



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Sistema kannabinoidearen
funtzioa sagu oozitoen heltze-
prozesuan, ernalketan eta
enbrioaren garapenean**

Lide Totorikaguena Iturriaga

168-177 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.23>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



Universidad
de Navarra

Sistema kannabinoidearen funtzioa sagu oozitoen heltze-prozesuan, ernalketan eta enbrioiaren garapenean

Totorikaguena, Lide; Olabarrieta, Esti; Agirregoitia, Ekaitz; Agirregoitia, Naiara; López-Cardona, Ángela Patricia.

Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Sarriena auzoa, Leioa-48940, Bizkaia.

lide.totorikaguena@ehu.eus

Laburpena

Gaur egun, gero eta gehiago dira ugalketa tekniken beharra dutenak haurdun geratu ahal izateko bai ugalkortasunarekin lotutako arazoak emendatu direlako baita familia ereduak aldatu direlako ere. Zorritzarez, oraindik zailtasunak daude lagundutako ugaltze-tekniken bidez haurdunaldia lortzeko. Teknika horien artean badago berebiziko garrantzia duena oozittoa ernaldia izateko: oozitoen in vitro heltzea (IVM). Gutxi erabiltzen den teknika da oraindik bestelako tekniken emaitzen arrakastara heldu ez delako. Hala ere, hainbat emakumerentzat oso aukera aproposa izan liteke eta beste zenbaitentzat haurdunaldia lortzeko aukera bakarra. Oozitoaren heltze-prozesuan lagungarriak izan litezkeen ligando interesgarri batzuk kannabinoideak ditugu: haiek eragiten duten seinaleztapena eta oozitoen heltze-prozesua hasteko gertatu behar den seinaleztapena berdina delako. Horregatik, egokia ikusi dugu kannabinoideen erabilera terapeutikoa aztertzea IVM medioen eraginkortasuna hobetzeko. Horretarako, gure ikerketa taldeak sistema kannabinoidearen funtzioa aztertu du sagu oozitoen heltze-prozesuan, ernalketan eta enbrioiaren garapenean eta baieztatu dugu haren parte-hartzea; ez hori bakarrik, izan ere, THC fitokannabinoideak oozitoen heltze-prozesua modulatzeko duela ikusi dugu.

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

Abstract

Every year, the amount of couples using assisted reproduction techniques to get pregnant, due to the increase of fertility problems and the changes in family patterns, is increasing. Even though, the application of reproduction techniques still finds multiple difficulties. Among these techniques there is one of vital importance to ensure the fertilization of the oocyte: the in vitro maturation of oocytes (IVM). This technique is less used than others because of its poor success. However, it is a good option for several women and, in some cases, the only chance to get pregnant. Cannabinoids could be interesting ligands to improve oocyte maturation, as cannabinoid's molecular pathway is similar to the one by which oocyte's meiosis resumption is activated. Therefore, we consider the analysis of therapeutic use of cannabinoids useful to improve the efficiency of IVM media. 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.

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. Gure gizartean gero eta ohikoagoa da seme-alabak berandu izatea (Jose-Miller eta lank.,2007). Gero eta arruntagoa den amatasun eta aitatasun berantiar horrek zelula germinalen kalitatean eragina du, horregatik, zelula germinalen kalitatea hobetuko duen kanpo-laguntzaren beharra handituz doa. Laguntza berdina eska dezakete arruntagoak diren familia monoparentalek edota bikote homosexualek (Díez eta lank., 2007; Sánchez Morales, 2007) izan ere, normalean ugalkortasunik eza ez duten pertsonak izanda, IVM izango litzateke hormona jaso behar ez izateko aukerarik onena. Bestalde, obario polikistikoa deituriko gaitza jasateko probabilitatea % 3tik % 7ra igo da azken urteotan eta paziente horientzako hormonon estimulazioa kontraindikatu dago (Eilertsen, 2012). Bukatzeko, azken hamarkadatan % 1,5 igo da ugaltze-aldian dauden emakumeen minbizia izateko arriskua (Rodriguez-Wallberg eta Oktay, 2014), hortaz, hormona tratamenduetarako denborarik ez dagoen kasuetarako ere IVM izango litzateke teknikarik egokiena. Baina, oraindik, IVM teknika berria da eta, duen arrakasta txikiagatik eta haren inguruan dagoen ezjakintasunagatik, gutxi erabiltzen da. Oozitoen *in vitro* heltzean, pazienteari hormonekin estimulatu gabeko obarioetatik edo estimulazio txikia jaso duten obarioetatik, heldu gabeko oozitoak erauzten zaizkio eta hazkuntza-medioetan heltzen dira.

Ugaztun emeean, oozitoak obulutegiko folikuluetan sortzen dira. Enbrioi emeen obulutegietan, oozitoak lehenengo meiosiaren profasean daude geldituta eta seinale zehatzak jasotzen dituzten arte ez dira berpizten bigarren fase meiotikora heltzeko, meiosisiko 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 meiosisitik (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 (Rodriguez 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 hartzaille 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. Beraz, hipotetiza daiteke meiosiaren heltze-prozesua indusituko lukeen hartzaileren bat egotea (GPCR-Gi dena) (Mehlmann, 2005) baina ez dira ondo ezagutzen zeintzuk izango liratekeen haien ligandoak. Oozitoaren heltze-prozesuan lagungarriak izan litezkeen ligando

interesgarri batzuk kannabinoideak izan daitezke: haiek eragiten duten seinaleztapena eta oozitoen heltze-prozesua hasteko gertatu behar den seinaleztapena berdina delako.

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). Barne-sistema kannabinoidea osatzen dute kannabinoide-hartzaileek, euren barne-estekatzailak (barne-kannabinoideak) eta sintesi eta degradazio entzimek. Gorputzeko barne-kannabinoideen artean, N-arakidonoleitolamina (anandamida; AEA) (Devane eta lank., 1992) eta 2-arakidonoleitolglizerola (2-AG) (Mechoulam eta lank., 1995) dira ezagunenak eta konposatu horiek CB1 eta CB2 hartzaileetara lotzen dira. CB1 eta CB2 hartzaileak G proteina inhibitzaileei loturiko hartzaileak dira eta mintz plasmatikoa zeharkatzen duten 7α -helizez osatuta daude. Egin diren ikerketa urriek frogatzen dute kannabinoideak heltze-prozesua modulatu lezaketela: alde batetik, anandamida (AEA) barne-kannabinoidearen kontzentrazioa emendatuz doa likido folikularrean giza oozitoen heltze-prozesuan (El-Talantini eta lank., 2009). Beste alde batetik, gure ikerketa-taldeak sistema kannabinoidea deskribatu du giza oozitoetan eta granulosestan meiosiaren berraktibazioan, era berean, oozitoen heltzean kannabinoide-hartzaileen lokalizazioan aldaketak daudela baieztatu dugu. (Peralta eta lank., 2011, Agirregoitia eta lank., 2015, Agirregoitia eta lank., 2016).

2. Arloko egoera eta helburuak

Sistema kannabinoidea ugalkortasunean inplikaturik dagoela ikusi da: gametogenesisian, ernalketan, enbrioiaren ezarpenean, plazentazioan, haurdunaldian eta erditzean (Battista, eta lank. 2008, Maccarrone 2009) eta sistema kannabinoidean parte hartzen duen makinaria guztia ugaltzeko organo, ehun eta zeluletan dagoela frogatu da. Gure taldeak, hala nola, sistema kannabinoidea bai giza oozitoetan eta granulosestan (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 heltzean 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 heltzean eta zer nolako eragina duten ernalketan. Gainera, CB1 eta CB2 hartzaileentzako knockout (KO) saguen sorrerak kannabinoideen seinalizazioaren eraginari buruzko informazio gehiago lortzeko aukera eskaini digu.

Aurrekariak kontutan hartuta, gure ikerketa lanean aurrera egiteko, alde batetik, sistema kannabinoidearen fisiologia aztertzeko, CB1 eta CB2 hartzaileen faltak obulutegietan eta oozitoetan zer eragina duen ikustea izango da. Bestalde, analizatuko dugu zer nolako eragina duen THC fitokannabinoidearen inkubazioak oozitoen *in vitro* heltzean geroko ernalkuntza eta enbrioiaren

garapena aztertuz, interesgarriagoa baita kannabinoide sintetikoekin baino kannabinoide naturalekin lan egitea etorkizunean gizakiekin entsegu klinikoak egiterako orduan.

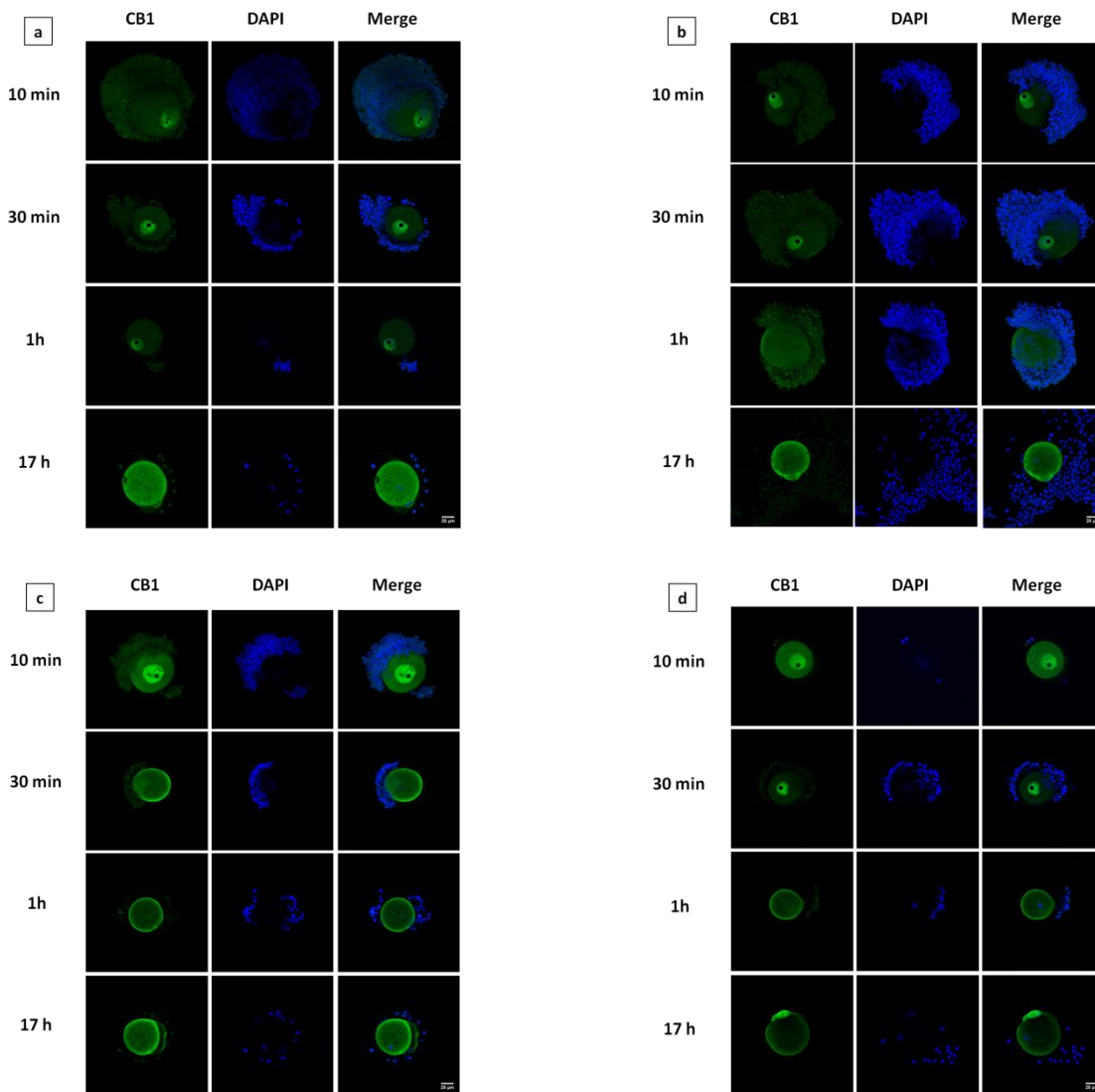
Helburu espezifikoak, beraz, hauek izango dira:

1. Heltze-medioan THC gehitzailearen CB1 hartzailearen adierazpenaren eta lokalizazioaren dinamika aztertzea saguen oozitoen *in vitro* heltze-prozesuaren etapa bakoitzean.
2. Oozitoen heltze-medioan THC fitokannabinoidea gehitzailearen, IVF geroko enbrioi kopuruan eragina aztertu sagu-oozitoen *in vitro* madurazioan.
3. CB1 eta CB2 hartzaileen faltak duen eragina folikulogenesian.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

3.1 CB1 hartzailearen adierazpenaren eta lokalizazioaren dinamika saguen oozitoen *in vitro* heltze-prozesuan THCren presentzian

CB1 hartzailea saguen oozitoetan meiosiaren berraktibazioa gertatzen den bitartean presente dagoela frogatu da. Barne kannabinoideen rola ulertzeko oozitoen heltzean, CB1 hartzailearen presentzia aztertu da oozitoen heltze-prozesuan THC kannabinoidearekin *in vitro* heldu ondoren. López-Cardonak eta gure taldekideek (2016) behi emearen oozitoetan frogatu zuten HU-210 eta THC heltze-medioan gehitzailearen oozitoen madurazio nuklearraren abiadura aldatzen zela, GVtik MI fasera azkarrago pasatuz. Saguekin egindako esperimenduetan ere efektu berdina ondorioztatu dugu, hau da, kannabinoideek *in vitro* heldutako oozitoen meiosiaren berraktibazioa indutzten dutela (1. irudia).



1. Irudia. CB1 hartzailearen immunolokalizazioa sagu-oozitoen madurazio nuklearrean a) DMSOekin b) THC 1 μM -eko kontzentrazioarekin c) THC 100 nM-eko kontzentrazioarekin eta d) THC 10 nM-eko kontzentrazioarekin hainbat denbora tartetan *in vitro* heltzean: 10 min, 30 min, 1h eta 17h. CB1 hartzailearen distribuzioa, berdez. Hoechst DNA-markatzailea, urdinez. Erreferentzia barra: 20 μm .

Aztartzeko kanpo kannabinoideek oozitoen madurazio nuklearrean eraginik daukaten, oozitoak hainbat denbora tartetan fixatu genituen (10 minutu, 30 minutu, ordu 1 eta 17 ordu) THC goranzko kontzentrazioekin *in vitro* heldu ondoren. Oozitoen fase nuklearrak sailkatu ziren, hurrenez hurren, GV, MI eta MII faseak. 10 minututan oozito guztiak GV fasean zeuden eta *in vitro* madurazioa egin eta ordu batera, THC gehitu zen baldintza guztietan oozito gehienetan besikula germinala apurtuta zegoen kontrolarekin alderatuta (1. irudia). Hala ere, desberdintasunak agertzen ziren tratamendu bakoitzean eta ikusi zen THC 100 nM kontzentrazioarekin arinago irteten zela oozittoa GV-tik, 30 minututan jada ez zelako ikusten besikula germinala (1. irudia c), nahiz eta, esan bezala, gainontzeko kontzentrazioetan -THC 1 μM -eko kontzentrazioarekin (1. irudia b) eta THC 10 nM-eko kontzentrazioarekin (1. irudia d)- kontrola (1.irudia a) baino lehen ateratzen ziren GV-tik. Beraz, esan

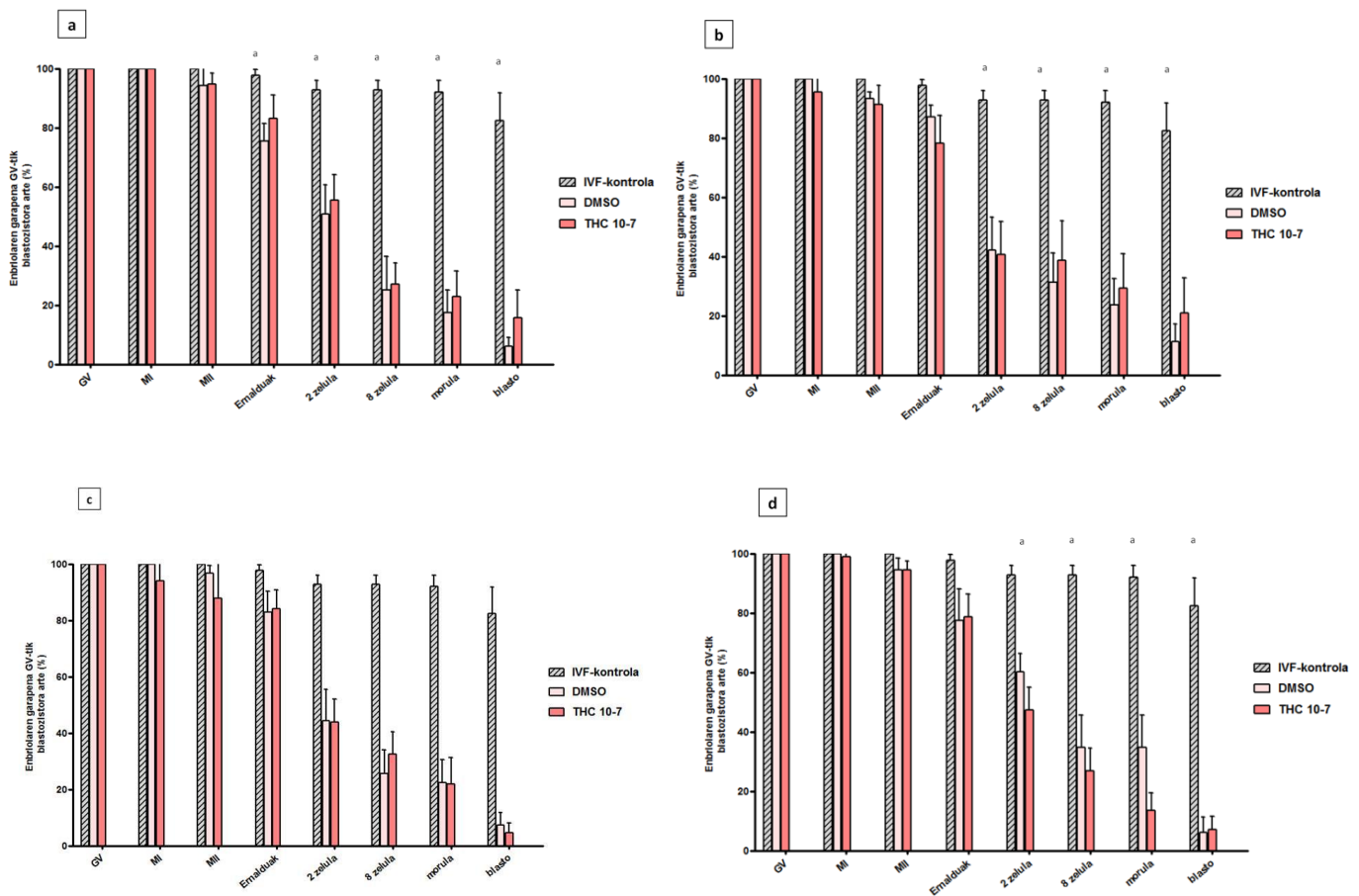
daiteke THCK laguntzen diola oozitoari meiosiaren geldiuetik irteten eta 100 nM-ko kontzentrazioa izango da optimoa *in vitro* heltzen diren oozitoen meiosiaren berraktibaziorako.

3.2 THC fitokannabinoidearen eragina oozitoen *in vitro* heltzean geroko *in vitro* ernalkuntza eta enbrioien garapena aztertuz

Ikusita THC fitokannabinoidearen 100 nM (edo 10^{-7}) kontzentrazioa erabilia oozitoen heltze-prozesuan meiosis azkarrago berraktibatzen zela, THC 100nM-ekin kontaktuan egon diren oozitoen heltze-tasa ikusi zen. Oozito horiekin *in vitro* ernalkuntza egitean, heltze-fase bakoitzera heldu ziren oozitoak eta enbrioien garapen goiztiarreko fase desberdinetara heldu zirenak kuantifikatu ziren (2. irudia).

Saguetan, *in vivo* heldu diren oozitoen heltze-fase zein IVF geroko enbrioi-fase guztietan % 80tik gora mantendu dira eta horrek erakusten du *in vitro* ernalkuntza ondo eginda dagoela (2. irudia). Oozitoak *in vivo* heltzean emaitzak askoz hobekak direla ikus daiteke, blastozistora enbrioi gehienak heltzen direlako baina, *in vitro* heldu diren oozitoetan, ernaldutako zelulen beharrezkoak eta blastozistoen kopuru urria nabarmenak dira, espero bezala (Epigg J.J. eta lank. 1992). Hala ere, adierazgarria ez izan arren, THCrekin (100 nM) heldutako *wild type* saguetan gorakada bat ikusi zen ernaldutako zeluletan fitokannabinoide gabe inkubatutako oozitoekin alderatuta (2. irudia a) eta, blastozistora heltzen direnen portzentajea baxua izan arren, THCrekin *in vitro* heldutakoetan handiagoa da THC gabe inkubatutakoekin konparatuz gero (2. irudia a). CB1 hartzailarentzako *knockout* (*Cnr1^{-/-}*) saguen oozitoekin egindako inkubazioetan aldiz, THCrekin tratatu direnen artean, askoz gutxiago heldu dira blastozistora izatera *wild type* motako sagu oozitoekin alderatuta (2. irudia b). Baliteke horrek adieraztea CB1 hartzaila falta denean arazoren bat egon litekeela oozitoen heltzean, eta beraz, madurazio nuklearra ez dela efizientea izan, ez direlako ondo pasatu MII fasera ernaldutakoak izan daitezkeen. Hala ere, hipotesi hau aztertu beharko litzateke.

Beste alde batetik, CB2 hartzailarentzako *knockout* (*Cnr2^{-/-}*) saguen oozitoekin egindako inkubazioetan (2. irudia c), THCrekin inkubatutakoetatik oso gutxi heldu dira blastozistora. Pentsa genezake, CB2 hartzaila garrantzitsua dela THC fitokannabinoideak lagundu dezan enbrioien garapenean, CB1 hartzailarekiko eta CB2 hartzailarekiko *knockout* (*Cnr1^{-/-}Cnr2^{-/-}*) saguen oozitoak erabili direnean ere, THC gehitu denean heltze-mediora ez delako eraginik egon *in vitro* ernalkuntzan (2. irudia d).



2. irudia. a) *wild type*, b) *Cnr1^{-/-}*, c) *Cnr2^{-/-}* eta d) *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* genotipoa duten saguen oozitoak THC-ren presentzian (10⁻⁷ M) *in vitro* heldu ondoren lortzen diren oozito kopurua: besikula germinala (GV), metafase I (MI), metafase II (MII); eta, IVF egin ondorengo enbrioi-garapeneren etapa bakoitzeko kopurua: ernaldutako oozitoa (ernaldutako), 2 zelulako enbrioia (2 zelula), 8 zelulako enbrioia (8 zelula), morula eta blastozistoa (blasto). *In vivo* heldutako oozitoak erabili dira IVF kontrolaren enbrioiaren garapena ikusteko (marradun barrak). *In vitro* heldutako oozitoen kontrola THC gehitu gabe baina garraiatzailea (DMSO) gehituta egin da (barra arrosak). Azkenik, THC 10⁻⁷ M-eko kontzentrazioarekin *in vitro* inkubatu diren oozitoak agertzen dira (barra gorriak). n=5. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a): p<0.001 izanik.

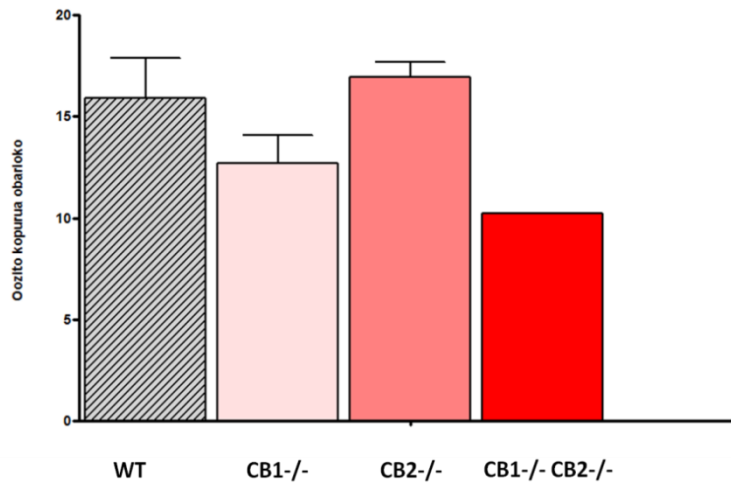
Esanguratsua ez den arren, *wild type* saguetan, THCekin inkubatutako oozitoetan tendentzia bat dago blastozistora heltzen direnen portzentajea emendatzeko orduan eta horrek esperimendu gehiago egitea eskatzen digu, baieztatzeko tendentzia hori zoriaren eraginez izan daitekeen edo benetan THC fitokannabinoideak kontzentrazio horretan paper garrantzitsua duen.

3.3 CB1 eta CB2 kannabinoide hartzaileen faltaren eragina folikulogenesisian

Jakinda CB1 hartzaileak eta CB2 hartzaileak oozitoen heltze-prozesuan parte hartzen dutela, oozitoen sorreran edota folikulogenesisian ere eragina badaukaten frogatu nahi izan dugu.

IVM zein IVF teknikan oozitoak eskuratzeko obuluak orratz batekin urratzen dira heltze-medioetan inkubatzeko jarri aurretik. Baina sagu anduiaren arabera eskuratzeko ziren oozitoen kopurua

oso desberdina zen eta CB1 hartzailea falta zitzaien sagu anduietan oozitoen batez bestekoa jaisteko tendentzia ikusi zen (3. irudia)



3. irudia. Genotipo desberdineko saguen oozito kopurua obarioko. *Wild type* sagu anduia (marradun barra), *Cnr1^{-/-}*, (barra arrosa) *Cnr2^{-/-}* (barra gorri argia) eta *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* (barra gorria). n=16.

Nahiz eta oozitoen kopurua CB2 hartzailearentzako *knockout* saguena altuagoa izan *wild type* motako saguekin alderatuz, benetan erreparatzen badiogu oozitoen *in vitro* ernalkuntza egiteko behar diren oozitoen kalitateari, oozito “on” edo maduragarrien kopurua estatistikoki adierazgarriagoa da *wild type* motako saguetan CB1 hartzailea falta zaien sagu anduiekin alderatuta (taula 1). Esan daiteke, hortaz, CB1 hartzaileak oozitoen folikulogenesian parte hartzen duela eta CB2 hartzaileak ere lagundu zezakeela, bi hartzaileak falta diren saguetan bai oozito kopuru totala bai kalitate oneko oozitoen kopurua urriagoa baita (taula 1).

Taulara 1. Genotipo desberdineko saguen mota desberdineko oozito kopurua obarioko. *Wild type* sagu anduia (marradun barra), *CB1* edo *Cnr1^{-/-}*, (barra zuria) *CB2* edo *Cnr2^{-/-}* (barra arrosa) eta *KOKO* edo *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* (barra gorria). n=16. Tratamenduen arteko desberdintasun esanguratsuak letrekin adierazita daude (a,b,c): p<0.05 izanik.

	Konpaktatuak	Biluziak	Maduragarriak	Hilak
WT	3,58 ± 0,63 ^{ab}	3,06 ± 0,39	10,80 ± 1,19 ^a	2,50 ± 0,00 ^a
CB1	4,67 ± 0,94 ^b	3,31 ± 0,53	7,42 ± 1,05 ^b	0,63 ± 0,13 ^b
CB2	4,17 ± 0,22 ^b	2,61 ± 0,28	9,67 ± 0,87 ^{ab}	0,75 ± 0,09 ^b
KOKO	1,5 ± 0,09 ^a	2,0 ± 0,0	5,50 ± 0,27 ^b	1,25 ± 0,18 ^c

4. Ondorioak

Egindako ikerketetan ikusi da sistema kannabinoideak funtzio garrantzitsua betetzen duela sagu oozitoen heltze-prozesuan, ernalketan eta enbrioiaren garapenean eta, zehazki, THC fitokannabinoideak baduela eragina oozitoen heltze-prozesuan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunerako kannabinoideen erabilera terapeutikoa aztertzen jarraitzea interesgarria litzateke, besteak beste, IVM medioetan osagai gisa erabilita. Azpimarratu 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 farmakoak hartzea ekidingo litzatekeelako edo behintzat dosia murriztuko litzatekeelako (Söderström-Anttila, et al. 2005). Modu honetan, ugalketan pausorik arriskutsuena dena saihestuko litzateke, hormona-hartzeak desgaste handia eragiten duelako pazientearengan eta albo-ondorio larriak dakartzalako (Cousineau and Domar 2007). Gainera, 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 Tissue Res.*
- Battista, N, Rapino C, Di Tommaso M, Bari M, Pasquariello N, eta Maccarrone M (2008). Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Mol Cell Endocrinol* 286 S17-S23.
- Cousineau, TM, eta AD Domar (2007). Psychological impact of infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 21 293-308.
- 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.
- Díez, Marta; Jiménez, Irene; Morgado, Beatriz; (2007). Maternidad en solitario por elección en España. IX Congreso Español de Sociología. Grupo de Trabajo 03. Barcelona
- Eilerstsen TB, Vanky E, Carlsen SM. (2012). Increased prevalence of diabetes and polycystic ovary syndrome in women with history of preterm birth: a case-control study. *BJOG*;119(3):266-75.
- 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.
- 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

IkerGazte, 2017

- 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.
- 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.
- Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. (2014). Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines. *Cancer Manag Res.* 2014; 6: 105–117.
- Sánchez Morales, M^a.R. (2007) Los impactos de la biotecnología humana sobre las familias. Tendencias de evolución en el nuevo siglo. En:Escenarios del 481nuevo siglo. Noveno Foro sobre tendencias sociales, pp. 127-150. Madrid, Editorial Sistema.
- Schindler K. (2011). Results Probl Cell Differ 2011; 53:309-41. Protein kinases and protein phosphatases that regulate meiotic maturation in mouse oocytes. *Results Probl Cell Differ*; 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. *Hum Reprod* 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.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau UPV/EHUko Medikuntza eta Erizaintzako Fakultateko Fisiologia Sailean 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-laborategi batean dabil 2012. urtetik aurrera. 2013. urtean biologian graduatu zen Euskal Herriko Unibertsitatean eta ikasketen tarte horretan, 2011n zehazki, Liejako (Belgika) Unibertsitateko laborategi baten aritu zen ikertzen, Centre of Protein Engineering / Centre d'Ingénierie des Proteines (CIP) departamentuan hain zuzen. 2014. urtean Ikerketa Biomedikoa masterra amaitu eta Ekaitz Agirregoitia eta Naiara Agirregoitia doktoreen zuzendaritzapean dihardu tesia egiten. Lan honetan lagundu duten beste ikerlariak, besteak beste, Esti Olabarrieta doktoregaia, Ángela Patricia López-Cardona Doktorea, Ekaitz Agirregoitia Doktorea eta Naiara Agirregoitia Doktorea dira.