



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**THC fitokannabinoidearen
implikazioa sagu oozitoen heltze-
prozesuan eta ernalketan**

*Lide Totorikaguena, Estibaliz
Olabarrieta, Naiara Agirregoitia
eta Ekaitz Agirregoitia*

130-143 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.17>



THC fitokannabinoidearen inplikazioa sagu oozitoen heltze-prozesuan eta ernalketan

Totorikaguena, Lide; Olabarrieta, Estibaliz; Agirregoitia, Naiara eta Agirregoitia, Ekaitz

Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea

lide.totorikaguena@ehu.eus

Laburpena

Ugaztun emeen oozitoen heltze-prozesua ugalkortasunean garrantzia handia duen prozesu bat da, obulua ernaldia izateko beharrezkoa delako. Oozitoak obulutegiko folikuluetan sortzen dira eta lehenengo meiosiaren profasean daude geldituta, obulutegietan. Oraindik ez dira ondo ezagutzen meiosiaren berraktibazioa eragiten duten seinaleak baina hauei esker abiatuko da obulazioa non, emakumeen kasuan, hilero oozito bakarra obulutegitik irtengo den. Gero eta ebidentzia gehiago dago seinale horietako asko G proteinei loturiko hartzaileen (GPCR) menpe dagoela eta horien aktibazioak edo inaktibazioak oozitoen heltze-prozesua modulatzeko dituzten seinalizazio ur jauziak pizten dituztela. Gakoa da aurkitzea zeintzuk diren berpizkunde meiotikoa eragiten eta erregulatzen dituzten kanpo seinaleak, seinale horiek farmakoek bidez kontrolatuz heltze-prozesua ere kontrolatu genezakeelako. Horrela, ikusi da kannabinoideek eragiten duten seinaleztapena eta oozitoen heltze-prozesua hasteko gertatu behar dena berdina dela, beraz, prozesuan lagungarriak izan litezkeen lotugai interesgarriak ditugu. Gure ikerketa taldeak sistema kannabinoidearen funtzioa aztertu du sagu oozitoen heltze-prozesuan, ernalketan eta enbrioaren garapenean eta haren parte-hartzea baieztatzeaz gain, THC fitokannabinoideak sagu oozitoen heltze-prozesua modulatzeko duela ikusi du. Gainera, etorkizunerako kannabinoideen erabilera terapeutikoa aztertzen jarraitzea interesgarria litzateke, besteak beste, IVM medioetan osagai gisa erabilita. Nabarmendu behar da oozitoen in vitro heltzea askoz alternatiba onuragarriagoa, erosoagoa eta arrisku gutxiagokoa izango litzatekeela ugalkortasun klinika batera joan behar den edozein pazienterentzako, obarioen estimulaziorako beharrezkoak diren hormonak hartzea ekidindo litzatekeelako edo behintzat dosia murriztuko litzatekeelako. Are gehiago, hormonon estimulazioa kontraindikatu dagoen emakumeentzako haurdunaldia lortzeko aukera bakarra izan ahalko litzateke.

Ugalkortasuna, oozitoen heltzea, IVM, sistema kannabinoidea, THC fitokannabinoidea

Abstract

Oocyte's maturation is a very important process in fertility. The oocyte meiotic maturation is a complex process whereby immature oocytes acquire the characteristics required for successful fertilization and embryogenesis. For that, immature oocytes arrested at the diplotene of prophase I (GV) must resume meiosis until the metaphase II of meiosis (MII). However, although all the mechanisms that leads for the reactivation of meiosis are not still known, there are known certain molecules that are able to modulate this process. In this sense, we are interested in the role that cannabinoids could have as IVM promoters because cannabinoid's molecular pathway is similar to the one by which oocyte's meiosis resumption is activated. That's why, our research team has studied the function of the cannabinoid system in the process of maturation, fertilization and embryo development in mice, and we have confirmed its participation. Beyond that, we have seen that in fact, the fitocannabinoid (THC) modulates oocyte maturation. The aim of this study was to characterize the role of the phytocannabinoid THC in the IVM process, due to its possible use in clinic is most feasible and reliable than any synthetic cannabinoid. The most important goal of IVM method is that could be the only hope or alternative for a not insignificant number of patients

Fertility, oocyte maturation, IVM, cannabinoid system, THC cannabinoid

1. Sarrera eta motibazioa

Ugalkortasun zentroen estatistikak aztertuta, ikusten da gero eta gehiago direla oozitoen *in vitro* heltzea (IVM) jasateko balizko egoeran dauden pazienteak. Baina, oraindik, IVM teknika berria da eta, duen arrakasta txikiagatik eta haren inguruan dagoen ezjakintasunagatik, gutxi erabiltzen da. Oozitoen *in vitro* heltzean, pazienteari hormonekin estimulatutako gabeko obarioetatik edo estimulazio txikia jasotzen duten obarioetatik, heldu gabeko oozitoak erazten zaizkio eta hazkuntza-medioetan heldu dira.

Ugaltun emean, oozitoak obulutegiko folikuluetan sortzen dira. Enbrioi emean obulutegietan, oozitoak lehenengo meiosiaren profasean daude geldituta eta seinale zehatzak jasotzen dituzten arte ez dira berpizten bigarren fase meiotikora heltzeko, meiosis I. profasean etenda daude obulazioa gertatu arte. Oozito horiek besikula germinal bezala izendatzen dira (GV). Hainbat hormona jariatzen direnean eta oraindik ondo ezagutzen ez diren seinale zehatzak jasotzen dituztenean hasiko da meiosiaren berraktibazioa. Hor abiatuko da obulazioa, non oozito bakarra obulutegitik irtengo den eta meiosiarekin jarraituko duen, lehenengo meiosisik (MI) II. meiosiaren metafasera pasatuz (MII). Espermatozoide batek ernaldutako ahal izateko, oozitoa metafase IIan egon behar da eta, ernalketa gertatzen baldin bada, bukatuko da meiosisia eta zigotoaren zatiketa mitotikoarekin enbrioiaren garapena abiatuko da (Rodríguez eta Farin 2003, Sun eta Nagai 2003).

Nahiz eta oraindik ezezagunak diren oozitoen heltze-prozesua pizten dituzten seinaleak, gero eta ziurtasun gehiago dago seinale horietako asko G proteinei loturiko hartzailen (GPCR) menpe daudela (El Jouni eta lank., 2007) eta GPCR hartzailen horien aktibazioak edo inaktibazioak oozitoen heltze-prozesua modulatu dituzten seinalizazio ur jauziak pizten dituztela (Schindler, 2011). Beraz, gakoa da aurkitzea zeintzuk diren berpizkunde meiotikoa eragiten eta erregulatzen duten kanpo seinaleak, seinale horiek farmakoen bidez kontrolatuz gero, heltze-prozesua ere kontrolatu genezakeelako. Saguan deskribatu da meiosisia geldirik mantenduko lukeen konstitutiboki aktiboa den GPCR-Gs den GPR3 hartzaila, hain zuzen. Ondorioz, hipotetiza daiteke meiosiaren heltze-prozesua induzituko lukeen hartzaileren bat egotea (GPCR-Gi dena) (Mehlmann, 2005) baina ez dira ondo ezagutzen zeintzuk izango lirakeen haien lotugaiak.

Orokorrean, konposatu kannabinoideek G proteinei (Gi/o) loturiko hartzailen espezifikoetan (CB1 eta CB2 hartzailen kannabinoideak) eragiten dute AC (adenilato ziklasa) inhibituz eta, ondorioz, AMPz-aren murrizketa eta protein kinasa A (PKA)-ren inhibitioa gertatzen da. Beste alde batetik, protein kinasa B (AKT) proteina aktibatuko dute PI3K-ren aktibazioaren bidez. Azkenik, beste hainbat kinasen fosforilazioan eta aktibazioan parte hartzen dute, hala nola, ERK proteinarenean (Dalton eta Howlett, 2011).

Barne-sistema kannabinoidea osatzen dute kannabinoide-hartzailen, euren barne-estekatzaileen (barne-kannabinoideak) eta sintesi eta degradazio entzimek. Gorputzeko barne-kannabinoideen artean, N-arakidonoiletanolamina (anandamida; AEA) (Devane eta lank., 1992) eta 2-arakidonoilglicerola (2-AG) (Mechoulam eta lank., 1995) dira ezagunenak eta konposatu horiek 1 motako hartzailen kannabinoidea (CB1) eta 2 motako hartzailen kannabinoidea (CB2) deituriko hartzailentara lotzen dira.

CB1 eta CB2 hartzailleak G proteina inhibitzaileei loturiko hartzailleak dira eta mintz plasmatikoa zeharkatzen duten 7 α -helizez osatuta daude.

Fitokannabinoideak *Cannabis sativa L.* landaretik eratorriak diren konposatu lipofilikoak dira. 60. hamarkadan hasi ziren indarra hartzen kannabinoideekin egindako ikerketak, kannabis landarearen Δ^9 -tetrahidrocannabinola (THC) purifikatu eta deskribatu zenean. THC da efektu bioaktiboen arduradun nagusia eta kannabinoide ugariena (Elsohly eta Slade, 2005).

2. Arloko egoera eta helburuak

Sistema kannabinoidea ugalkortasunean inplikaturik dagoela ikusi da: gametogenesis, ernalketan, enbrioiaren ezarpenean, plazentazioan, haurdunaldian eta erditzean (Battista, eta lank. 2008, Maccarrone 2009) eta sistema kannabinoidean parte hartzen duen makinaria guztia ugal-aparatuko organo, ehun eta zeluletan dagoela frogatu da. Gure taldeak, hala nola, sistema kannabinoidea bai giza oozitoetan eta granulosetan (Peralta eta lank., 2011, Agirregoitia, et al. 2015, Agirregoitia, eta lank. 2016) zein behien oozitoetan espresatzen dela deskribatu du (Lopez-Cardona eta lank., 2016) baina oraindik oso gutxi dakigu barne-sistema kannabinoidearen funtzioari, jardunari eta eraginari buruz oozitoen heldzean edota ernalketan. Horregatik, gizakiarekin lan egiteak dakartzan mugengatik gizakiekin ez ezik saguekin lan egiten jarraitu du taldeak, zehazki kannabinoide sintetikoek (HU-210) nola jarduten duten oozitoen heldzean eta zer nolako eragina duten ernalketan. Gainera, CB1 eta CB2 hartzailleentzako *knockout* (KO) saguen sorrerak kannabinoideen seinalizazioaren eraginari buruzko informazio gehiago lortzeko aukera eskaini digu.

Egin diren ikerketa urriek frogatzen dute kannabinoideak heldze-prozesua modulatu lezaketela: alde batetik, anandamida (AEA) barne-kannabinoidearen kontzentrazioa emendatuz doa likido folikularrean giza oozitoen heldze-prozesuan (El-Talantini eta lank., 2009). Beste alde batetik, gure ikerketa-taldeak sistema kannabinoidea deskribatu du giza oozitoetan eta granulosetan meiosiaren berraktibazioan, era berean, oozitoen heldzean kannabinoide-hartzailen lokalizazioan aldaketak daudela baieztatu digu. (Peralta eta lank., 2011, Agirregoitia eta lank., 2015, Agirregoitia eta lank., 2016).

Aurrekariak kontutan hartuta, gure ikerketa lanean aurrera egiteko, alde batetik, THC fitokannabinoidearen eragina aztertu da bai oozitoen heldze-prozesuan, PI3K/Akt eta MAP kinasen (MAPK) bidezidoren seinaleztapenean ERK proteina bidez nola eragiten duen behatuz eta baita geroko ernalketa prozesuan ere, blastozistoen kopuruari erreparatuz. Beste alde batetik, THC fitokannabinoidearen eragina aztertu da oozitoen heldze-prozesuan eta ernalketan baina, kasu honetan, hormonatu gabeko sagu prepubereen oozitoetan.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

3.1. CB1 eta CB2 hartzaileen lokalizazioaren dinamika saguen oozitoen meiosiaren beraktibazioan eta madurazio nuklearrean THCren presentzian

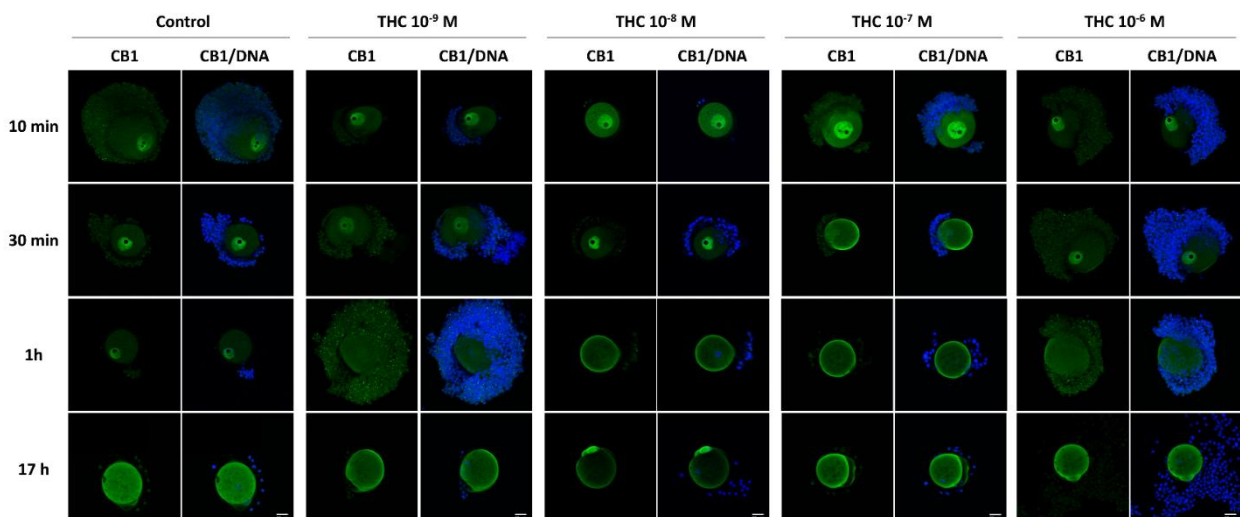
Oozitoen heltze-prozesuan barne kannabinoideen rola ulertzeko, CB1 eta CB2 hartzaileen presentzia aztertu zen sagu oozitoetan THC fitokannabinoidearekin *in vitro* heldu ondoren.

López-Cardonak eta gure taldekideek (2016) behi emearen oozitoetan frogatu zuten exokannabinoideak heltze-medioan gehituzeko oozitoen madurazio nuklearraren abiadura aldatzen zela, GVtik MI fasera azkarrago pasatuz. Saguekin egindako esperimenduetan ere efektu berdina ondorioztatu genuen, kannabinoideek *in vitro* heldutako oozitoen meiosiaren berraktibazioa indutziten dutela, alegia.

Ikusteko THC fitokannabinoideak eraginik duen hartzaile kannabinoideen lokalizazioan, oozito heldugabeak THC goranzko kontzentrazioekin inkubatu genituen 17 orduz eta hainbat denbora tartetan fixatu genituen (10 minutu, 30 minutu, ordu 1 eta 17 ordu) CB1 eta CB2 hartzaileen lokalizazio patroia ikusteko. Oozitoen fase nuklearrak sailkatu ziren, hurrenez hurren, GV, MI eta MII faseetan.

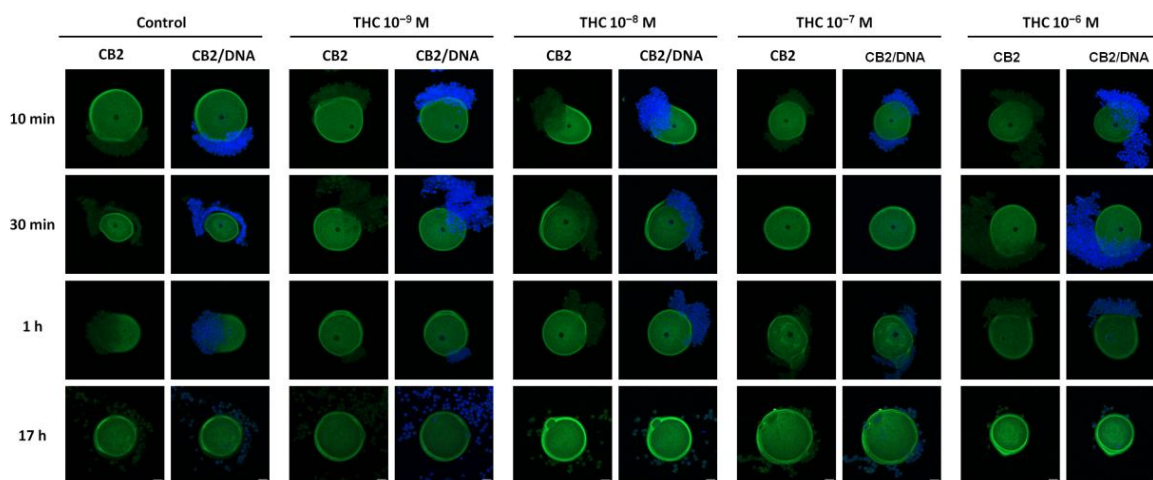
Oozito heldugabeetan CB1 hartzailea homogeneouski banatuta agertzen da GV fasean eta meiosiaren beraktibazioan periferiarantz mugitzen hasten da (1. irudiko kontrola). Hala ere, THC kontzentrazio desberdinak gehituzeko CB1 hartzailearen berlokalizazioa aurreratzen da kontrolarekin alderatuta. Horrela, THC kontzentrazio guztietan (10^{-9} M –tik 10^{-6} M-ra) ordu batera CB1 hartzailea ez da adierazten GV-aren inguruan eta, zehazki, 10^{-7} M kontzentrazioarekin azkartu egiten da berlokalizazioa 30 minututan (1. irudia).

1. irudia. CB1 hartzailearen immunolokalizazioa sagu-oozitoen heltze-prozesuan. Oozito heldugabeak *in vitro* kultibatu ziren THC-ren ausentzian eta presentzian 1 nM (10^{-9} M), 10 nM (10^{-8} M), 100 nM (10^{-7} M) eta 1 μ M (10^{-6} M) kontzentrazioetan hainbat denbora tartetan: 10 min, 30 min, 1h and 17 h. CB1 hartzailearen distribuzioa, berdez. Hoechst DNA-markatzailea, urdinez. n = 5 Erreferentzia barra: 25 μ m.



THC-ren eginkizuna ulertzen jarraitzeko, eta CB1 hartzailearen lokalizazioa zehaztu ondoren, fitokannabinoide honek CB2 hartzailearengan zeukan efektua aztertzeari ekin genion. CB1 hartzaileerako prozedura berdina jarraitu genuen. Hala ere, CB2 hartzaileak banaketa homogenea erakusten zuen oozitoan zehar, periferian tindaketa intentsitate altuagoa zuelarik bai THC kontzentrazio desberdinetan bai THC gehitu ez zaionean ere (2. irudia).

2. irudia. CB2 hartzailearen immunolokalizazioa sagu-oozitoen heltze-prozesuan. Oozito heldugabeak *in vitro* kultibatu ziren THC-ren ausentzian eta presentzian 1 nM (10^{-9} M), 10 nM (10^{-8} M), 100 nM (10^{-7} M) eta 1 μ M (10^{-6} M) kontzentrazioetan hainbat denbora tartetan: 10 min, 30 min, 1h and 17 h. CB1 hartzailearen distribuzioa, berdez. Hoechst DNA-markatzailea, urdinez. n = 5 Erreferentzia barra: 20 μ m.



3.2. ERK-ren fosforilazio patroia sagu oozitoen *in vitro* heltze-prozesuan

MAPK bidezko seinaleztapenak funtzio garrantzitsua betetzen du oozitoen heltze prozesuan, ERK-ren fosforilazioak eta desfosforilazioak oozitoarentzako garrantzitsua diren seinaleak modulatzeko dituelako (Sanchez eta Smitz 2012). Bidezidor hori kannabinoideek ere modulatzeko dutela jakina denez (López-Cardona et al., 2016), heltze-medioan THC fitokannabinoidea gehitu genuen egiaztatzeko CB1 eta CB2 hartzaileen aktibazioak ERK-ren fosforilazio patroian eragin zezakeen oozitoaren heltze-prozesuan zehar eta kontrolarekin alderatu genuen (dimetil sulfoxidoa, DMSO, garraiatzailea soilik duen media).

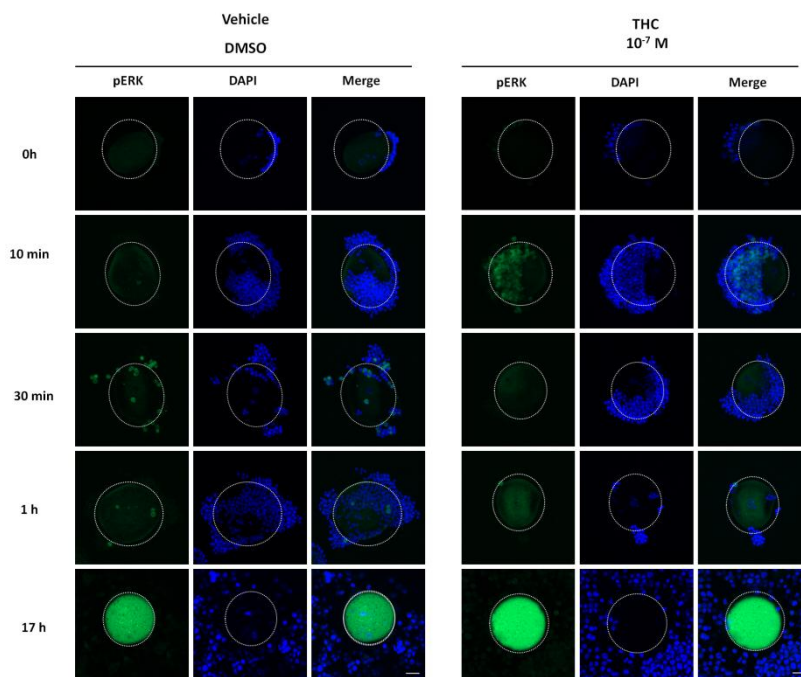
Oozitoen heltze-prozesuan zehar hartzaile kannabinoideen lokalizazioan ondorioztaturiko emaitzen arabera, kontrolarekin alderatuta aldaketa gehien ekarri dituen THC kontzentrazioa erabili zen (10^{-7} M) gainontzeko esperimentuetarako.

Alde batetik, oozitoak hainbat denbora tartetan fixatu genituen (10 minutu, 30 minutu, ordu 1 eta 17 ordu) THC 10^{-7} M kontzentrazioekin *in vitro* heldu ondoren. Oozito heldugabeetan ERK desfosforilatuta agertzen da baina 17 ordutara (sagu oozitoetan heltzeko behar den denbora) ERK oozitoan agertzen da fosforilatuta. 10 minututara, ERK fosforilaturik ageri da bakarrik granulosa zeluletan THC-ren presentzian inkubatu diren oozitoetan. 30 minutu igaro arte ez zen ikusi fosforilaziorik kontroleko granulosa zeluletan. Hala ere, denbora tarte berdinean THC-ren presentzian

inkubatutako oozitoen kasuan, granulosa-zelulak desfosforilatuta ageri dira baina oozito barnean, ordea, ERK fosforilatuta agertzen hasten da. Ordu batera, THC-rekin heldutako oozitoen kasuan, ERK-ren fosforilazioak intentsitate altuagoa dauka kontrolarekin konparatuz (3. irudia).

Hartzaile kannabinoideak falta zitzaizkien *knock out* saguak erabiltzean (CB1^{-/-}, CB2^{-/-} y CB1^{-/-}/CB2^{-/-}), ez zen desberdintasunik antzeman ERK-ren fosforilazio patroian THC-ren ausentzian eta presentzian heldutako oozitoen artean. Hori dela eta, ondorioztatu genezake bai CB1 bai CB2 hartzaileek parte hartzen dutela THC-ren bidezko modulazioan.

3. irudia. ERK proteinaren aktibazioa sagu-oozitoen madurazio nuklearrean zehar, oozito heldugabeak a) DMSO-rekin b) THC 100 nM-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu ondoren 17 h-z. ERK- ren fosforilazioa 10 min, 30 min, 1h eta 17h-tan ikusi zen, berdez. DNA-markatzailea, urdinez. Erreferentzia barra: 20 μ m.

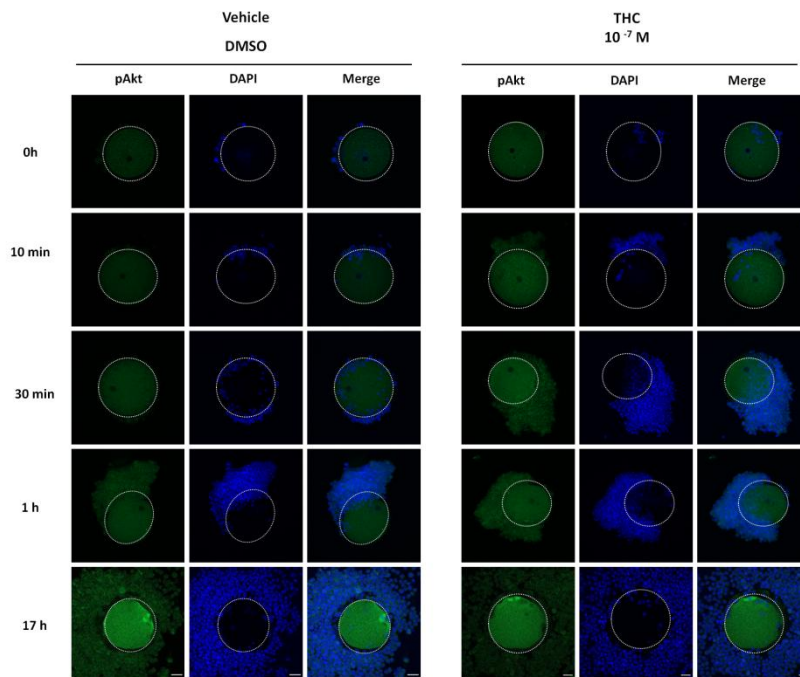


3.3. AKT-ren fosforilazio patroia sagu oozitoen *in vitro* heltze-prozesuan

PI3K/AKT bidezidorraren seinaleztapenak ere rol garrantzitsua dauka oozitoen heltzean (Cecconi eta lank. 2012) AKT-ren jarduera altua beharrezkoa baita meiosia beraktibatzeke. Gainera, proteina kinasa hau ere kannabinoideek modulatzten dutela jakinda, THC erabili zen ikusteko oozitoen heltze prozesuan zehar CB1 eta CB2 hartzaileen aktibazioak eraginik zuen AKT-ren seinaleztapenean, esaterako, fosforilazioa azkartuz DMSO-rekin inkubatutako oozitoekin alderatuta. Horretarako, aurreko esperimentuan bezala, oozitoak hainbat denbora tartetan fixatu genituen (10 minutu, 30 minutu, ordu 1 eta 17 ordu) THC 10⁻⁷ M kontzentrazioekin *in vitro* heldu ondoren. Kasu honetan, AKT-ren fosforilazio patroian desberdinatsunak ikusi genituen kontrolaren eta THC-rekin inkubatutako oozitoen artean, 10 eta 30 minututan granulosa zeluletan fosforilatuta agertzen delako. Hala ere, oozitoen kasuan fosforilazio patroia antzerako zen bai THC-rekin bai THC gabe inkubatu zenean (4. irudia).

Kasu honetan ere, hartzaille kannabinoideak falta zitzaizkien *knock out* saguak erabiltzean (CB1^{-/-}, CB2^{-/-} y CB1^{-/-}/CB2^{-/-}), ez zen desberdintasunik antzeman AKT-ren fosforilazio patroian THC-ren ausentzian eta presentzian heldutako oozitoen artean. Modu honetan, esan genezake THC-ren bidezko modulazioan bi hartzaille kannabinoideek parte hartzen dutela.

4. irudia. AKT proteinarene aktibazioa sagu-oozitoen madurazio nuklearrean zehar, oozito heldugabeak a) DMSOrekin b) THC 100 nM-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu ondoren 17 h-z. AKT-ren fosforilazioa 10 min, 30 min, 1h eta 17h-tan ikusi zen, berdez. DNA-markatzailea, urdinez. Erreferentzia barra: 20 µm.



3.4. THC-ren presentzian heldutako oozitoetatik eratorritako enbrioi-tasa.

Gure hurrengo helburua izan zen behatzea ea ernalketan eta enbrioiaren garapenean eraginik zuen THC-ren presentziak oozitoen heltze-prozesuan.

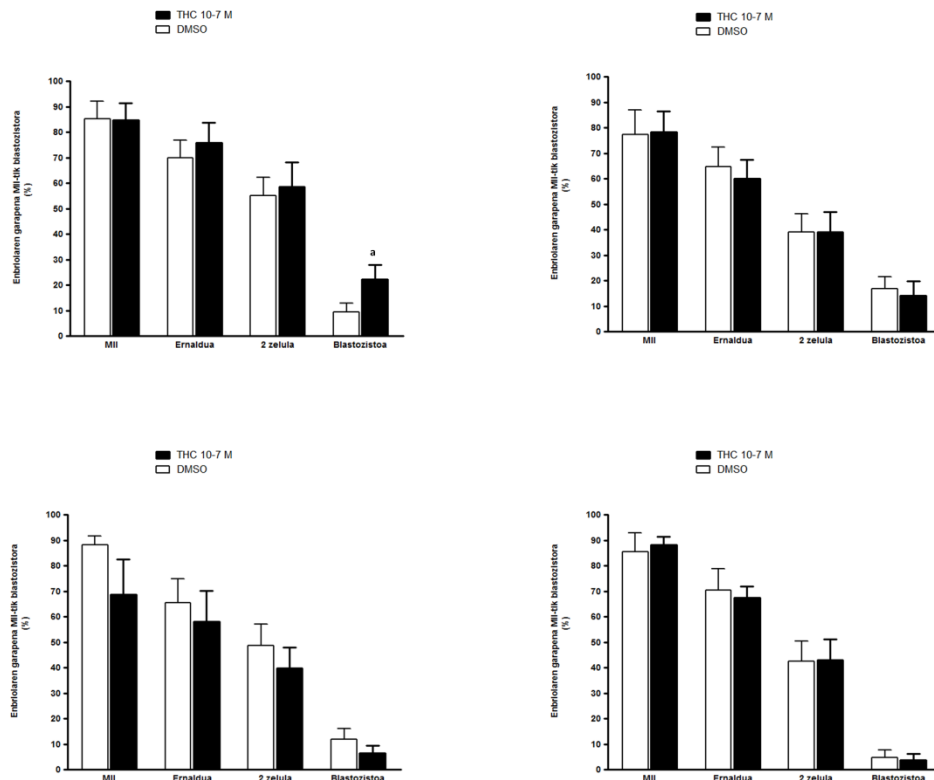
Kontuan izanda CB1 hartzaillearen berlokalizazioan eta bai ERK-ren eta AKT-ren fosforilazio patroietan aztertutako emaitzak, aldaketa handienak eragin zituen THC kontzentrazioa erabili genuen gainontzeko esperimentuetarako (10^{-7} M). Horrela, 17 orduz (sagu oozitoen heltze-prozesurako batez besteko denbora) inkubatu genituen oozitoak THC 10^{-7} M kontzentrazioarekin eta THC-rik gabe eta, ondoren, *in vitro* ernalkuntza egin genuen (IVF). Saguetan, *in vivo* heldu ziren oozitoen heltze-fase zein IVF geroko enbrioi-fase guztietan %80tik gora mantendu ziren eta horrek erakusten du *in vitro* ernalkuntza ondo eginda dagoela. Oozitoak *in vivo* heltzean emaitzak askoz hobeak direla ikus daiteke, blastozistora enbrioi gehienak heltzen direlako baina, *in vitro* heldu diren oozitoetan, ernaldu diren zelulen beherakada eta blastozistoen kopuru urria nabarmenak dira, espero bezala (Epigg J.J. eta lank. 1992).

THC-rekin egindako inkubazioan ez zen aldaketa adierazgarririk ikusi oozito helduetan (MII), ernaldutako zigotoetan eta 2 zeluletako enbrioietan garraiatzailearekin inkubaturiko oozitoekin konparatzerakoan. Hala ere, THC-rekin (10^{-7} M) heldutako *wild type* saguetan blastozistora iritsi zirenen portzentajea bikoiztu zen, THC gabe inkubatutakoekin konparatuz gero (5.A irudia).

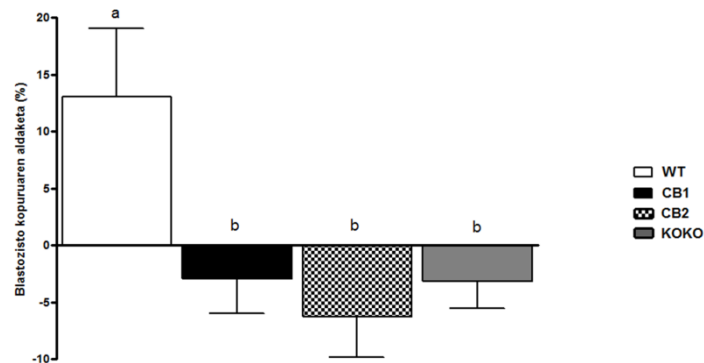
Jakiteko THC-ren eragina CB1 edo CB2 hartzaileen bidezkoa zen, hartzaile kannabinoideak falta zitzaizkien *knock out* saguen (CB1^{-/-}, CB2^{-/-} y CB1^{-/-}/CB2^{-/-}) oozitoak ere *in vitro* heldu genituen eta ondoren IVF teknika erabili genuen (*wild type* arren espermatozoideekin).

Ez zen hobekuntzarik ikusi blastozisto kopuruari dagokionez THC-rekin eta garraiatzailearekin trataturiko oozitoen artean edozein genotiporentzako (5B, C eta D irudiak). Hala ere, blastozistoehunekoen aldaketari erreparatuz gero kontrolaren eta tratamenduaren artean genotipo bakoitzarekiko, bai CB1 eta bai CB2 hartzaileen faltak blastozistoehunekoen beherakada eragin zuen (6. irudia). Modu honetan, frogatu ahal izan genuen THC-k bi hartzaile kannabinoideen bidez lan egiten duela, hartzaile haugariko bat edo biak falta direnean ez delako lortzen blastozisto kopurua emendatzea fitokannabinoidea gehitzerakoan kontrolarekin alderatuz.

5. irudia. a) *wild type*, b) *Cnr1^{-/-}*, c) *Cnr2^{-/-}* eta d) *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* genotipoa duten saguen oozitoak *in vitro* heldu ondoren lortzen diren blastozisto kopurua. *In vitro* heldutako oozitoen kontrola THC gehitu gabe baina garraiatzailea (DMSO) gehituta egin da (zutabe zuria). THC 10^{-7} M-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu diren oozitoak agertzen dira (zutabe beltza). n=9. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a): $p < 0.001$ izanik.



6. irudia. Blastozisto kopurua aldaketa kontrolaren eta tratamenduaren artean. Blastozistoen ehunekoan aldaketak genotipo desberdineko sagu oozitoak erabilia WT (zuria), Cnr1^{-/-} (beltza), Cnr2^{-/-} (puntuduna) eta Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-} (grisa). Emaitzak batez bestekoa eta batez besteko errore estandarrekin adierazita daude. n=9. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a), (b): p<0.05 izanik.



3.5. THC-ren efektua sagu prepubereen oozito heldugabeen *in vitro* heltze-prozesuan

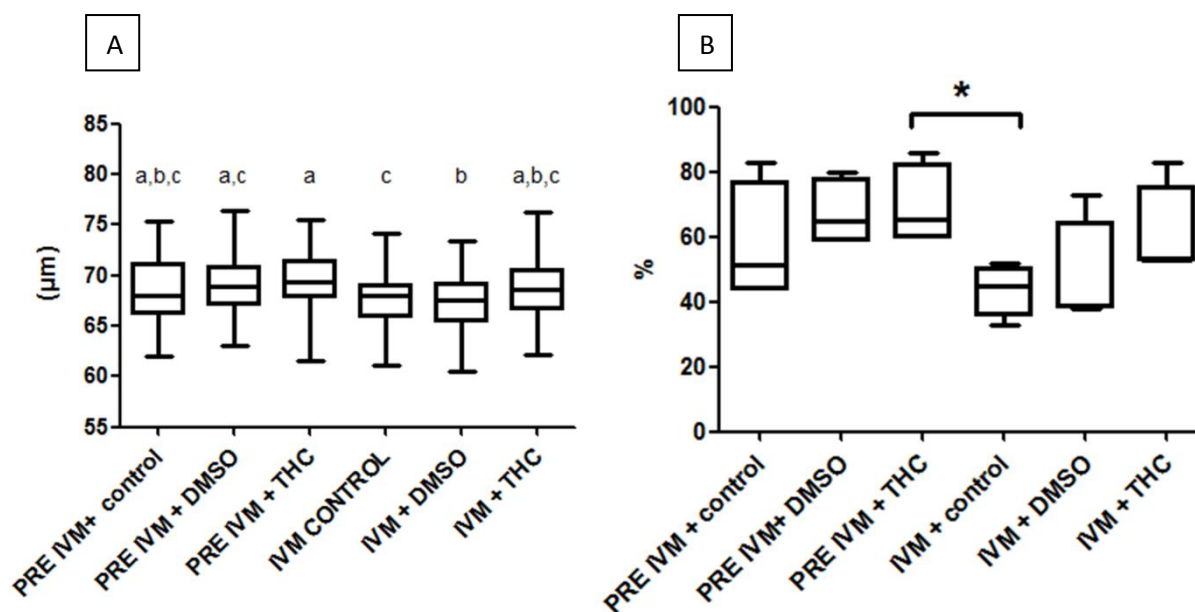
IVM programetan egindako azken behaketek erakutsi dute oozitoen ehuneko handi batek ez duela lortzen enbrigenesi normal bat aurrera eramateko gaitasuna edo garapen-kompetentzia (Sanchez F. eta lank., 2015) eta, horregatik, beharrezkoa ikusi da heltze-prozesuaren aurreko etapari ere arreta eskaintzea (Pre-IVM). Horretarako, kompetentzia sexuala garatu ez duten saguen oozito heldugabeak erabili ziren (29 eguneko saguak) heltze-prozesuaren aurreko etapa horretan azterketak egiteko. Oozitoaren heltze-prozesu egoki baten adierazleatariko batzuk dira oozitoaren diametroaren neurria eta korpuskulu polarren eratzea. Griffin eta lankideen ikerketen arabera (2006) sagu oozitoen diametroa batezbestez 72 μm -koa da Graaf folikulutik (edo folikulu antraletik) askatzerakoan obulazioan eta kontuan izan behar da sagu prepubereen oozitoak folikulu antral goiztiarretik eratorriak direla (70 μm , Griffin eta lank., 2006)).

Sagu prepubereen oozito heldugabeak tratamendu desberdinekin inkubatu ziren. Alde batetik, batzuk heltze-medioan jarri aurretik 48 orduz inkubatu ziren C-motako Natriuretic Peptidoaren (CNP) presentzian, oozitoak GV fasean geratu ahal izateko blokeatuta. Horrela, bai madurazio nuklearra bai zitoplasmatikoa sinkronizatzeko denbora eman ziezaion oozitoaren nukleo-gaitasuna eta garapen-kompetentzia (Noguiera D., eta lank. 2006, Vanhoutte L eta lank., 2007) .Ondoren, Pre-IVM fasean inkubatu ziren oozito heldugabeak eta aurreko tratamendu hau jaso ez zuten oozito heldugabeak *in vitro* heltze-medioetan jarri ziren tratamendu desberdinekin: Kontrola (DMSO eta THC gabe), DMSO-rekin eta THC-rekin.

Emaitza egokienak bai oozitoaren diametroari zegokionez (4A irudia) bai korpuskulu polarren portzentajeari zegokionez ere (4B irudia) Pre-IVM etapa pasatu zuten oozitoek aurkezten zituzten eta gainera adierazgarria da 48 h ondoren THC-rekin heldu ziren oozitoek dituztela emaitza onenak Pre-IVM etapatik igaro ez diren oozitoekin alderatuta (p<0,05), zeinetan oozitoaren diametroak honako hauek izan ziren: 68,387 $\mu\text{m} \pm 0,359$; 68,94 $\mu\text{m} \pm 0,33$; 69,33 $\mu\text{m} \pm 0,40$; 67,51 $\mu\text{m} \pm 0,365$; 67,29

$\mu\text{m} \pm 0,350$; $68,65 \mu\text{m} \pm 0,340$ Pre-IVM kontrola, Pre-IVM DMSO, Pre-IVM THC, IVM kontrola, IVM DMSO, IVM THC-rako. (4A irudia). Korpuskulu polarren ehunekoak: %57,5; %67,25; %69,25; %43,75; %47,25; %60,5 Pre-IVM kontrola, Pre-IVM DMSO, Pre-IVM THC, IVM kontrola, IVM DMSO, IVM THC-rako. (4B irudia).

4. irudia. *Wild type*, genotipoa duten sagu prepubereen oozitoak *in vitro* heldu ondoren lortzen diren oozito helduen diametroa (A) eta korpuskulu polarren neurria (B). Tratamendu desberdinetan kultibatu dira; oozito batzuk Pre-IVM tratamenduan egon dira *in vitro* heldu aurretik eta ondoren DMSO edo 10^{-7} M-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu dira. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a): $p < 0.001$ izanik. (b) asteriskoarekin.

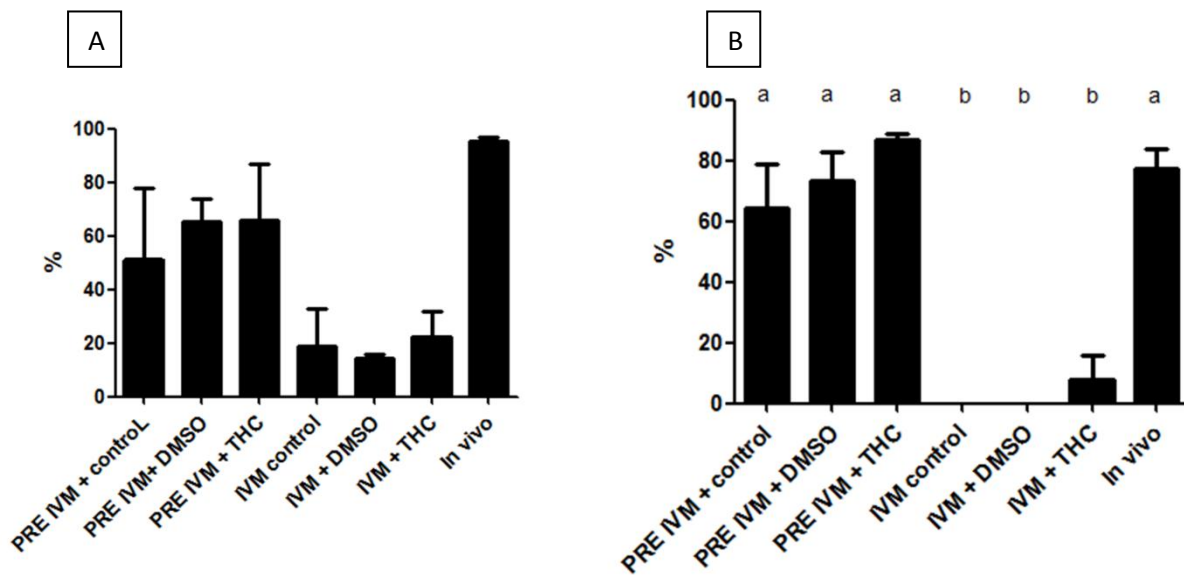


3.6. IVF geroko enbrioi kopuruan eragina sagu prepubereen oozitoak THC-ren presentzian *in vitro* heldu ondoren

Hurrengo helburua izan zen behatzea nolako garapen-kompetentzia lortzen zuten sagu prepubereen oozito heldugabeek ernalduak izateko. Kasu honetan ere, sagu prepubereen oozito heldugabeak erabili ziren (29 eguneko saguak) eta oozito horiek tratamendu desberdinetan inkubatu ziren. Aurrekoan bezala, batzuk Pre-IVM fasean inkubatu ziren 48 orduz eta ondoren, heltze-medioan jarri ziren DMSO gabe, DMSOekin eta THCekin. Gainontzekoak zuzenean inkubatu ziren lehengo 3 tratamenduekin heltze-medio batean. Azkenik, oozito heldu horiek ernaldu ziren IVF teknika erabilia.

Aurreko esperimentuek erakutsi zuten bezala, garapen-kompetentzia altuena lortu zuten oozitoetatik era adierazgarrian lortu zen blastozisto kopuru altuena, ia *in vivo* tratamenduko blastozisto kopururaino helduz ($p < 0,01$). (5b irudia).

5. irudia. Sagu prepubereen oozitoak THC-ren presentzian (10^{-7} M) edo ausentzian *in vitro* heldu ondoren eta, IVF egin ondorengo enbrioi-garapenaren etapa bakoitzeko kopurua: 2 zelulako enbrioiak (A), blastozistoa (B). Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a): $p < 0.001$ izanik.



3.7. IVF geroko enbrioiaren kalitatean eragina sagu prepubereen oozitoak THC-ren presentzian *in vitro* heldu ondoren.

Azken helburua enbrioiaren kalitateari erreparatzea izan zen. Horretarako, blastozistoaren morfologia eduki genuen kontuan. Sagu prepubereen oozito heldugabeak tratamendu desberdinetan inkubatu ziren eta ondoren IVF teknika erabili zen aurreko atalean azaldu bezala.

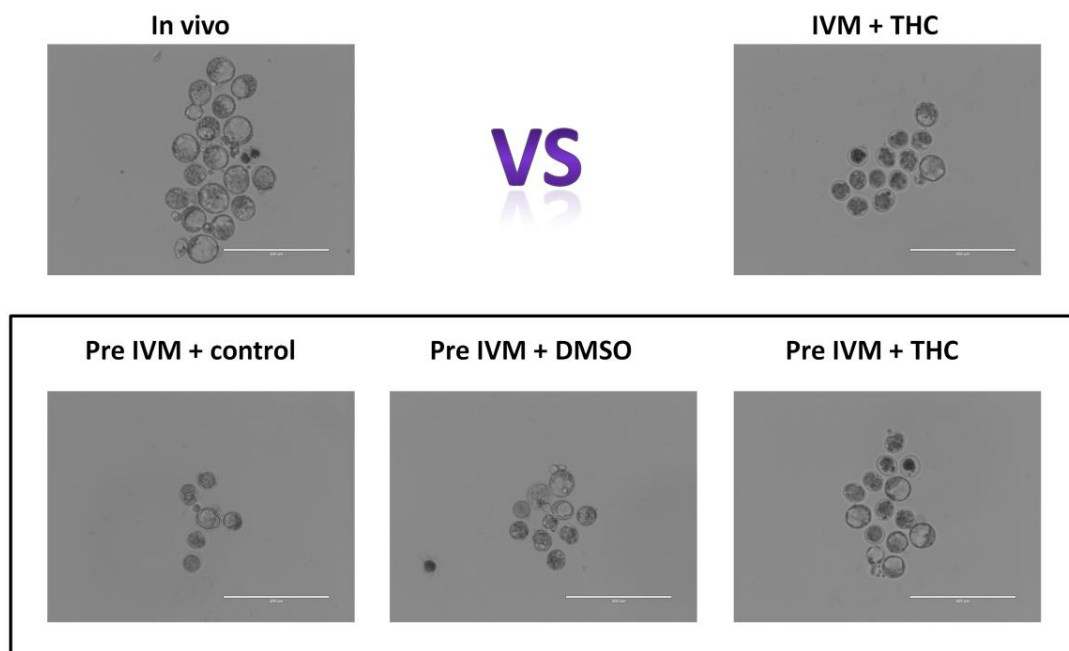
Pre-IVM kultibo fasean egon ziren zigotoetatik erdia baino gehiago heldu zen blastozisto etapara. Ordea, zuzenean heldze-medioan inkubatu zirenetatik, zigotetik blastozistora garatzea lortu zutenen tratamenduetatik bakararra mediora THC gehitu zitzaiona izan zen.

Morfologiari dagokionez, blastozisto egoeran, errez bereiztu daitezke sortu berri diren bi zelula mota: alde batetik, blastozistoa osatzen duten kanpoaldeko zelulak, trofoektodermo bezala ezagutzen direnak, eta bestetik, blastozelo barruan dauden zelulak, blastozistoaren polo batean barruko zelula-multzoa osatzen dutenak (*Inner cell mass*, ICM). ICM 3 mailatan bereiz daiteke kalitatearen arabera (Gardner eta Schoolcraft, 1999; Alpha Scientists in Reproductive Medicine eta ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011): maila oneneko ICM (1) hertsiki loturik dauden zelula askoz osatuta dago, erdi-mailako ICM (2) arinki loturik dauden zelula batzuek osatuta dago eta, maila txarreneko ICM (3) arinki elkartuak dauden zelula gutxi batzuek. Gainera, blastozistoaren zelulen ratioa trofoektodermoa eta ICM-arentzako 2:1 izaten da (Kang eta lank., 2013).

6. irudian ikusi daitekeenez, *in vivo* tratamenduarekin konparatuta, antz handiagoa dutenak orokorrean Pre-IVM tratamendua izan duten enbrioiak dira. ICM-ko zelulak konpaktatuta ageri dira eta blastozistoaren ertz batean kokatzen dira, ondo identifikatzen delarik. Hala ere, kontrola eta garraiatzailea gehitu zaien medioetan egon diren oozitoetatik heldu diren blastozistoaren tamaina txikia

da eta trofoektodermoa eta ICM ez dira behar bezala bereizten. THC-rekin inkubatu direnatak, aldiz, blastozistoez morfologia egokia erakuste dute, bai ICM eta trofoektodermoa aise desberdintzen direlako baita trofoektodermoak eta ICM-k 2:1 ratioa betetzen dutelako ere.

6. irudia. Sagu prepubereen oozitoak THC-ren presentzian (10^{-7} M) edo ausentzian *in vitro* heldu ondoren eta, IVF egin ondorengo enbrioen kalitatea.



4. Ondorioak

Emaitzek erakusten dute THC fitokannabinoideak sagu oozitoen heltze-prozesua modulatzeko duela eta, horren ondorioz, geroko ernalketan eta enbrioiaren garapena. Are gehiago, badirudi THC fitokannabinoideak baduela eragina, esaterako, heltze prozesuan bai CB1 hartzailaren lokalizazioan baita MAPK eta PI3K/AKT bidezidorretan parte hartzen duten ERK eta AKT proteinen fosforilazio patroiaren ere eta azkenik blastozisto kopuruaren emendioan. Gainera, CB1 eta CB2 hartzailen kanabinoideen gabeziak enbrioiaren garapenean negatiboki eragiten du. Amaitzeko, oraindik eta garapen maila baxuagoa duten oozitoak erabilia hormonarik jaso ez duten sagu prepubereetan ere emaitza hobekak lortu dira THC-ren presentzian heldu direnean.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Interesgarria litzateke kanabinoideen eragin terapeutikoa aztertzen jarraitzea, besteak beste, IVM medioetan osagai gisa erabilia. Gainera, kanabinoide sintetikoekin alderatuta landareetatik eratorria den THC fitokannabinoide naturala erabiltzeko abantaila gehiago eskainiko litzateke. Bestalde, nabarmentzekoa da oozitoen *in vitro* heltzeak ugalkortasun klinikara jo behar duen emakumeen bizikaltatea hobetuko lukeela askoz aukera onuragarriagoa, erosoagoa eta arrisku gutxiagokoa izango litzatekeelako, obarioen estimulaziorako beharrezkoak diren hormonak hartzea ekidinduz litzatekeelako edo behintzat dosia murriztuz litzatekeelako (Söderström-Anttila, et al. 2005). Modu honetan,

ugalketan pausorik arriskutsuena dena saihestuko litzateke, hormona-hartzeak kalte handia eragiten duelako pazientearengan eta albo-ondorio larriak dakartzalako (Cousineau and Domar 2007). Are gehiago, hormonon estimulazioa kontraindikatu dagoen emakumeentzako haurdunaldia lortzeko aukera bakarra izan ahalko litzateke (Söderström-Anttila, et al. 2005). Gainera, beste zenbait pazi ziklo bakoitzeko kostu ekonomikoa ere murriztuko litzateke (Söderström-Anttila, et al. 2005).

6. Erreferentziak

- Agirreagoitia, E, Ibarra-Lecue I, Totorikaguena L, Mendoza R, Expósito A, Matorras R, Urigüen L, eta Agirreagoitia N. 2015. Dynamics of expression and localization of the cannabinoid system in granulosa cells during oocyte nuclear maturation. *Fertility Sterility* 104 753-760.
- Agirreagoitia, E, Totorikaguena L, Exposito A, Mendoza R, Matorras R, eta Agirreagoitia N. 2016. Dynamic of expression and localization of cannabinoid-degrading enzymes FAAH and MGLL in relation to CB1 during meiotic maturation of human oocytes. *Cell and Tissue Research*.
- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* ;26:1270-1283.
- Battista, N, Rapino C, Di Tommaso M, Bari M, Pasquariello N, eta Maccarrone M. 2008. Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Molecular and Cellular Endocrinology* 286 S17-S23.
- Cecconi, S., Mauro, A., Cellini, V., and Patacchiola, F. 2012. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *The International Journal of Developmental Biology*. Bid. 56, 809-817
- Dalton GD, Howlett AC. 2012. Cannabinoid CB1 receptors transactivate multiple receptor tyrosine kinases and regulate serine/threonine kinases to activate ERK in neuronal cells. *British Journal of Pharmacology*. (8):2497-511.
- Devane, WA, L Hanus, A Breuer, RG Pertwee, LA Stevenson, G Griffin, D Gibson, A Mandelbaum, A Etinger, eta R Mechoulam. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258 1946-1949.
- Elsohly MA, Slade D. 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Science*.;78(5):539-48. Review.
- Eppig J.J., Schroeder A.C. & O'Brien M.J. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95 (1), 119-27
- El-Jouni W., Haun S., Hodeify R., Hosein Walker A., Machaca K. 2007. Vesicular traffic at the cell membrane regulates oocyte meiotic arrest. *Development*; 134 (18):3307-15.
- El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC & Konje JC. 2009a. Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS ONE* 4 e4579.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. 1999. Culture and transfer of human blastocysts. *Current opinion in obstetrics and Gynecology*. Jun;11(3):307-11. Review.
- Griffin J, Emery BR., Huang I., Peterson C.M., Carrell D.T.,. 2006. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*. Mar 1;3:2.
- Kang M., Piliszek A, Artus J., Hadjantonakis AK.,. 2013. FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* 140: 267-279.
- López-Cardona, M J Sánchez-Calabuig, P Beltran-Breña N Agirreagoitia, D Rizos, E Agirreagoitia and A Gutierrez-Adán. 2016. Exocannabinoids effect on in vitro bovine oocyte maturation via activation of AKT and ERK1/2. *Society for Reproduction and Fertility*
- Maccarrone, M. 2009. Endocannabinoids: friends and foes of reproduction. *Progress in lipid research* 48 344-354

- Mechoulam, R, S Ben-Shabat, L Hanus, M Ligumsky, NE Kaminski, AR Schatz, A Gopher, S Almog, BR Martin, and DR Compton. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology* 50 83-90.
- Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* , 130 (6):791-9.
- Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Cortvrindt R, Smitz J.2006. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biology of Reproduction*; 74:177–184.
- Peralta L, Agirregoitia E, Mendoza R, Exposito A, Casis L, Matorras R eta Agirregoitia N. 2011. Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 23 372–379 .
- Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida IA y FIV/ICSI 2014. www.registrosef.com
- Rodriguez, KF, and CE Farin. 2003. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction, Fertility and Development* 16 55-67.
- Sánchez F, Smitz J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. Dec;1822(12):1896-912
- Sanchez F, Romero S, De Vos M, Verheyen G, Smitz J. 2015. Human cumulusenclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Human Reproduction*. 30:1396–1409.
- Schindler K. 2011..Protein kinases and protein phosphatases that regulate meiotic maturation in mouse oocytes. *Results and Problem in Cell Differentiation*; 53:309-41.
- Söderström-Anttila, V, S Mäkinen, T Tuuri, and A-M Suikkari. 2005. Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. *Human Reproduction*. 20 1534-1540.
- Sun, Q-Y, and T Nagai. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development* 49 347-359.
- Vanhoutte L, De Sutter P, Nogueira D, Gerris J, Dhont M, Van der Elst J.2007. Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Human Reproduction*; 22:1239–1246.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau UPV/EHUko Medikuntza eta Erizaintzako Fakultateko Fisiologia Sailean eta Bruselako *Vrije Universiteit Brussel* unibertsitateko laborategian burutu da. Euskal Herriko Unibertsitateak emandako beka bati esker egiten ari den tesi batetik eratorritako aurretiazko emaitzak dira.

Ikertaldea hainbat alorreko ikertzaileek osatzen dute. Ikertaldea osatzen duen kideetarik bat Lide Totorikaguena doktoretza aurreko ikaslea da eta UPV/EHUko Medikuntza eta Erizaintza Fakultateko Fisiologia Saileko ikerketa-laboretegi batean dabil 2012. urtetik aurrera. 2014. urtean Ikerketa Biomedikoa masterra amaitu eta hortik aurrera Ekaitz Agirregoitia eta Naiara Agirregoitia doktoreen zuzendaritzapean dihardu tesia egiten. Tesian zehar Bruselako *Vrije Universiteit Brussel* unibertsitateko laborategian egon da estantzia bat egiten, Follicular Biology Unit ikerketa taldearekin, hain zuzen. Lan honetan lagundu duten beste ikerlariak, besteak beste, Estibaliz Olabarrieta doktoregaia, Naiara Agirregoitia Doktorea eta Ekaitz Agirregoitia Doktorea dira.