rosmarinic acid and curcumin. At the same time, the reduced expression of Casp1 suggests that antioxidants contribute to decreasing inflammation and apoptosis. Antioxidant genes, such as NRF2, were activated, suggesting increased protection against the accumulation of reactive oxygen species, thus improving the quality of the oocytes and ensuring their better viability.

The results suggest that adding antioxidants to the oocyte culture medium can improve their quality and viability, reducing the effects of oxidative stress and inflammatory processes that contribute to senescence. Supplementation with vitamin C and quercetin has been shown to be the most effective in regulating the expression of stress and apoptosis genes, suggesting their applicability in assisted reproduction techniques.

8: Evaluation of the Expression of Genes Indicative of Fertilization Capacity

This chapter aims to evaluate the influence of antioxidants on the fertilization capacity of matured sow oocytes *in vitro*, by analysing the expression of essential genes involved in the oocyte-sperm interaction and in the functioning of the zona pellucida.

Objectives:

- Determination of the effect of antioxidants on the fertilization capacity of oocytes of different quality classes, by analysing the expression of genes involved in the functioning of the zona pellucida.
- Comparison of gene expression between oocytes matured in antioxidant media and those matured in control media to observe the potential effects of antioxidants.

Results:

This chapter explores the impact of antioxidants on the expression of genes involved in oocyte-sperm interaction processes, especially at the level of the zona pellucida and proteins essential in the fertilization capacity of oocytes. The expression of CD9, ITGA6, MFGE8, ZP2 and ZP3 genes were analysed in batches of oocytes matured *in vitro* in the presence of antioxidants such as vitamin C, quercetin and curcumin. Supplementation of maturation media with vitamin C and quercetin showed a positive effect on the expression of genes related to adhesion and stability, especially ITGA6 and MFGE8, suggesting an increase in binding capacity and a reduction in the risk of polyspermy. In contrast, curcumin showed more modest effects on the expression of genes ZP2 and ZP3, with a tendency of overexpression in batches

of lower-quality oocytes, suggesting a less pronounced influence on the protection of fertilization mechanisms.

Antioxidants added to the maturation medium have a direct impact on the fertilization capacity of oocytes, improving the expression of genes involved in adhesion and protection against polyspermy. Supplementation with vitamin C and quercetin has been shown to be effective in maintaining the integrity of oocytes, confirming the role of antioxidants in supporting quality and viability for fertilization.

The most important aspects of novelty and originality that emerged from our research were:

- ***Optimization of the in vitro maturation of sow oocytes by using media supplemented with specific antioxidants, such as ascorbic acid and rosmarinic acid, to reduce oxidative stress, which has demonstrated a significant increase in the maturation rate and viability of oocytes.***
- ***Identification and validation of reference genes for stable gene expression in sow oocytes, with a special focus on the PPIA gene, which showed increased stability under various experimental conditions, contributing to the improvement of accuracy in gene expression analysis.***
- ***Observation of the phenomenon of spontaneous parthenogenesis in batches of oocytes treated with specific antioxidants such as quercetin and curcumin***
- ***Designing and validation of primers specific to the RT-qPCR technique, an advanced method applied in this context for monitoring the expression of genes involved in oocyte senescence, apoptosis and fertilization capacity.***
- ***Analysis of gene expression associated with senescence and apoptosis processes in oocytes, providing a detailed understanding of how oxidative stressors and antioxidants influence oocyte quality, thus facilitating in vitro culture optimization.***
- ***Evaluation of the influence of antioxidants on the fertilization capacity of oocytes, where the specific use of antioxidants has been shown to be beneficial for preserving the viability of oocytes and their fertility quality.***

Rezumatul tezei de doctorat

EVOLUȚIA EXPRESIEI GENICE ÎN CAZUL UTILIZĂRII UNOR ANTIOXIDANȚI LA MATURAREA IN VITRO A OVOCITELOR DE SCROAFĂ

Prezenta teză conține:

Lista de abrevieri

Rezumatele în limba română și engleză

Partea de cercetări bibliografice: 33

Partea de cercetări proprii: 105

Tabele: 10

Figuri și foto: 32

Surse bibliografice: 151

Anexe

Motivația alegerii temei de doctorat

Tema tezei de doctorat a fost aleasă având în vedere importanța majoră pe care tehnologiile de reproducție asistată le au în biologia reproductivă, precum și necesitatea de a îmbunătăți eficiența acestor tehnologii pentru a optimiza obținerea unor ovocite de calitate superioară. Întrucât maturarea in vitro a ovocitelor este un proces esențial în reproducția asistată, studiul utilizării antioxidanților naturali în acest context oferă noi perspective pentru a înțelege modul în care aceștia pot influența dezvoltarea ovocitelor și potențialul lor de fecundare.

Antioxidanții precum vitamina C, quercetina, curcumina și acidul rozmarinic sunt recunoscuți pentru capacitatea lor de a combate stresul oxidativ, un factor major care afectează calitatea ovocitelor. În plus, aceștia au demonstrat proprietăți benefice în protejarea celulelor împotriva daunelor oxidative, ceea ce îi face candidați ideali pentru îmbunătățirea mediului de maturare in vitro al ovocitelor de scroafă.

Studiile anterioare au arătat că ovocitele de suine reprezintă un model valoros pentru cercetarea biologiei reproductive, datorită similitudinilor lor cu ovocitele umane în ceea ce privește mecanismele moleculare implicate în maturare și fecundare. Acest aspect este deosebit de important în contextul în care porcii sunt utilizați pe scară largă în cercetările biomedicale, inclusiv în studiile privind transplantul de organe și terapia genetică. Astfel, investigarea impactului antioxidanților naturali asupra maturării ovocitelor de scroafă nu doar că aduce o contribuție semnificativă la reproducția animală, dar oferă și posibilitatea de a extrapola aceste rezultate în domeniul biotehnologiilor reproductive umane.

Alegerea acestei teme este, de asemenea, justificată de potențialul ridicat al acestei cercetări de a genera noi abordări terapeutice pentru prevenirea declinului calității ovocitelor asociat cu înaintarea în vârstă, o problemă care afectează atât fertilitatea animalelor, cât și cea umană.

Scopul tezei

În cadrul acestei teze s-a avut în vedere investigarea efectelor adăugării unor antioxidanți (vitamina C, acid rozmarinic, curcumină și quercetină) în mediile de maturare in vitro a ovocitelor de scroafă asupra expresiilor genelor implicate în senescența celulară precum și asupra genelor esențiale pentru funcționarea proteinelor zona pellucida, implicate în procesul fecundației. Cercetările se vor concentra asupra analizei expresiei genelor asociate cu răspunsurile la stresul oxidativ, inflamație, senescență celulară și apoptoză, urmărind să identifice modificările transcriptomice induse de prezența în mediile de maturare a acestor antioxidanți. În paralel, s-a evaluat efectul acestor modificări prin intermediul analizei expresiei genelor care reglează funcționarea zonei pellucida, o componentă esențială în fecundație.

Importanța și actualitatea temei

Tema aleasă pentru această teză de doctorat este de mare actualitate în contextul cercetărilor moderne din biologia reproducției și biotehnologii. Într-o eră în care tehnologiile de reproducție asistată joacă un rol esențial atât în medicina umană, cât și în cea veterinară, optimizarea procesului de maturare in vitro a ovocitelor este esențială pentru îmbunătățirea calității ovocitelor și a ratei de succes a fertilizării. Utilizarea antioxidanților naturali, cum sunt vitamina C, quercetina, curcumina și acidul rozmarinic, aduce un plus de valoare științifică, având în vedere proprietățile lor antioxidante și antiinflamatorii, cunoscute pentru protejarea celulelor împotriva stresului oxidativ, unul dintre principalii factori care compromit calitatea ovocitelor.

Actualitatea acestui subiect este accentuată de importanța cercetărilor asupra mecanismelor care reglează maturarea ovocitelor, având în vedere că suinele au devenit un model biomedical relevant pentru studiul proceselor reproductive. Utilizarea ovocitelor de scroafă în cercetări este deosebit de valoroasă nu doar pentru medicina veterinară, dar și pentru biotehnologiile umane, unde se studiază aplicabilitatea tehnicilor de maturare in vitro la alte specii, inclusiv la om. Ovocitele de scroafă, prin asemănarea lor funcțională și structurală cu cele umane, oferă un model excelent pentru studii care vizează optimizarea tehnologiilor de reproducție asistată și îmbunătățirea calității ovocitelor utilizate în fecundarea in vitro.

În plus, tehnologiile moderne de biologie moleculară, cum ar fi analiza expresiei genelor implicate în stresul oxidativ și în senescența ovocitară, permit o înțelegere mai profundă a efectelor antioxidanților naturali asupra proceselor de maturare ovocitară. Studiul propus în această teză are potențialul de a oferi date noi și relevante privind modul în care quercetina, curcumina și acidul rozmarinic pot fi utilizați în mod eficient pentru a îmbunătăți calitatea ovocitelor și, implicit, șansele de succes în biotehnologiile de reproducție asistată.

Tema abordată este deosebit de relevantă pentru domeniul biologiei reproductive, atât în context veterinar, cât și uman, contribuind la dezvoltarea unor noi strategii terapeutice și tehnologice în susținerea fertilității și a optimizării proceselor de maturare ovocitară.

Locația experimentelor:

- Laboratorul de biologie moleculă /CLC Horia Cernescu / FMV Timișoara.
- Laboratorul de reproducție asistată/ CLC Horia Cernescu / FMV Timișoara

Metodologie aplicată (Capitolul 4)**Materialul biologic:**

- Ovocitele de scroafă au fost materialul biologic principal folosit în studiu. Ovarele au fost colectate de la scroafe abatorizate, preluate proaspăt și transportate în laborator într-un interval de aproximativ 30 de minute.
- Ovarele au fost păstrate într-o soluție salină de NaCl 0,9% la o temperatură de aproximativ 32°C.

Recoltarea ovocitelor:

- Ovocitele au fost prelevate prin aspirarea foliculilor ovarieni cu o seringă de 5 ml și un ac de 18 G.
- Materialul obținut a fost sedimentat în soluție PBS pentru a fi ulterior evaluat și clasificat.

Clasificarea ovocitelor:

- Ovocitele au fost clasificate în trei clase de calitate în funcție de morfologia și starea celulelor cumulus și citoplasmei.
- S-a urmărit expansiunea celulelor cumulus în jurul ovocitului și omogenitatea citoplasmei.

Maturarea in vitro:

- Ovocitele au fost cultivate in vitro în medii suplimentate cu diverși antioxidanți (acid ascorbic, quercetină, curcumină, acid rosmarinic), iar efectele acestora au fost studiate în detaliu.
- Suplimentarea mediilor a urmărit optimizarea procesului de maturare și evaluarea influenței antioxidanților asupra calității ovocitelor.

Tehnici moleculare:

- Pentru analiza expresiei genelor asociate cu stresul oxidativ și inflamația, s-au utilizat tehnici de PCR (Polymerase Chain Reaction), folosind perechi de primeri specifici pentru genele studiate.
- Perechile de primeri au fost construiți utilizând metode de analiză *in silico* cu ajutorul informațiilor existente în bazele de date internaționale GeneCard, SWIS Prot, NCBI Database și EMBL database.
- Expresia genelor a fost cuantificată prin metoda RT-qPCR, folosind SYBR Green ca indicator fluorescent a ampliconilor bicatenari.

Analize statistice:**ANOVA (Analysis of Variance):**

- Rezultatele au fost analizate utilizând funcția ANOVA din programul Microsoft Excel. Această metodă statistică a fost utilizată pentru a evalua diferențele semnificative între mediile mai multor grupuri experimentale.
- ANOVA este potrivită pentru analiza datelor parametrice și a fost aplicată acolo unde presupunerile de normalitate au fost îndeplinite.

NormFinder:

- Programul **NormFinder** (MOMA, Aarhus, Danemarca) a fost utilizat pentru analiza și stabilirea genelor de referință pentru testele qPCR. Acest program permite

identificarea celor mai stabile gene de referință, necesare pentru normalizarea datelor în experimentele de expresie genică.

Testul Kruskal-Wallis H:

- În cazul datelor care nu au îndeplinit presupunerile de normalitate necesare pentru testele parametrice, s-a utilizat **testul Kruskal-Wallis H**. Acesta este un test non-parametric, care permite compararea distribuției datelor între grupuri independente.
- Testul a fost efectuat folosind software-ul **SPSS Statistics** și a fost aplicat pentru a evalua dacă există diferențe semnificative statistic între medianele grupurilor experimentale.
- **Comparațiile post-hoc** pereche au fost realizate atunci când testul Kruskal-Wallis H a indicat diferențe semnificative. Nivelul de semnificație a fost stabilit la o valoare $p < 0,05$.

Teza este împărțită în două părți majore:

- Stadiul actual al cunoașterii
- Cercetări proprii.

I. Partea generală

Stadiul actual al cunoașterii

1. Aspecte teoretice ale fecundației in vitro la suine

În această secțiune se face o trecere în revistă a istoriei și dezvoltării tehnicilor de fecundare in vitro (IVF) la suine, un subiect de importanță esențială în biologia reproductivă. Primele încercări de fecundare in vitro la suine au fost realizate în anii '70 și '80, cu succes limitat, dar cu evoluții semnificative de-a lungul timpului, culminând cu obținerea de embrioni viabili. De asemenea, sunt prezentate progresele recente în utilizarea spermatozoizilor congelați și decongelați pentru fecundare.

2. Stresul oxidativ și efectele sale asupra ovocitelor

În acest capitol sunt prezentate mecanismele de deteriorare celulară cauzate de stresul oxidativ, subliniind modul în care acesta afectează calitatea ovocitelor și maturarea acestora. Stresul oxidativ este unul dintre factorii majori care influențează negativ viabilitatea și maturitatea ovocitelor, iar acest subiect este deosebit de relevant în contextul utilizării antioxidanților naturali pentru a ameliora aceste efecte. În cadrul tezei, stresul oxidativ este analizat în contextul maturării ovocitelor de scroafă, un model animal semnificativ pentru biologia reproductivă umană și animală.

3. Utilizarea antioxidanților naturali în biologia reproductivă și partenogeneza în studiile de reproducție asistată

În acest capitol se explorează utilizarea antioxidanților precum quercetina, curcumina și acidul rozmarinic, substanțe cunoscute pentru proprietățile lor antioxidante și capacitatea de a proteja celulele împotriva stresului oxidativ. Sunt prezentate studii care demonstrează modul în care acești compuși naturali pot îmbunătăți calitatea ovocitelor și pot crește rata de succes a fertilizării in vitro. Utilizarea antioxidanților în mediile de cultură pentru ovocitele de scroafă reprezintă o abordare inovatoare în cercetările biotehnologice reproductive. Fenomenul partenogenezei – dezvoltarea unui embrion dintr-o ovocită nefecundată (fenomen întâlnit

arareori în mod spontan la această specie) – și relevanța acestuia în studiile de reproducție asistată este de asemenea, tratat în această secțiune.

II. Cercetările proprii

În partea a II-a a tezei de doctorat sunt prezentate materialul biologic și metodologia experimentală abordată în cadrul acestei teze; prezentarea și discutarea rezultatelor obținute pentru cultura *in vitro* a ovocitelor de scroafă maturate pe medii adiționate cu diferite substanțe cu rol antioxidant; prezentarea și discutarea rezultatelor cu privire la construcția de secvențe de oligonucleotide specifice pentru reacțiile RT-qPCR și studiul de alegerea a celei mai potrivite gene de referință pentru condițiile experimentale. În ultimele două capitole sunt prezentate rezultatele cu privire la expresia genelor implicate în procesele de senescență celulară precum și a celor implicate în activarea *zonei pellucida* în condițiile maturării ovocitelor pe medii de cultură suplimentate cu antioxidanți.

5. Evaluarea morfologică a ovocitelor de scroafă maturate in vitro

Scopul acestui capitol este de a explora și de a optimiza metodele de maturare in vitro a ovocitelor de scroafă, prin evaluarea detaliată a parametrilor morfologici și a influenței suplimentării cu antioxidanți a mediului de maturare. Obiectivul principal este de a identifica acele caracteristici morfologice și condiții de cultură care favorizează dezvoltarea ovocitelor de calitate superioară, cu un grad înalt de viabilitate, contribuind astfel la fundamentarea unor tehnici eficiente de reproducție asistată și biotehnologii aplicabile în cercetarea reproductivă.

Obiective:

- Evaluarea morfologică a ovocitelor recoltate și maturate in vitro, clasificându-le pe criterii de calitate și maturitate.
- Investigarea impactului antioxidanților în mediul de cultură asupra calității ovocitelor, comparând diferite tipuri de antioxidanți.
- Corelarea morfologiei ovocitelor cu succesul maturării in vitro, identificând factorii morfologici care influențează viabilitatea pentru fecundare.

Rezultate:

Acest capitol se concentrează pe evaluarea morfologică a ovocitelor de scroafă maturate in vitro, descriind tehnicile de cultivare precum și optimizarea tehnicilor de cultură și evaluarea factorilor care influențează calitatea ovocitelor. Ovocitele au fost recoltate prin tehnica de aspirație foliculară, evaluându-se morfologic și clasificându-se pe trei clase de calitate pe baza caracteristicilor complexului cumulus-ovocit și a aspectului citoplasmei. Clasificarea a permis aprecierea ratei de recuperare unde clasele I și II au fost asociate cu rate de maturare și viabilitate superioare.

În continuare, s-a investigat impactul antioxidanților în mediul de cultură, experimentul fiind structurat astfel încât să se compare mai multe variante de medii suplimentate cu diferiți antioxidanți, printre care acidul ascorbic și acidul rozmarinic. Rezultatele au arătat că suplimentarea mediului de cultură cu antioxidanți a contribuit la o creștere semnificativă a ratei de maturare a ovocitelor. Ovocitele din clasa I, caracterizate printr-o structură compactă a celulelor cumulus și citoplasmă omogenă, au prezentat rate de

maturare foarte ridicate, atingând maturitatea optimă pentru fecundare în medii cu acid ascorbic.

Corelațiile dintre morfologia ovocitelor și maturarea in vitro au fost astfel evidențiate prin faptul că ovocitele din clasele superioare de calitate, caracterizate prin celulele cumulus compact organizate și citoplasmă omogenă, au atins mai frecvent stadiul de metafază II, confirmând astfel importanța morfologiei în determinarea potențialului reproductiv. Această secțiune a capitolului subliniază influența a condițiilor de maturare in vitro asupra succesului protocolului, oferind noi perspective pentru optimizarea condițiilor de cultură și creșterea calității ovocitelor maturate.

6. Construirea Primerilor Specifici pentru RT-qPCR și Alegerea Genelor de Referință

Scopul acestui capitol a fost de a stabili metodologia optimă pentru construirea și validarea primerilor specifici, necesari experimentelor de tip RT-qPCR, și de a identifica genele de referință adecvate pentru normalizarea datelor de expresie genică în ovocitele de scoafă. Această etapă este esențială pentru asigurarea specificității, eficienței și reproductibilității datelor experimentale, contribuind la crearea unei baze metodologice solide pentru analiza precisă a expresiei genice în cadrul cercetărilor privind maturarea in vitro și răspunsul celular la antioxidanți.

Obiectivele experimentului:

- Acest capitol detaliază abordările metodologice pentru proiectarea și validarea primerilor specifici destinați experimentelor RT-qPCR, cu accent pe asigurarea specificității și eficienței reacțiilor de amplificare.
- De asemenea, s-a urmărit identificarea și selectarea genelor de referință stabile pentru normalizarea datelor de expresie genică în ovocitele de scoafă, astfel încât să fie eliminată variabilitatea tehnică și să fie asigurată reproductibilitatea rezultatelor experimentale.

Rezultate:

În prima parte a capitolului este descris procesul detaliat de construcție și validare a perechilor de primeri pentru RT-qPCR, pornind de la secvențe proteice cunoscute și folosind instrumente bioinformatică avansate pentru a identifica secvențele de ARN mesager și ADN complementare necesare. Perechile de primeri au fost selectate conform criteriilor stricte, asigurând specificitate față de secvența țintă și evitarea formării de dimeri nespecifici, aspecte esențiale pentru obținerea unor ampliconi corecți. Validarea in vitro a fost realizată prin PCR end-point și migrarea produselor în gel de agaroză, rezultatele confirmând obținerea unor produse clare de amplificare, fără formarea dimerilor de primeri, ceea ce a atestat calitatea acestora pentru experimentele ulterioare. A fost acordată o atenție sporită ajustării experimentale a temperaturilor specifice de atașare, esențiale pentru optimizarea reacțiilor, deoarece temperaturile predeterminate ale primerilor nu asigură întotdeauna rezultatele dorite. În continuare, studiul s-a axat pe selecția genelor de referință necesare normalizării datelor de expresie genică. Au fost identificate cinci gene candidate (PPIA, RPL4, GAPDH, YWHAZ și TBP), iar stabilitatea acestora a fost analizată în loturi de ovocite de scoafă maturate in vitro în medii cu și fără antioxidanți. Programul *NormFinder* a fost utilizat pentru evaluarea stabilității acestor gene, calculând variabilitatea intra- și intergrup pentru a determina care

dintre genele candidate prezintă cea mai redusă fluctuație a expresiei în diferitele condiții experimentale. Datele au indicat că PPIA este cea mai stabilă genă de referință, în timp ce GAPDH a arătat variații semnificative, fiind astfel neadecvată pentru normalizare. Aceste constatări subliniază importanța validării fiecărei gene de referință în condițiile specifice ale experimentului, evitând erorile de interpretare și oferind date exacte privind expresia genică.

Studiul realizat a demonstrat că o proiectare riguroasă și o validare atentă a primerilor sunt esențiale pentru asigurarea specificității și eficienței reacțiilor PCR, iar alegerea atentă a genelor de referință adecvate, precum PPIA, contribuie semnificativ la acuratețea datelor de expresie genică. Această abordare oferă un model solid pentru implementarea tehnicilor de expresie genică prin RT-qPCR în cercetările viitoare.

7. Evaluarea Expresiei Genelor Indicative ale Proceselor de Senescență

Scopul acestui capitol a fost de a evalua expresia genelor implicate în procesele de senescență și apoptoză în ovocitele de scoafă maturate *in vitro*, cu un accent special pe influența antioxidanților asupra acestor procese. Capitolul își propune să analizeze modul în care genele asociate cu stresul oxidativ, inflamația și reglarea apoptozei contribuie la menținerea sau declinul calității ovocitelor, oferind astfel indicii valoroase pentru optimizarea condițiilor de maturare *in vitro* și pentru dezvoltarea unor abordări mai eficiente în reproducție asistată și biotehnologiile reproductive.

Obiective:

- Evaluarea expresiei genelor implicate în senescență, apoptoză și răspunsul la stres oxidativ în ovocitele maturate *in vitro*, în medii cu antioxidanți.
- Investigarea efectelor antioxidanților asupra expresiei genelor cheie de protecție celulară, incluzând SOD, SIRT1, NRF2 și altele.
- Compararea expresiei genelor între ovocite tratate cu antioxidanți și loturi martor pentru a determina eficacitatea acestora în reducerea stresului oxidativ și menținerea calității ovocitelor.

Rezultate:

Acest capitol explorează impactul tratamentului antioxidant asupra expresiei genelor implicate în senescența și apoptoza ovocitelor de scoafă maturate *in vitro*. Genele studiate, printre care SOD, SIRT1, NRF2, MAPK38, NF- κ B50 și Casp1, au evidențiat rolul stresului oxidativ și al inflamației asupra viabilității ovocitelor. Suplimentarea mediilor de maturare cu antioxidanți precum vitamina C, acidul rozmarinic, quercetina și curcumina a avut efecte variate, dar semnificative, asupra expresiei acestor gene. De exemplu, vitamina C și quercetina au demonstrat o capacitate superioară de a reduce supraexpresia genelor SOD1 și MAPK38, asociate cu stresul oxidativ, comparativ cu acidul rozmarinic și curcumina. Totodată, expresia redusă a Casp1 sugerează că antioxidanții contribuie la scăderea inflamației și apoptozei. Genele antioxidante, precum NRF2, au fost activate, ceea ce sugerează o protecție crescută împotriva acumulării de specii reactive de oxigen, îmbunătățind astfel calitatea ovocitelor și asigurând o mai bună viabilitate a acestora.

Rezultatele sugerează că adăugarea antioxidanților în mediul de cultură al ovocitelor poate îmbunătăți calitatea și viabilitatea acestora, reducând efectele stresului oxidativ și ale

proceselor inflamatorii care contribuie la senescență. Suplimentarea cu vitamina C și quercetina s-a dovedit cea mai eficientă în reglarea expresiei genelor de stres și apoptoză, sugerând aplicabilitatea acestora în tehnici de reproducție asistată.

8: Evaluarea Expresiei Genelor Indicative ale Capacității de Fecundare

Scopul acestui capitol este de a evalua influența antioxidanților asupra capacității de fecundare a ovocitelor de scroafă maturate in vitro, prin analizarea expresiei genelor esențiale implicate în interacțiunea ovocit-spermatozoid și în funcționarea *zona pellucida*.

Obiective:

- Determinarea efectului antioxidanților asupra capacității de fecundare a ovocitelor de diferite clase de calitate, prin analiza expresiei genelor implicate în funcționarea zonei pellucida.
- Compararea expresiei genice între ovocitele maturate în medii cu antioxidanți și cele maturate în medii de control pentru a observa efectele potențiale ale antioxidanților.

Rezultate:

În acest capitol se explorează impactul antioxidanților asupra expresiei genelor implicate în procesele de interacțiune dintre ovocită și spermatozoid, în special la nivelul zonei pellucida și a proteinelor esențiale în capacitatea de fecundare a ovocitelor. Expresia genelor CD9, ITGA6, MFGE8, ZP2 și ZP3 a fost analizată în loturi de ovocite maturate in vitro în prezența unor antioxidanți precum vitamina C, quercetina și curcumina. Suplimentarea mediilor de maturare cu vitamina C și quercetina a arătat un efect pozitiv asupra expresiei genelor legate de aderență și stabilitate, în special ITGA6 și MFGE8, sugerând o creștere a capacității de legare și o reducere a riscului de polispermie. În schimb, curcumina a demonstrat efecte mai modeste asupra expresiei genelor ZP2 și ZP3, cu o tendință de supraexpresie în loturile de ovocite de calitate inferioară, sugerând o influență mai puțin pronunțată asupra protecției mecanismelor de fecundare.

Antioxidanții adăugați în mediul de maturare au un impact direct asupra capacității de fecundare a ovocitelor, îmbunătățind expresia genelor implicate în aderență și în protecția împotriva polispermiei. Suplimentarea cu vitamina C și quercetina s-a dovedit eficientă în menținerea integrității ovocitelor, confirmând rolul antioxidanților în susținerea calității și viabilității pentru fecundare.

Cele mai importante aspecte de noutate și originalitate care au reieșit din cercetările noastre au fost:

- **Optimizarea maturării in vitro a ovocitelor de scroafă prin utilizarea unor medii suplimentate cu antioxidanți specifici, precum acidul ascorbic și acidul rosmarinic, pentru a reduce stresul oxidativ, fapt ce a demonstrat creșterea semnificativă a ratei de maturare și viabilitate a ovocitelor.**
- **Identificarea și validarea genelor de referință pentru expresia genică stabilă în ovocite de scroafă, cu o mențiune specială despre gena PPIA, care a prezentat stabilitate crescută în condiții experimentale variate, contribuind la îmbunătățirea acurateței în analiza expresiei genice.**
- **Observarea fenomenului de partenogeneză spontană în loturile de ovocite tratate cu antioxidanți specifici, cum ar fi quercetina și curcumina.**

- **Construirea și validarea perechilor de primeri specifici** pentru tehnica RT-qPCR, o metodă avansată aplicată în acest context pentru monitorizarea expresiei genelor implicate în senescența ovocitelor, apoptoza și capacitatea de fecundare.
- **Analiza expresiei genelor asociate cu procesele de senescență și apoptoză** în ovocite, oferind o înțelegere detaliată asupra modului în care factorii de stres oxidativ și antioxidanții influențează calitatea ovocitelor, facilitând astfel optimizarea culturii in vitro.
- **Evaluarea influenței antioxidanților asupra capacității de fecundare** a ovocitelor, situație în care utilizarea specifică a antioxidanților s-a dovedit benefică pentru păstrarea viabilității ovocitelor și a calității fertilității acestora.