

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Fisiología Animal



TESIS DOCTORAL

**Función del sistema cannabinoide en maduración de ovocitos,
fecundación y desarrollo embrionario en mamíferos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ángela Patricia López Cardona

Directores

**Alfonso Gutiérrez Adán
Ekaitz Agirregoitia Marcos**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Fisiología Animal



FUNCIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE EN MADURACIÓN DE OVOCITOS, FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO EN MAMÍFEROS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ángela Patricia López Cardona

Madrid, 2016

DIRECTORES:

Alfonso Gutiérrez Adán
Ekaitz Agirregoitia Marcos



Los doctores Alfonso Gutiérrez Adán y Ekaitz Agirregoitia Marcos, Investigadores Titulares del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), respectivamente, hacen constar:

Que la memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Zootecnia Ángela Patricia López Cardona, con el título: **“Función del sistema cannabinoide en maduración de ovocitos, fecundación y desarrollo embrionario temprano en mamíferos”**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que tras su revisión consideramos que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, 27 de Junio 2016

Fdo.: D. Alfonso Gutiérrez Adán

Fdo.: D. Ekaitz Agirregoitia Marcos

Los trabajos realizados para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se llevaron a cabo en el Departamento de Reproducción Animal del INIA financiados por los proyectos AGL2009-11358, (Ministerio de Ciencia e Innovación, España) AGL2012-39652-C02-01 (Ministerio de Economía y Competitividad, España) GIU14/26 (Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, España)

Ángela Patricia López Cardona fue financiada gracias a la beca pre doctoral Francisco José de Caldas del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS, Convocatoria 512, Colombia

A mi familia

A Guillaume

Agradecimientos

Agradecimientos

Siempre escribir la tesis nos lleva con gran ilusión escribir este apartado de agradecimientos, porque solo cuando finalizas te das cuenta que no es solo un trabajo de la doctorando en cuestión y sus directores, es una suma de todos los que han aportado un granito de arena durante estos 4 años; no solo en la parte académica y científica, sino también en lo personal.

A mis directores que han hecho posible la realización de este trabajo.

A **Alfonso**, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio para cumplir este gran sueño, por transmitirme durante estos años tus enseñanzas y sabiduría en el mundo de la ciencia. Has sido ejemplo de disciplina, dedicación y eficiencia, me has enseñado que con arduo trabajo todo puede ser posible. En lo personal gracias por tu comprensión y paciencia en tantos momentos. Al terminar esta etapa y mirar hacia atrás comprendo muchas de las cosas que he aprendido bajo tu dirección. Me llevo la mochila llena de grandes aprendizajes académicos, científicos y personales.

A **Ekaitz**, llegaste para enseñarme el mundo cannabinoide y a ver las cosas desde una visión diferente. Gracias por haber confiado en mí desde el primer momento para desarrollar este trabajo. Me has enseñado que paso a paso vamos avanzando y alcanzando la meta que nos proponemos, y aunque en el mundo científico sea un poco más difícil con perseverancia se irán viendo los frutos de nuestro trabajo. En lo personal agradecerte el acompañamiento que me has brindado durante las diferentes etapas de esta tesis. Me llevo muchos conocimientos de este periodo y te agradezco enormemente que hayas aportado tanto desde lo académico y lo personal.

A todo el personal del **INIA**, porque ha sido un placer trabajar en un ambiente así:

A **Dimitrios**, por tu apoyo en el laboratorio de bovino para desarrollar parte de mis experimentos, por estar siempre dispuesto a ayudar en la escritura y revisión de mi trabajo, y por supuesto agradecerte tus ricas cenas griegas que quedarán grabadas en nuestras mentes y paladares. A **Pablo**, gran ejemplo de dedicación y entrega en este mundo de la ciencia, gracias por permitirme usar tu laboratorio y por estar siempre dispuesto a resolver cualquier duda del mundo molecular. A **Miguel**, por las enseñanzas del mundo de los ratones, por mostrar tanto entusiasmo en todo lo que haces, por los regalitos laboratorianos y las mañanas de música que animaban el trabajo en el labo.

A mis compañeros y amigos del INIA. A **Pris**, porque llegue para convertirte en princesa cuando ya lo eras, porque todo lo que representas es hermoso, gracias por tu ternura, tu entusiasmo, por convertirte en mi amiga y mi familia desde el primer momento. Por todos los momentos vividos dentro y fuera del labo. Por las tardes súper divertidas de bailes, los viajes, por ser la mejor comensal, por estar en cada momento presente y por toda tu ayuda en esta última etapa que para mí ha sido fundamental. A **Vero**, mi bubusita solo tengo palabras para decirte gracias, pero espero algún día poder hacerlo con más que palabras, has sido un apoyo inmenso desde el primer momento y mi refugio en muchas ocasiones, gracias por siempre estar dispuesta a ayudarme, jamás olvidaré todo lo que hemos compartido y sin importar donde nos sitúe el futuro para mí estarás siempre presente. A la princess **Yosu**, tu positivismo y forma de ver el mundo nos contagia a todos, y hasta en los momentos más duros has sabido sacar una sonrisa, te admiro demasiado, eres de las personas más fuertes que conozco y te agradezco de corazón todo lo que me has enseñado, gracias por estar siempre pendiente en especial en la recta final ;). A **Jorgea**, porque tu paso por aquí ha dejado huella, solo tengo palabras de agradecimiento para ti y mis mejores deseos para ti y tu familia.

A **Raúl**, compañerito, parcerito y jefecito en mis inicios; el tiempo pasa y nos hacemos grandes, pero tú sigues ahí con tu buen rollo desde el primer momento ;), gracias por transmitir la tranquilidad que muchas veces necesitaba, por los cafés robados y los pandas de cada mañana, por regalarme tus conocimientos del mundo de la micromanipulación y ayudarme en todo y más en el labo. A **Ricardo**, gracias por estar dispuesto a enseñarme desde el primer momento, por ser el ente integrador de tantas cosas que seguramente

no serían lo mismo sin ti, por promover los festivales gastrovómitos, los concursos de brownies y tortillas. A **Eva**, por estar siempre dispuesta a echarme una mano cuando hiciera falta, por enseñarme tanto en la PCR, la congelación, las células, pero sobre todo gracias por ser siempre tan buena consejera. A **Sandra**, gracias por el tiempo compartido en el labo, en especial las risas porque contigo nunca faltan en el labo y en los animados desayunos. A **Celia**, por la compañía en esos días de salir tardecito, por los momentos compartidos dentro y fuera del labo. A **Noelia**, por enseñarme el mundo de las bacterias, gracias por tus ganas y buena disposición a la hora de trabajar, ha sido un placer compartir contigo este espacio en el labo y recuerda ser siempre positiva y si hace falta cómete una manzana para recordarlo ;). A **Serafin**, gracias por llegar con una sonrisa y ese gran positivismo para hacer de todo, ha sido un placer trabajar contigo, muchas gracias por las palabras de ánimo y los buenos deseos.

A **Toñi** por siempre estar tan pendiente de esta ratoncita, por toda tu ayuda y todo lo que me has enseñado en esa tarea que es llevar el animalario. A **Eva, Victor y Vladi**, por todo el trabajo del animalario, mil gracias.

A nuestros compañeritos de bovino **Paula, Meriem, Carol, Bea, Richard y Valeriano**, por la ayuda en el momento oportuno y por compartir nuestras comidas como momento de esparcimiento.

A **Virginia** por estar siempre dispuesta ayudarme, por los hermosos dibujos y atesorar bonitos recuerdos (ovejita). A los pequeños argentinos **Vanesa y Daniel**, porque a pesar de estar tan corto tiempo les he tomado un cariño impresionante, espero que sigamos en contacto y mil gracias por vuestro apoyo en la distancia.

A la nueva generación de los pollitos, **Sandra, David, Benjamín, Alejandro e Ismael**, porque han traído la mejor energía para que en esta casa se siga formando a la próxima generación de doctores con gran potencial humano y académico, mucha suerte a todos y mis mejores deseos en la carrera que hoy están comenzando.

A los “Pacerditos”

A **Beto**, en muchos momentos tus palabras han sido decisivas, las recordaré siempre como grandes consejos, gracias porque siempre estás dispuesto a escuchar y dar ese empujón que se necesita, gracias por abrirme las puertas de tu casa y brindarme el apoyo que necesitaba para finalizar esta etapa. **Marianita** bonita, mil gracias a ti por la compañía durante estos años, por dar tu toque chic a nuestras salidas, por llevarme a descubrir Madrid, gracias por compartir tantos buenos momentos con Gui y conmigo. A **Coia**, la jefecita que fue la culpable de nuestra época bailable, porque lo animabas todo, aunque los tiempos cambian los recuerdos quedan y han sido maravillosos los recuerdos que nos deja aquel verano bailable. A **Amaia**, por ser una compi de piso estupenda deseo de todo corazón que la vida te siga sonriendo como hasta ahora.

Y regresando a los orígenes...

A **Martha Olivera**, por iniciarme en el mundo de la investigación, permitirme dar mis primeros pasos y ayudarme a dar grandes saltos, sin su apoyo esta etapa que hoy termino ni siquiera se hubiese iniciado, gracias por todas las enseñanzas y por apostar por esta su alumna que le estará eternamente agradecida.

A aquellos que fueron determinantes en algún momento de este proceso, **Luis Miguel**, por abrirme la visión de ese mundo científico cuando todavía no era consciente de lo que podría llegar a ser. A **Leo** porque creíste en mí y en que podía llegar a hacerlo, hoy me gustaría compartir este logro contigo.

A **Ariel**, mi Ari y aunque a ti te debo toda mi formación inicial de laboratorio, lo que más te agradezco es lo que me has enseñado a nivel personal, gracias por tu apoyo incondicional, por ser mi hermano mayor en mérito y mi maestro en tantos aspectos, por ayudarme a ser más fuerte cada día.

A mis amigos de la UdeA los que siempre estuvieron presentes sin importar la distancia. A **Andrés**, por estar siempre pendiente y por esa inyección de energía a mitad del camino, fue un placer compartir contigo parte de esta aventura. A **Luisa, Diana, Violeta, Juliana y Andrey**, porque a pesar de rodar por el mundo

no nos ha faltado la comunicación y les agradezco enormemente, que a pesar que el tiempo pasará seguimos en contacto, a cada uno mil gracias por estar pendientes siguen siendo mi polo a tierra y espero que en algún momento podamos reunirnos nuevamente.

A **Fabi**, porque te convertiste en una de las personitas más importantes de mi vida, porque durante todos estos años has hecho que no me sienta sola, gracias por todos los momentos vividos y las enseñanzas, gracias por la más fuerte de las amistades que ha traspasado el tiempo y la distancia, porque cada paso de mi vida necesitará siempre de tu sabio consejo. Gracias a **Doña Ana, Don Ramón y Ana** por convertirse en mi segunda familia, por su apoyo durante tantos años y por seguir pendiente de mis pasos a pesar del tiempo y la distancia.

A **Ale**, mi parcerita del alma, tengo tanto que agradecerte a ti que unas líneas serán pocas, porque si existe alguien que conozca cada paso de mi vida eres tú, eres la testigo principal de donde nace cada uno de mis sueños y mis historias, solo tú podrías describir y plasmar lo que ha sido cada tramo de mi vida. Describes a la perfección la palabra incondicional, gracias por ser mis manos en la distancia porque solo a ti te he confiado el cuidado de los míos en los momentos más duros y sin tu apoyo y ayuda durante estos años hubiese sido imposible llegar al final. El camino es largo pero la única certeza que tengo es que cuando llegemos al final serás la persona que estará siempre presente.

A mi familia, infinitas gracias por el apoyo constante a pesar de la distancia. A mi madre **Gloria**, el ser más especial en mi vida, madre lo que soy como persona es gracias a ti, a tu amor constante, dedicación y fuerza, porque juntas soportamos las más duras tormentas, tu apoyo incondicional ha sido fundamental para afrontar cada momento difícil en mi vida y alcanzar las metas que me he propuesto, gracias mil gracias por creer siempre en mí, mi ángel. A mi padre **Gilberto** porque sembraste en mí todos los valores que se necesita para ser una buena persona, y porque a pesar de ser hombre de pocas palabras, me has dado tu cariño incondicional y tu apoyo en todas las decisiones que he tomado. A mi hermano **Carlos**, porque con dedicación conseguiremos lo que nos proponíamos, gracias por creer y confiar en tu pequeña hermana, porque me has apoyado en cada decisión y me alientas a seguir adelante. **A mi princesa Luciana**, porque no verte crecer y disfrutar de todas tus travesuras ha sido el precio más caro que he pagado por cumplir este sueño, espero poder recompensarte en un futuro y que algún día puedas entender mi ausencia durante estos años.

A la **famille Soonekindt, Claire, Baptiste, Clément, Mamie-doux, Sarah et Florent** pour m'ouvrir les portes de votre foyer et me faire sentir partie intégrante de votre famille, malgré la distance et la barrière de la langue. Mille mercis pour tous les moments vécus, les dîners, les voyages, les photos, les noëls, le football sur la plage et les soirées de jeux à la maison. Merci particulièrement à **Carole et Eric** pour leur soutien constant et les encouragements à persévérer. J'accorde une grande valeur à l'unité familiale que vous avez construite et j'espère avoir le privilège de continuer à en faire partie.

A **Guillaume**, mi principito, porque nuestra historia no podría haber tenido un mejor comienzo; destino, casualidad o simplemente un buen timing. Gracias, porque no pasan los días sin que sienta tu amor, tu fuerza, y tu apoyo incondicional, por acompañarme en mis momentos más duros y ayudarme a sacar lo mejor de mí en cada uno de ellos. Gracias por los viajes, los consejos, por las risas, los abrazos, los bailes, las cenitas y los buenos momentos que cada vez son más a tu lado. Conocerme y disfrutar de todo lo que eres ha sido el mejor descubrimiento en mi vida, cada día agradezco que te cruzaras en mi camino y hayas decidido compartir esta aventura conmigo. He encontrado en ti todo lo que anhelo y deseo para construir de ahora en adelante un camino juntos y estoy segura que juntos lo lograremos.

Índice

Índice	XVII
Abreviaturas	XXV
Resumen	XXXI
Summary	XXXVII
1. Revisión Bibliográfica	1
1.1 Cannabis: el constante debate entre droga o medicina	3
1.1.1 Consumo de Cannabis a nivel mundial.....	3
1.1.2 Legalización	3
1.1.3 Uso terapéutico vs uso lúdico.....	4
1.2 Sistema Cannabinoide.....	6
1.2.1 Perspectiva histórica.....	6
1.2.2 Cannabinoides	7
1.2.3 Receptores cannabinoides (CBR).....	8
1.2.3.1 Receptor cannabinoide tipo 1 (CB1 o CNR1).....	8
1.2.3.2 Receptor cannabinoide tipo 2 (CB2 o CNR2).....	8
1.2.4 Cannabinoides exógenos, naturales y sintéticos	9
1.2.5 Antagonistas selectivos para receptores cannabinoides.....	10
1.2.6 Señalización mediada por los receptores cannabinoides	11
1.2.6.1 Los receptores cannabinoides actúan a través de proteínas G.....	11
1.2.6.1 Los receptores cannabinoides actúan a través de proteínas G.....	11
1.2.7 Los receptores cannabinoides median la inhibición de la producción de AMPc, principalmente a través de CB1	12
1.2.8 Interacciones del receptor CB1 con la vía de las MAPKs.....	12
1.3 El ovocito: maquinaria compleja para garantizar el origen de la vida.....	14
1.3.1 Foliculogénesis y desarrollo de la competencia del ovocito	14
1.3.2 Comunicación entre el ovocito y el cúmulo	16
1.3.3 Maduración del ovocito <i>in vivo</i>	16
1.3.3.1 Maduración citoplasmática: modificaciones en el número y organización de orgánulos	16
1.3.3.2 Expresión génica y actividad transcripcional.....	17
1.3.3.3 Maduración nuclear: señalización del reinicio de la meiosis	18
1.3.4 Maduración del ovocito <i>in vitro</i>	20
1.3.4.1 Importancia de la maduración <i>in vitro</i>	21
1.3.5 Otros componentes y vías de señalización importantes en la maduración	23
1.3.5.1 Los GPCRs y su maquinaria durante la maduración ovocitaria	23
1.3.5.2 Papel de la vía MAPK durante la maduración del ovocito	23
1.3.5.3 Papel de la vía PI3K/ AKT durante la maduración del ovocito.....	24
1.4 Espermatozoide: Adquiriendo la capacidad para fecundar	26
1.4.1 Espermatogénesis y espermiogénesis	26
1.4.2 Maduración a nivel del epidídimo	26
1.4.3 Inicio de la capacitación espermática: transporte del espermatozoide.....	27
1.5 Desarrollo embrionario temprano	29
1.5.1 Morfología del desarrollo embrionario preimplantacional.....	29
1.6 Sistema cannabinoide en reproducción.....	31
1.6.1 Sistema cannabinoide en la fertilidad de la hembra.....	31

1.6.1.1 Ovario y ovocito.....	31
1.6.1.2 Transporte oviductal.....	32
1.6.1.3 Interacción ovocito-espermatozoide.....	32
1.6.1.4 Desarrollo embrionario temprano.....	33
1.6.1.5 Implantación.....	34
1.6.2 Sistema cannabinoide en la fertilidad del macho.....	34
1.6.2.1 Espermatogénesis y la adquisición de las funciones del espermatozoide.....	34
1.6.2.2 Motilidad espermática e interacción con el oviducto.....	35
1.6.3 El sistema cannabinoide como biomarcador de fertilidad.....	36
2. Objetivos.....	39
3. Materiales y Métodos.....	45
3.1 Animales.....	47
3.1.1 Animales de genotipo salvaje (WT).....	47
3.1.2 Animales knockouts para receptores CB1, CB2 y doble KOs.....	47
3.1.2.1 Cría.....	47
3.1.2.2 Obtención de ADN de tejido de ratón para genotipado.....	48
3.2 Producción de embriones <i>in vitro</i> en el modelo murino.....	49
3.2.1 Obtención de complejos cúmulo-ovocito (CCOs).....	49
3.2.2 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	49
3.2.2.1 Incubación con agonistas y antagonistas para CB1 y CB2.....	50
3.2.3 Maduración <i>in vivo</i> de ovocitos.....	51
3.2.4 Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	51
3.2.4.1 Preparación de los espermatozoides.....	51
3.2.4.2 Co-incubación de gametos.....	51
3.2.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	52
3.2.6 Evaluación del transporte a través del tracto reproductivo.....	52
3.3 Producción de embriones <i>in vitro</i> en el modelo bovino.....	52
3.3.1 Aislamiento y maduración <i>in vitro</i> de complejos cumulo-ovocito (CCOs).....	52
3.3.1.1 Suplementación durante la maduración con agonistas de cannabinoides durante la MIV.....	53
3.3.1.2 Progresión meiótica de los ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i> con cannabinoides exógenos.....	53
3.3.2 Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	53
3.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	53
3.4 Técnicas de imagen.....	54
3.4.1 Inmunofluorescencia de ovocitos y embriones.....	54
3.4.2 Microscopio confocal.....	55
3.4.3 Evaluación de la morfología de secciones de testículos.....	55
3.4.3.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina.....	55
3.4.3.2 Criterios de evaluación morfológica.....	56
3.4.3.3 Determinación de apoptosis.....	56
3.5 Tratamientos de consumo de THC en ratones para evaluar fertilidad en el macho.....	56
3.5.1 Exposición aguda a THC.....	56
3.5.2 Exposición crónica a THC.....	57
3.5.2 Evaluación de la motilidad espermática.....	57
3.6 Técnicas de biología molecular.....	57
3.6.1 Obtención de muestras.....	57
3.6.2 Análisis de la expresión génica.....	58
3.6.2.1 Obtención de ARN de ovocitos y embriones.....	58
3.6.2.2 Obtención de ARN de tejidos.....	58
3.6.2.3 Síntesis de ADNc por retrotranscripción.....	59
3.6.3 PCR convencional y electroforesis en geles de agarosa.....	59

3.6.4 PCR cuantitativa.....	60
3.6.5 Secuenciación genómica mediante bisulfito para análisis del patrón de metilación de la región promotora del gen <i>Cnr1</i>	60
3.6.5.1 Extracción de ADN y tratamiento con bisulfito.....	61
3.6.5.2 Diseño de oligonucleótidos y amplificación mediante PCR.....	61
3.6.5.3 Clonado y secuenciación	62
3.7 Otras técnicas	62
3.7.1 Programas utilizados	62
3.7.1.1 Biología molecular.....	62
3.7.1.2 Trabajo con imágenes.....	62
3.7.1.3 Análisis de parámetros espermáticos	63
3.7.1.3 Otros.....	63
3.8 Estadística.....	63
3.9 Materiales	63
3.9.1 Reactivos	63
3.9.2 Agonistas y antagonistas cannabinoides.....	63
3.9.3 Medios para manipulación y cultivo de ovocitos y embriones murinos.....	64
3.9.3.1 Medio M2.....	64
3.9.3.2 Medio HTF.....	65
3.9.3.3 KSOMaa.....	66
3.9.4 Listado de anticuerpos primarios	67
4. Resultados	71
Capítulo I	73
.....	73
4.1 El receptor cannabinoide CB1 participa en la maduración de los ovocitos murinos a través de la activación de AKT y ERK1/2, afectando el posterior desarrollo del embrión	73
4.1.1 Expresión e inmunolocalización de los receptores CB1 y CB2 durante el reinicio de la meiosis en ovocitos: modelo murino.....	75
4.1.2 La dinámica de localización del receptor CB1 podría ser un indicador de maduración	76
.....	77
4.1.3 Dinámica de la expresión y localización de los receptores CB1 y CB2 durante el desarrollo preimplantacional del embrión de ratón.....	77
4.1.4 La ausencia del receptor CB1 durante la maduración del ovocito tiene implicaciones en el desarrollo embrionario temprano <i>in vitro</i>	79
4.1.5 La deficiencia de CB1 durante la maduración de ovocitos retrasa el desarrollo del embrión <i>in vivo</i>	81
4.1.6 La activación farmacológica de CB1 durante la maduración de ovocitos <i>in vitro</i> modula la señalización de AKT y ERK1/2	82
4.1.7 La presencia de cannabinoides durante la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos murinos mejora las tasas de producción de embriones a través de la activación de CB1	85
Capítulo II.....	89
.....	89
4.2 Los cannabinoides afectan la maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos bovinos mediante la activación de AKT y ERK 1/2.....	89
4.2.1 Expresión e inmunolocalización de los receptores CB1 y CB2 durante el reinicio de la meiosis en ovocitos bovinos	91
4.2.2 Dinámica de la expresión e inmunolocalización de los receptores CB1 y CB2 durante el desarrollo preimplantacional: modelo bovino.....	91

4.2.3 La exposición a HU-210 y THC durante la maduración del ovocito bovino modifica los patrones de fosforilación de AKT y ERK1/2.....	92
4.2.4 Cambios en la velocidad del reinicio de la meiosis en ovocitos bovinos expuestos a HU-210 y THC	95
4.2.5 Producción de embriones y expresión génica de blastocistos producidos con ovocitos madurados en presencia de HU-210 y THC.....	97
Capítulo III	101
.....	101
4.3 El consumo crónico de THC en ratones no afecta la fisiología testicular ni la capacidad de sus espermatozoides para fecundar in vitro	101
4.3.1 La exposición de forma aguda a THC no afecta a la motilidad de espermatozoides murinos	103
4.3.2 El consumo crónico de THC afecta al SNC, pero no tiene efecto en el sistema reproductivo.....	103
4.3.3 La diferencia de expresión de CB1 a nivel cerebral no está regulada por modificaciones en la metilación de la región promotora del receptor	105
4.3.4 Efecto del consumo crónico de THC en el epidídimo y el testículo.....	106
.....	108
4.3.5 Capacidad fecundante de los espermatozoides de animales expuestos crónicamente a THC.....	108
5. Discusión general	111
Discusión.....	113
6. Conclusiones	129
7. Bibliografía.....	133
Curriculum vitae	155

Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonilglicerol
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Anandamida
AKT	Proteína quinasa B
ALH	Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza
pAKT	Proteína quinasa B fosforilada
AMP_c	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_h	ARN heterogéneo
ARM_m	ARN mensajero
ARM_r	ARN de ribosomal
ARM_t	ARN de transferencia
BCF	Frecuencia de batida o golpe cruzado
BMP15	Proteína morfogenética ósea 15
BSA	Albúmina sérica bovina
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2
CBR	Receptores cannabinoides
CCOs	Complejo cúmulo-ovocito
CDC25B	fosfatasa inductora de la fase M
CDK1	Quinasa dependiente de ciclina 1, p34CDC2
CG	Células de granulosa, células del cúmulo
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
<i>Cnr1</i>^{-/-}	Ratón desprovisto del receptor CB1
<i>Cnr2</i>^{-/-}	Ratón desprovisto del receptor CB1
<i>Cnr1</i>^{-/-}/<i>Cnr2</i>^{-/-}	Ratón desprovisto del receptor CB1 y CB2
CYCB	Ciclina b
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECs	Endocannabinoides
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFr	Receptor EGF
ERK1/2	Quinasa reguladora de señales extracelulares tipo 1 y 2
pERK1/2	Quinasa reguladora de señales extracelulares tipo 1 y 2 fosforilada
ESHRE	Sociedad de Reproducción Humana y Embriología
FAAH	Amidohidrolasa de ácidos grasos
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
FHSr	Receptor FSH
GDF9	Factor de diferenciación de crecimiento 9
G_α	Subunidad alfa proteínas G heterotrimérica
G_{βγ}	Subunidad beta-gama proteínas G heterotrimérica
G_i	Proteína G inhibidora
G_s	Proteína G estimuladora
GSK-3_α	Glucógeno sintasa quinasa 3 alfa
GSK-3_β	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta
GDP	Guanosín difosfato
GJA1	Proteína de uniones gap 1, conexina 43
GJA4	Proteína de uniones gap 4, conexina 37
GMP_c	Guanosín monofosfato cíclico

GPCRs	Receptores unidos a proteínas G
GTP	Guanosín trifosfato
GV	Vesícula germinal
GVBD	Ruptura de la vesícula germinal
hCG	Gonadotropina coriónica humana
hpf	Horas post fecundación
HU-210	[(6aR,10aR)-3-(1,1-Dimethyl-heptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-9-methanol]
HTF	Medio fluido tubular humano
ICSI	Inyección intracitoplasmática del espermatozoide
IFNτ	Interferón tau
IP3	Inositol trifosfato
JNK	Vía quinasas c-Jun N-terminal
JWH-015	[2-methyl-1-propyl-1H-indol-3-yl)-1-naphtalenyl-methanone]
KSOM	Medio optimizado simple de potasio
LH	Hormona luteinizante
LHr	Receptor LH
LIN	Índice de linealidad
MGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	Vía proteína quinasas activadas por mitógenos
MI	Metafase I
MII	Metafase II
MIV	Maduración <i>in vitro</i>
MPF	Factor promotor de la maduración
NAPE-PLD	N-acil-fosfatidiletanolamina - específica de fosfolipasa D
NAT	N-acil-transferasa
PBS	Buffer fosfato salino
PDE3A	Fosfodiesterasa 3A
PDK1	Proteína quinasa dependiente de proteína tipo 1
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PMSG	Suero de yegua preñada
PTEN	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
SCE	Sistema cannabinoide endógeno
SEF	Sociedad Española de Fertilidad
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
SOF	Medio Fluido Oviductal Sintético
SR1	SR141716A [N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride]
SR2	SR144528 [5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-[(4-methylphenyl)methyl]-N-[(1S,2S,4R)-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-1H-pyrazole-3-carboxamide]
STR	Índice de rectitud
TA	Temperatura ambiente
TGFβ	Tactor transformante del crecimiento beta
THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1
UNODC	Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
VAP	Velocidad media
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad rectilínea
WEE2	Proteína como WEE1, WEE1B
WOB	Índice de oscilación
WT	Wild-type, tipo salvaje o natural

Resumen

La señalización cannabinoide ha sido asociada con diferentes eventos reproductivos como la gametogénesis, la fecundación, la implantación, la placentación, la preñez y el parto (Battista, et al. 2008, Maccarrone 2009). Existen pruebas convincentes de que los receptores cannabinoideos CB1 y CB2 se expresan en ovarios, ovocitos y espermatozoides de diferentes especies como humanos, rata y ratón (Agirregoitia, et al. 2015a, Agirregoitia, et al. 2016). Sin embargo, se desconoce su función y si tiene algún efecto en la maduración o la fecundación del ovocito. El objetivo de esta tesis doctoral es analizar en primer lugar, los efectos de los cannabinoideos en la maduración del ovocito y sus consecuencias en la fecundación y el desarrollo embrionario; en segundo lugar, identificar algunas de las posibles vías de señalización por las que pueden estar actuando; y en tercer lugar, analizar el efecto de los cannabinoideos en el espermatozoide.

En el capítulo 1 hemos utilizado el modelo murino en un abordaje genético y farmacológico, para examinar si los cannabinoideos actúan a través de los receptores CB1 y/o CB2 modulando la maduración de ovocitos. En primer lugar evaluamos cual era la dinámica de expresión de ambos receptores y su localización celular durante el reinicio de la meiosis. Nuestros resultados confirman la expresión y localización de ambos receptores en los ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal (GV), lo que convierte al ovocito en una posible diana para cannabinoideos durante el proceso de maduración. De los dos receptores analizados, sólo CB1 tiene un cambio en su dinámica de expresión durante la maduración del ovocitos, disminuye en el paso de GV a metafase I (MI) y desaparece en el ovocito madurado en estadio de metafase II (MII). En cuanto a la localización celular, solo el receptor CB1 tiene cambios, pasando del núcleo en el estadio GV, hacia una ubicación periférica a medida que se dan los eventos característicos del reinicio de la meiosis como la fase de ruptura de la vesícula germinal (GVBD), el paso a MI y finalmente el detenimiento en MII donde se observa ubicado claramente en la membrana del ovocito, sitio en el que el receptor puede activar la maquinaria de las proteínas G, al contrario CB2 permanecio ubicado en el citoplasma y no se detecto ningún cambio en la localización durante las diferentes etapas. El receptor CB1 continúa localizado en la membrana durante todo el desarrollo embrionario, mientras que para el receptor CB2 no se observan cambios en su localización, lo cual indica que los posibles efectos de los cannabinoideos deben ser mediados por la unión al receptor CB1.

En segundo lugar hemos utilizado ratones knockouts a CB1 (*Cnr1*^{-/-}), a CB2 (*Cnr2*^{-/-}) y dobles knockouts *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-}, para analizar como la ausencia de uno o ambos receptores en el ovocito afectaba la maduración tanto en un modelo *in vivo* como *in vitro*, y cuáles son sus consecuencias posteriormente en el desarrollo embrionario temprano. Nuestros hallazgos sugieren que una de las funciones del CB1 es la de regular el proceso de maduración del ovocito, ya que la falta de CB1, pero no de CB2, afecta la competencia de los ovocitos y los futuros eventos de fecundación y desarrollo embrionario. Sin embargo, la falta de ambos receptores agrava aún más los efectos perjudiciales observados, lo que sugiere que el receptor CB2, aunque no participa directamente en la maduración de los ovocitos, sería capaz de compensar parcialmente la falta de CB1 en el ovocito. Para analizar el efecto de CB1 y CB2 en la velocidad de desarrollo embrionario, se realizaron experimentos donde las hembras de los cuatro genotipos en estudio se aparearon con machos WT, observando que los ovocitos *Cnr1*^{-/-} y *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-} fecundados con espermatozoides WT, mostraron

retraso en el desarrollo embrionario, mientras que los ovocitos WT o *Cnr2*^{-/-} no producían este fenotipo, lo cual sugiere que el retraso se debe a la falta de CB1 pero no a la de CB2 en etapas previas a la fecundación. A pesar de la posibilidad descrita por otros autores de que el retraso en el desarrollo se diera por retención de los embriones en el oviducto debido al genotipo materno (Paria, et al. 2001, Wang, et al. 2004), nuestros resultados muestran un bajo porcentaje de retención oviductal en hembras *Cnr1*^{-/-} y *Cnr2*^{-/-} y sólo observamos una retención significativa en el genotipo *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-}, lo que indica que ambos receptores son necesarios para un adecuado transporte a nivel oviductal.

Finalmente, utilizamos compuestos agonistas (HU-210 Y JWH-015) y antagonistas específicos para CB1 y CB2 (SR1 y SR2), para analizar cuál es la posible vía de activación y cómo influyen los cannabinoides sobre proteínas como AKT y ERK1/2, representativas de las vías PI3K/AKT y MAPK las cuales son altamente activas durante la maduración. Nuestros resultados confirman que la vía de activación que ejercen los cannabinoides durante la maduración y que afecta el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto se da a través de la activación sólo del receptor CB1, lo que concuerda con los resultados previos donde sólo el CB1 tiene un cambio en su dinámica de expresión y localización y sólo aquellos genotipos que carecían de CB1 vieron afectado su desarrollo embrionario preimplantacional. Además logramos comprobar que la modulación ejercida por los cannabinoides estaría actuando a través de las vías MAPK y PI3K/AKT. Por tanto, proponemos que la activación farmacológica de los receptores CB1 durante la maduración *in vitro* (MIV) podría ser una posible estrategia de tratamiento para pacientes que muestran infertilidad por trastornos de la ovulación, baja reserva ovárica o pacientes con cáncer en las que se criopreserva tejido ovárico previo al tratamiento, donde la MIV se presenta como única opción. En conjunto, nuestros resultados muestran que ambos receptores se expresan tanto en el ovocito como en el embrión, que la ausencia de CB1 en el ovocito afecta al desarrollo embrionario y que la ausencia de ambos, CB1 y CB2, afecta tanto el desarrollo preimplantacional como al transporte embrionario oviductal. Además, nuestros resultados demuestran que la modulación ejercida por los cannabinoides en el ovocito, se consigue principalmente a través del receptor CB1, que estaría actuando a través de las vías MAPK y PI3K/AKT.

A pesar de que el modelo murino presenta una dinámica similar al humano en la ubicación de los receptores cannabinoides durante la maduración del ovocito, es necesario evaluar otros modelos animales que se asemejen más a la especie humana para verificar sus posibles implicaciones en la calidad y viabilidad de los embriones producidos. Por esta razón, en el capítulo II elegimos el modelo bovino, modelo muy utilizado para la producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos no sujetos a estimulación hormonal y que posee grandes similitudes con la especie humana en cuanto a la fisiología ovárica y los procesos que se dan durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Menezo, et al. 2000). En este capítulo quisimos probar tanto el agonista sintético HU-210, del cual ya conocemos previamente su modo de actuación en ratones, como el fitocannabinoide THC, debido a que es el compuesto cannabinoide de mayor relevancia en estudios clínicos y actualmente uno de los que se utiliza tanto en ensayos clínicos como en terapia en humanos. Los hallazgos en este modelo reflejan cómo el receptor CB1 muestra cambios en sus dinámicas de expresión y localización, similares a ratón y humano, lo que podría estar mostrando que la señalización

cannabinoide, principalmente a través de CB1, podría ser un mecanismo conservado en mamíferos durante las primeras etapas del reinicio de la meiosis. Observamos que durante la maduración del ovocito bovino, la fosforilación de AKT y ERK1/2 se inicia en las células de granulosa que están rodeando al ovocito y con el paso del tiempo se va internalizando hacia el ovocito mostrando una respuesta más rápida en la fosforilación cuando existía presencia de cannabinoides en el medio de cultivo. Considerando que AKT y ERK1/2 están involucradas en otras vías de señalización nos preguntamos si las diferencias en su fosforilación por la adición de cannabinoides podrían estar afectando el reinicio de la meiosis, encontrando que 2 horas después de ser madurados con ambos cannabinoides se producía un mayor porcentaje de GVBD que en el control, indicando que los cannabinoides favorecían la salida del arresto meiótico. Además, después de 12 horas de maduración se observó un mayor porcentaje de ovocitos en el estadio de MII en los grupos tratados con cannabinoides. A pesar de los cambios observados en la maduración de los ovocitos bajo el efecto de los cannabinoides, el número de embriones producidos no se vio alterado, aunque observamos alteración en la expresión en estadio de blastocisto de algunos genes relacionados con calidad embrionaria como el interferón tau o la conexina 43.

En el tercer capítulo evaluamos el efecto de los cannabinoides en los espermatozoides. Se ha descrito la presencia de receptores cannabinoides en espermatozoides de diferentes especies como ratón, humano, cerdo y toro (Agirregoitia, et al. 2010, Aquila, et al. 2010, Gervasi, et al. 2009, Maccarrone, et al. 2005) y que los cannabinoides pueden afectar la calidad y movilidad de los espermatozoides (Agirregoitia, et al. 2010, Morgan, et al. 2012, Rossato, et al. 2005, Whan, et al. 2006). En este capítulo hemos evaluado primeramente cuál era la respuesta de los espermatozoides al ser sometidos *in vitro*, de manera aguda, a un cannabinoide exógeno como THC. Nuestros resultados muestran que ningún parámetro relacionado con la motilidad se ve afectado al enfrentar a los espermatozoides a concentraciones crecientes de THC que iban de 0 a 100nM. En segundo lugar analizamos el efecto *in vivo* desarrollando un modelo de consumo crónico de THC para evaluar la capacidad para fecundar de estos espermatozoides. Para ello se inyectó a ratones una dosis de THC de 10mg/kg/día, durante 30 días. Comprobamos como este tratamiento hizo efecto en el ratón ya que, como era de esperar, produjo en el cerebro una disminución de CB1, tanto del mRNA como de la proteína; además, se produjeron cambios en la cascada de señalización activada por CB1, en particular en la fosforilación de AKT y la inhibición en la fosforilación de GSK3- β , demostrando un efecto claro del THC en el modelo crónico desarrollado. A nivel reproductivo, los ratones del modelo *in vivo* mostraron un aumento del peso total y relativo del testículo (24%) y del epidídimo (16%). Sin embargo, cuando se evaluó la expresión de CB1 en los testículos, no se encontraron diferencias entre animales tratados con THC y el grupo control, evidenciando que el THC no estaba afectando la expresión de CB1 de igual forma en el testículo que en el SNC. Este resultado se corroboró posteriormente con el análisis histológico de los testículos donde los túbulos seminíferos no presentaron daños aparentes a nivel estructural ni en el porcentaje de apoptosis. Además el tratamiento no afectó la motilidad espermática ni la producción de embriones originados mediante fecundación *in vitro*, demostrando que en nuestro modelo de consumo crónico el THC no afectó la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Summary

Cannabinoid signaling is associated with different reproductive events like gametogenesis, fertilization, implantation, placentation, pregnancy and parturition (Battista, et al. 2008, Maccarrone 2009). There are convincing evidences indicating that cannabinoid receptors CB1 and CB2 are expressed in the ovaries, oocytes and spermatozoa of different species like human, rats and mice (Agirregoitia, et al. 2015a, Agirregoitia, et al. 2016). However, its function and effects on oocyte maturation and fecundation remain unknown. The objectives of this thesis are: first, to analyse the effects of cannabinoids on oocyte maturation and their consequences on fecundation and embryo development; second, to identify the signalling pathways by which they can act; and third, to analyse the effects of cannabinoids on spermatozoa.

In the first chapter we used a mouse model from a genetic and pharmacological approach, to examine whether cannabinoids act through the CB1 and/or CB2 receptors to modulate oocyte maturation. First, we evaluated the expression dynamics of both receptors and their cellular localization during meiosis resumption. Our results confirmed the expression and localization of both receptors in immature oocytes in germinal vesicle (GV) stage, which points to the oocyte as a possible target for cannabinoids during the maturation process. Among both receptors, only CB1 showed dynamic expression changes during oocytes maturation, decreasing from GV to metaphase I (MI), and disappearing in the mature oocyte in metaphase II (MII) stage. Regarding cellular localization, only CB1 receptor experienced changes, moving from the nucleus in GV stage to a peripheral location along meiosis resumption, specifically during the germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase I (MI) and finally the arrest in MII, where it is clearly localized in the oocyte membrane, being able to activate the G proteins signaling. The CB1 receptor remain localized in membrane during the whole embryo development. On the contrary, CB2 remained localized in the cytoplasm during oocyte maturation and whole embryo development. This may indicate that the effects of cannabinoids may be mediated by the binding to CB1 receptor.

Second, we used *Cnr1*^{-/-} and *Cnr2*^{-/-} knockout mice and *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-} double knockouts mice to analyze how the absence of one or of both receptors in the oocyte affected the maturation *in vivo* and *in vitro*, and which were the consequences in early embryo development. Our findings suggest that one of CB1 functions is to regulate the oocyte maturation process, since only the absence of CB1, but not of CB2, affects oocytes competence, fecundation ability and embryo development. Nevertheless, we observed even more harmful effects when both receptors were missing, which suggests that, even though CB2 receptor does not participate directly in oocytes maturation, it can partially compensate the lack of CB1 in the oocyte. To analyze the involvement of CB1 and CB2 on the speed of embryo development, we performed experiments in which females from the four studied genotypes were mated with WT males. We observed that *Cnr1*^{-/-} and *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-} oocytes fertilized with WT spermatozoa showed delayed embryo development, whereas WT or *Cnr2*^{-/-} oocytes did not produce this phenotype, which suggests that this delay is due to the lack of CB1, but not of CB2, in the stages prior to fertilization. Some authors explain that this delay in embryo development can be caused by embryo retention in the oviduct due to the maternal genotype (Paria, et al. 2001, Wang, et al. 2004). Our results showed a low percentage of oviductal retention

for *Cnr1*^{-/-} and *Cnr2*^{-/-} females, and only a significant retention in the genotype *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-}, which indicates that both receptors are necessary for an adequate oviductal transport.

Ultimately, we used agonist compounds (HU-210 y JWH-015) and specific antagonists for CB1 and CB2 (SR1 y SR2), to analyze the possible activation pathways and how cannabinoids influence proteins like AKT and ERK1/2, involved in the PI3K/AKT and MAPK pathways, which are active during maturation. Our results confirmed that the activation pathway exerted by cannabinoids during maturation, which affects the number of embryos reaching the blastocyst stage, is based on the activation of the CB1 receptor only. This is in agreement with our previous results where only CB1 experiences changes in the expression dynamics and localization, and where only genotypes lacking CB1 showed affected preimplantation embryo development. Moreover, we verified that the modulation exerted by cannabinoids acts through the MAPK and PI3K/AKT pathways. Therefore, we suggest that the pharmacological activation of the CB1 receptor during *in vitro* maturation (MIV) could be a possible treatment strategy for patients who show infertility due to ovulation disorders, low ovarian reserve or patients with cancer, for which ovarian tissue is cryopreserved prior to treatment, and MIV represents the only option. Altogether, our results demonstrate that both receptors are expressed in the oocyte and the embryo. The absence of CB1 in the oocyte affects embryo development and the absence of both CB1 and CB2 affects preimplantation development and oviductal transport. Furthermore, our results demonstrate that the modulation exerted by cannabinoids in the oocyte is mediated mainly by CB1, which could act through the MAPK and PI3K/AKT pathways.

Even if the mice model shares similarities with the human model regarding the localization of cannabinoid receptors during oocyte maturation, it is necessary to evaluate other animal models which are more similar to the human model to verify possible consequences on the viability of produced embryos. For this reason, in chapter II we chose the bovine model, a frequently used model for *in vitro* embryo production from oocytes not obtained through hormonal stimulation, which is more similar to the human species with regards to ovarian physiology and the first stages of embryo development (Menezo, et al. 2000). In this chapter we wanted to test the synthetic agonist HU-210, since its way of action in mice is already known, and the fitocannabinoid THC, because it is the most relevant cannabinoid compound for clinical studies and currently one of those used both in clinical studies and therapy. The findings of this model reflect how the CB1 receptor shows changes in its expression dynamics and localization that are similar to those observed in mice and humans. This could suggest that cannabinoid signaling, mainly through CB1, could be a conserved mechanism in mammals during the first stages of meiosis resumption. We observed that during bovine oocyte maturation, AKT and ERK1/2 phosphorylation is initiated in granulosa cells which surround the oocyte, and goes inwards over time showing a quickest answer in phosphorylation when there are cannabinoids in the culture medium. Given that AKT and ERK1/2 are involved in other signaling pathways, we wondered whether differences in their phosphorylation due to the addition of cannabinoids could affect meiosis resumption, since we observed that after 2 hours of maturation with both cannabinoids, a higher percentage of GVBD appeared in the control group, indicating that cannabinoids fostered meiosis

resumption. Moreover, after 12 hours of maturation, we observed a higher percentage of oocytes in MII stage in those groups treated with cannabinoids. The percentages of embryo production were not altered, although at the blastocyst stage we observed changes in the expression of some genes related to embryo quality, such as interferon or connexin 43.

In the third chapter, we evaluated the effect of cannabinoids on spermatozoa. The presence of cannabinoid receptors in spermatozoa has been described in different species such as mice, human, pig and bull (Agirregoitia, et al. 2010, Aquila, et al. 2010, Gervasi, et al. 2009, Maccarrone, et al. 2005), along with the effect of cannabinoids on the quality and mobility of spermatozoa (Agirregoitia, et al. 2010, Morgan, et al. 2012, Rossato, et al. 2005, Whan, et al. 2006). In this chapter, we first evaluated the response of spermatozoa exposed *in vitro* to an exogenous cannabinoid like THC. Spermatozoa were exposed to increasing concentrations of THC ranging from 0 to 10 nM. Our results show that mobility parameters were not affected. Next, we developed an *in vivo* model of chronic THC consumption to evaluate the capacity of fertilization of the spermatozoa. To this end, mice were treated with 10mg/kg/day of THC during 30 days. We verified that this treatment had the expected effect of reducing both CB1 mRNA and protein in the brain. Moreover, the signaling cascade activated by CB1 was modified, especially the AKT phosphorylation and the inhibition of GSK3- β phosphorylation, which demonstrated the effect of THC on our model of chronic exposure. Regarding reproduction, in *in vivo* mice model, the total and relative testicle and epididymis weights increased (24% and 16% Respectively). However, when we evaluated CB1 expression in testicles, we did not find significant differences between THC-treated animals and the control group, which demonstrates that THC was not affecting CB1 expression in testicles in the same way that it did in Central Nervous System (CNS). This result was subsequently corroborated by histological analysis in the testicles, as neither visible structural damages, nor an increase in the apoptosis percentage, were observed in the seminiferous tubules. Furthermore, the treatment did not affect the spermatid mobility nor the production of embryos from *in vitro* fertilization, which shows that, in our model, the chronic consumption of THC did not alter the fertilization capacity of spermatozoa.

1. Revisión Bibliográfica

1.1 Cannabis: el constante debate entre droga o medicina

1.1.1 Consumo de Cannabis a nivel mundial

El consumo de cannabis ocupa el tercer lugar como droga recreacional a nivel mundial después del alcohol y el tabaco (**Figura 1.1**). El Informe Mundial sobre el consumo de drogas de 2014 realizado por UNODC, revela que entre 125 millones a 227 millones de personas utilizan cannabis, lo que corresponde a una cifra del 2,7% al 4,9% de la población mundial con edades comprendidas entre de 15 a 64 años. África occidental y central, América del Norte, Oceanía y, en menor medida, Europa occidental y central siguen siendo las regiones con tasas de prevalencia mucho más altas que la media mundial. Países como Islandia superan la media con un consumo de 18%, seguido por países como Estados Unidos con 15% y Canadá con 12% y, a nivel europeo, España encabeza la lista con un 9,6% seguido por Francia 8,4% y Alemania con 4,5%. Pero dentro de este consumo se enmarca también el uso a nivel medicinal y clínico.

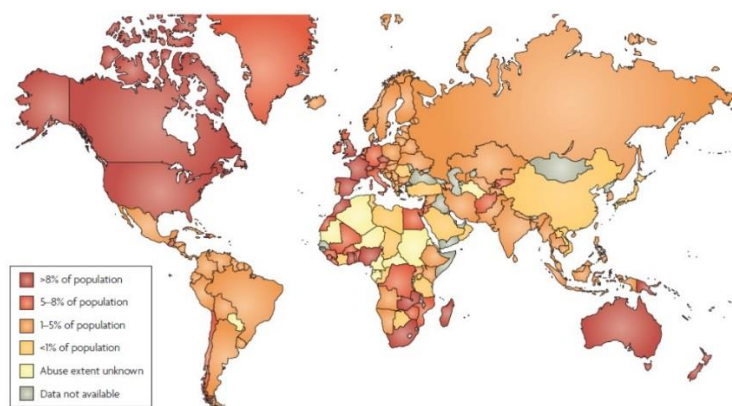


Figura 1.1: Consumo mundial de cannabis. El mapa muestra la prevalencia del consumo de cannabis en todo el mundo en la última década. Los colores más oscuros indican los niveles más altos de consumo de cannabis y el color más oscuro indica que > 8% de la población ha utilizado durante el año anterior cannabis. Las áreas grises indican los países para los que los datos no estaban disponibles; zonas amarillas indican los países para los que el grado de consumo de cannabis es desconocido. Figura adaptada de (Murray, et al. 2007), con actualizados del 2014 de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.

1.1.2 Legalización

A nivel mundial cada país cuenta con sus propias leyes concernientes al cultivo, posesión, venta y consumo del cannabis (**Figura 1.2**). Los productos no psicoactivos (por ejemplo, fibra y semillas) son legales en muchos países y en ellos las autoridades pueden dar licencia para el cultivo orientado a dichos fines. Por el contrario, el uso de la planta como droga con efecto psicoactivo sigue manteniéndola como una sustancia controlada e ilegal en casi todo el mundo. Sin embargo en la última década se han dado grandes cambios en el diseño de las leyes para legalizar el cannabis o disminuir las sanciones asociadas al uso y la posesión en todo el mundo (Cressey 2015). Esto ha permitido trasladar la venta desde los callejones a las fachadas de las tiendas modernas bajo la vista y control de las autoridades.

En 2013, Uruguay se convirtió en el primer país en legalizar el cultivo y venta de marihuana y permitir el consumo tanto lúdico como terapéutico (Room 2014). En Estados Unidos 25 estados han

legalizado su uso medicinal y 4 el uso lúdico. En el caso de Europa los Países Bajos es el único sitio hasta ahora donde se permite legalmente la venta de marihuana y sus derivados en locales con licencia denominados “coffee shops”. En el caso de España la venta y transporte de cualquier cantidad de cannabis es un delito, castigado con penas de cárcel. El consumo y el cultivo en espacio privado es legal, este último debido a un vacío legal. En cuanto a su uso medicinal, no está legalizado pero se ha permitido la creación de cerca de 500 "clubes de cannabis" privados bajo control, 200 de ellos en Barcelona, donde existe tanto la figura del consumidor lúdico como terapéutico (Oró 2015).

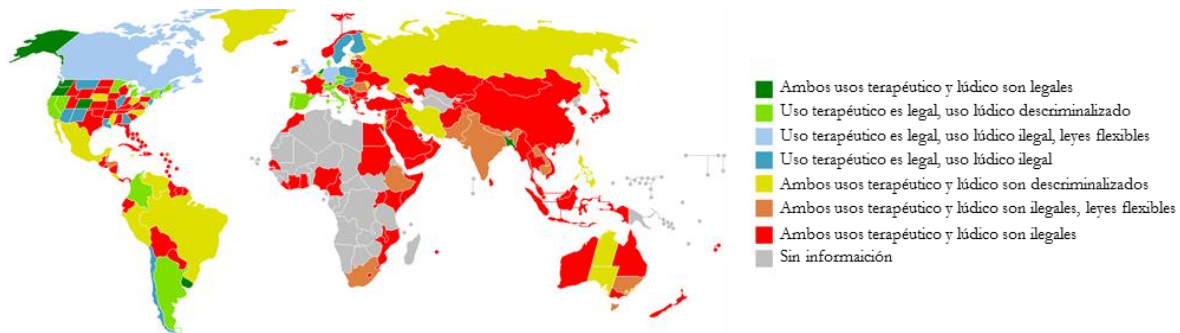


Figura 1.2: Estado actual de la legalización del cannabis a nivel mundial. El mapa muestra la legalización hasta la fecha tanto para el uso terapéutico como lúdico según las leyes de cada país.

Tomado de: Legalidad del cannabis por país. Un resumen visual de las leyes médicas y recreativas de cannabis en todo el mundo https://en.wikipedia.org/wiki/Legality_of_cannabis_by_country

1.1.3 Uso terapéutico vs uso lúdico

A pesar de que cada vez más países están empezando a aliviar las restricciones sobre el uso recreativo de la marihuana, lo que realmente ha permitido el cambio en la percepción del público y en el panorama legal han sido los argumentos sobre su uso médico en la última década (Cressey 2015).

El consumo lúdico generalmente va asociado al consumo de inflorescencias secas de la planta *Cannabis sativa*, mientras que el consumo terapéutico incluye tanto el consumo de la planta en forma tradicional o mediante inhalación por vaporizaciones, como un rango de diferentes productos que contienen los principios activos fundamentalmente Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) y en menor cantidad el cannabinoil, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol ácido y el Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Kowal, et al. 2016). Actualmente existen medicamentos autorizados que contienen cannabinoides y que están disponibles para prescripción médica en algunos países, una muestra de ellos son: Marinol®: Cápsulas de THC sintético (dronabinol) disueltas en aceite de sésamo. Sativex®: Aerosol que contiene un extracto estandarizado de cannabis (THC: CBD 1:1 y 5% de otros cannabinoides). Cesamet®: Cápsulas de un análogo sintético del THC (nabilona). En el caso del Sativex®, ya cuenta con licencia de uso para el dolor en pacientes de esclerosis múltiple (Feliú, et al. 2015).

La prescripción para el uso de estos medicamentos normalmente se realiza como tratamiento adicional para la mejoría de los síntomas de pacientes que frente a la patología tratada no han respondido

de forma adecuada a otros medicamentos y que han mostrado una mejoría clínicamente significativa durante un período inicial de prueba del tratamiento. Algunos ejemplos son el uso en esclerosis múltiple para espasmos y convulsiones musculares. En enfermedad de Parkinson, Alzheimer y epilepsia infantil. También se han utilizado como antieméticos en pacientes con cáncer o VIH para paliar los efectos secundarios de la quimioterapia, en el tratamiento de dolores crónicos de origen nervioso, en enfermedades a nivel digestivo como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (Gerich, et al. 2015). Hay que recordar que el cannabis no juega ningún papel en la curación de estas enfermedades si no que ayuda a aliviar sus síntomas.

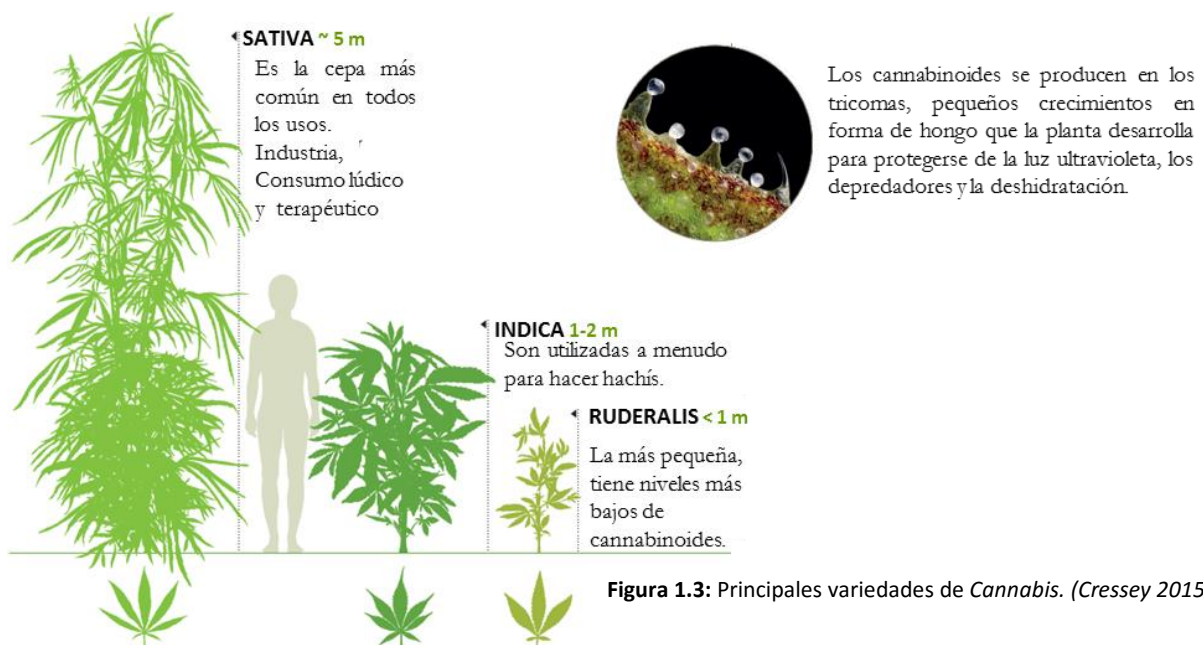
Muchos consumidores habituales han aprovechado el debate sobre el uso terapéutico para argumentar el consumo de la sustancia fuera del ámbito paliativo, defendiendo que se permita su libre consumo debido a su inocuidad y atoxicidad, lo que también tiende a aumentar los números de consumo. Y a pesar de que los debates son totalmente distintos sobre su uso terapéutico o lúdico, la realidad es que actualmente se hace más imperativa la necesidad de conocer los efectos del *Cannabis* en nuestro cuerpo, para poder abordar los posibles usos y consecuencias que tenga su consumo.

Por esta razón describiremos a continuación todo lo que compete a los cannabinoides, su modo de acción y la manera en que funcionan en nuestro cuerpo y algunas de las vías que activan.

1.2 Sistema Cannabinoide

1.2.1 Perspectiva histórica

La planta del cáñamo (*Cannabis sativa*), también conocida popularmente como marihuana, se considera originaria de Asia Central, aunque en la actualidad se describen tres variedades geográficas principales, *Cannabis Sativa* (Europa y Asia Central), *Cannabis Indica* (Sur de Asia, África y América del Sur) y *Cannabis Ruderalis* (Asia Central) y, aunque cada variedad contiene los principios activos, estos pueden variar en la composición y cantidad. (Figura 1.3)



Históricamente la planta ha sido utilizada en diversas culturas con múltiples fines tales como procesos industriales, como la producción de aceite y fibras de cáñamo, rituales religiosos y sociales, droga recreacional y en gran medida debido a sus propiedades curativas. El uso medicinal de la planta se remonta por lo menos 4.000 años (Mechoulam 1986). En China, un tratado médico titulado “Nei Ching” que data de alrededor de 2600 a.C, recomienda su uso para aliviar los síntomas de la malaria, estreñimiento, dolores reumáticos y dismenorrea (Li 1973). Igualmente, la primera referencia de sus efectos alucinógenos es reportada por los chinos en el mismo tratado donde se describe “*Si se toma en exceso producirá visiones de demonios...*” (Li 1978). Aunque en China se reportan sus primeros usos como medicina, fue en India donde realmente se expandió su uso religioso y medicinal alrededor de 1000 a.C, para funciones innumerables, tales como: analgésicos, anticonvulsivos, hipnóticos, tranquilizantes, anestésico, antiinflamatorio, antiespasmódicos, digestivo, estimulante del apetito, y expectorante (Frankhauser 2002, Touw 1981).

La introducción efectiva de cannabis en la medicina occidental se produjo a mediados del siglo XIX a través de los trabajos de Willian B. O’Shaughnessy, un médico irlandés que sirvió en la India con los británicos durante varios años donde conoció la planta y sus usos. A su regreso en 1839, publicó la obra:

"Sobre los preparativos del cáñamo de la India, o gunjah" (O'Shaughnessy 1843), donde se describen varios experimentos humanos que tuvieron éxito utilizando preparaciones de cannabis para tratar el reumatismo, convulsiones y sobre todo para los espasmos musculares (Frankhauser 2002, Mikuriya 1969). Otra influencia importante fue la de Jacques-Joseph Moreau, un psiquiatra francés que utilizó preparados de marihuana para ver sus efectos en la capacidad mental y lo describió como un poderoso método para investigar el origen de las enfermedades mentales (Moreau 1845). Las contribuciones de O'Shaughnessy y Moreau tuvieron un gran impacto en la medicina occidental y permitieron que el uso médico de la droga se extendiera desde Inglaterra y Francia hacia toda Europa y América del Norte.

El punto culminante del uso médico del cannabis por la medicina occidental se produjo a finales del siglo XIX y principios del siglo XX cuando varios laboratorios se interesan por comercializar extractos de cannabis o tinturas, tales como Merck (Alemania), Burroughs-Wellcome (Inglaterra), Bristol Meyers Squibb, Parke-Davis y Eli Lilly (Estados Unidos) (Frankhauser 2002). En ese momento, el principio activo del cannabis aún no había sido aislado y el uso de estas tinturas dependía de diversos factores tales como el origen, la edad, y el modo de preparación, por lo cual los efectos de su administración no eran replicables y eran difíciles de estudiar. Sumado a esto, muchas restricciones legales limitaron su uso, como la creación en 1937 del impuesto a la marihuana y la eliminación en 1942 de la farmacopea de Estados Unidos (Murray, et al. 2007). Más tarde, en 1961, 60 naciones firman en una Convención de Drogas, un tratado que se compromete a acabar con el consumo de cannabis dentro de los 25 años siguientes, lo que daba casi por terminado su interés y uso a nivel de investigación. A pesar de ello algunos investigadores continuaron con sus trabajos y en 1964 Gaoni y Mechoulam revelan la estructura química del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), lo que contribuyó a la proliferación de estudios sobre los componentes activos de cannabis (Gaoni and Mechoulam 1964) y abrió una nueva era para la investigación de la planta y sus compuestos llamados cannabinoides.

1.2.2 Cannabinoides

Los cannabinoides son compuestos lipofílicos de bajo peso molecular, extraídos originalmente de la planta *Cannabis Sativa*, la cual contiene más de 66 compuestos clasificados dentro de este grupo (ElSohly 2002). Las investigaciones con cannabinoides no empezaron a tomar fuerza hasta el descubrimiento en 1964 del mayor componente psicoactivo de la planta *Cannabis* el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) (Mechoulam and Gaoni 1965). Durante mucho tiempo se pensó que los cannabinoides como el THC mediaban sus efectos mediante la alteración de la fluidez de las membranas celulares debido a su carácter altamente lipofílicos (Lawrence and Gill 1975).

A mediados de los 80 numerosas observaciones sugerían que el THC podría estar actuando a través de receptores específicos, hasta que en los trabajos de Howlett y su grupo se identificó por primera vez el receptor, al que llamaron receptor cannabinoide tipo 1 (CB1, posteriormente denominado CNB1) (Howlett and Fleming 1984), unos años más tarde el receptor finalmente fue caracterizado y se describió su ubicación principalmente en sistema nervioso central (SNC) (Devane, et al. 1988, Matsuda, et al. 1990). Tomando

como base la homología en las secuencias se caracterizó el receptor cannabinoide tipo 2 (CB2, posteriormente denominado CNR2) que se encontraba fundamentalmente a nivel periférico y en el sistema inmune (Munro, et al. 1993).

Con el conocimiento de la presencia de los receptores se centró la búsqueda en compuestos endógenos que se unieran a éstos, así se llegó al descubrimiento de los endocannabinoides (ECs). El primero en identificarse fue la N-araquidoniletanolamina, también conocida como anandamida (AEA) (Devane, et al. 1992). El segundo en ser descubierto fue el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam, et al. 1995), ambos compuestos son derivados del ácido araquidónico y son producidos bajo demanda en el momento que la célula los necesita.

1.2.3 Receptores cannabinoides (CBR)

CB1 y CB2 son receptores pertenecientes a la familia de los receptores unidos a proteínas G (GPCRs) que se caracterizan por contar con siete dominios transmembranales y estar acoplados principalmente a subtipos $G\alpha_{i/o}$ de proteína G (Howlett, et al. 2002). Ambos receptores muestran una alta identidad de secuencia, 44% en total y un 68% en las regiones transmembranales (Munro, et al. 1993), aunque varían en su distribución y localización como se explicará más adelante. Adicionalmente se ha aceptado que otros receptores puedan tener actividad cannabinoide, entre ellos el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) (Pertwee, et al. 2010) y el receptor huérfano GPR55 acoplado a proteína G, al que algunos autores han propuesto denominar “CB3” (Ross 2009).

1.2.3.1 Receptor cannabinoide tipo 1 (CB1 o CNR1)

CB1 contiene 472 aminoácidos y se encuentra altamente conservado entre diferentes especies de mamíferos. Por ejemplo existe un 97% de identidad de secuencia entre el receptor humano, ratón y rata (McPartland, et al. 2006). CB1 es el receptor acoplado a proteína G más abundante en el SNC de mamíferos, están presentes particularmente en altos niveles en regiones como el hipocampo, cerebelo, amígdala o tronco cerebral (Herkenham, et al. 1991) distribuidos en distintos tipos celulares como neuronas (Herkenham, et al. 1990), astrocitos (Sánchez, et al. 1998), oligodendrocitos (Molina-Holgado, et al. 2002) y microglía (Cabral, et al. 2002), donde se encarga de mediar la liberación de varios neurotransmisores excitatorios e inhibitorios que afectan funciones cognitivas, motoras, metabólicas y de memoria (Howlett, et al. 2002, Szabo and Schlicker 2005). Igualmente, se ha descrito a nivel periférico un nivel de expresión más bajo pero funcionalmente relevante, en tejidos tales como intestino (Carlo and Izzo 2003), tejido adiposo (Cota, et al. 2003), retina (Buckley, et al. 1997), hígado (Osei-Hyiaman, et al. 2005), endotelio vascular (Jie, et al. 2000), bazo, pulmones, médula ósea, amígdalas, corazón, próstata, útero, ovario, espermatozoides y ovocitos (Cacciola, et al. 2008, El-Talatini, et al. 2009a, Galiegue, et al. 1995, Peralta, et al. 2011, Rossato, et al. 2005).

1.2.3.2 Receptor cannabinoide tipo 2 (CB2 o CNR2)

CB2 cuenta con 360 aminoácidos y se encuentra menos conservado que CB1 entre las diferentes especies; existe una identidad entre rata y humano de un 81% (Munro, et al. 1993, Shire, et al. 1996) y del 93% entre rata y ratón (McPartland, et al. 2006), esto sugiere que CB2 sufrió menos presión evolutiva para conservar su secuencia que CB1. En cuanto a su distribución, varía ampliamente del receptor CB1 ya que, a nivel de sistema nervioso central, CB2 se expresa en determinadas subpoblaciones de neuronas de cerebelo (Ashton, et al. 2006, Skaper, et al. 1996) y tronco cerebral (Ashton, et al. 2006) mientras que en tejidos periféricos es donde presenta los mayores niveles de expresión, fundamentalmente en bazo, amígdalas y a nivel de sistema inmune en células B y T, monocitos y células dendríticas (Galiegue, et al. 1995, Schatz, et al. 1997) así como en retina (Croxford and Yamamura 2005) y en endotelio vascular (Blázquez, et al. 2003, Golech, et al. 2004).

Cuando, en respuesta a un estímulo, se produce una acumulación de calcio citoplasmático, se activaría la maquinaria de síntesis de endocannabinoides, aumentando así la generación de estos compuestos. La síntesis de AEA tiene lugar por la acción secuencial de dos enzimas dependientes de calcio. Una N-aciltransferasa (NAT) y N-acilfosfatiletanolamina-específica de fosfolipasa D (NAPE-PLD) (Di Marzo, et al. 1994, Maccarrone, et al. 2015). En contraste las diacilglicerol lipasa (DAGL) α/β son las responsables de la síntesis de 2-AG (Maccarrone, et al. 2015). Una vez generados, estos lípidos pueden: (i) unirse a receptores específicos o (ii) ser recaptados y degradados. La degradación de los endocannabinoides se lleva a cabo mayoritariamente por dos enzimas: la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) para la anandamida (Giang y Cravatt, 1997, Cravatt et al., 2001) y la monoacilglicerol lipasa (MGL) para el 2-AG (Dinh et al., 2002).

Actualmente se conoce a los receptores, los ligandos endógenos y las moléculas implicadas en su síntesis, recaptación y degradación como *Sistema Cannabinoide Endogeno (SCE)*. Se ha demostrado la implicación del SCE en una amplia gama de enfermedades y condiciones patológicas, que van desde trastornos neuronales, ansiedad, dolor neuropático, esclerosis múltiple, diversos tipos de cáncer, la aterosclerosis, hipertensión, glaucoma, y la osteoporosis, por nombrar sólo unos pocos (Pacher, et al. 2006), así como su función reguladora en diversos procesos a nivel neuronal, cardiovascular, gastrointestinal, inmunológico, muscular, óseo y reproductivo (Maccarrone, et al. 2015).

1.2.4 Cannabinoides exógenos, naturales y sintéticos

Existen numerosos compuestos exógenos naturales o sintéticos con actividad y afinidad por el sistema cannabinoide y que comparten propiedades y efectos a los descritos para los endocannabinoides anandamida y 2-AG que forman el grupo de los *eicosanoides*. Todos los demás compuestos que no son endógenos se dividen en tres grupos i) *cannabinoides clásicos*, ii) *cannabinoides no clásicos*, iii) *aminoalquilindoles*.

Entre los *cannabinoides clásicos*, encontramos aquellos derivados principalmente de la planta *Cannabis sativa* también conocidos como fitocannabinoides. En este grupo destacan el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), Δ^8 -tetrahidrocannabinol, cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG), cannabicromeno, cannabiciclol entre otros (**Figura 1.4**). Las cantidades relativas de cada compuesto dentro

de la planta varían según las condiciones de crecimiento como humedad, temperatura, cantidad de nutrientes, horas de luz o condiciones de almacenamiento (Marzo and Petrocellis 2006). También dentro de este grupo se encuentran los análogos sintéticos creados tomando como base la estructura de algún fitocannabinoide, como es el caso del HU-210, CP-55,940, JWH-015 y la nabilona (**Figura 1.4**). En algunos casos, estos cannabinoides sintéticos presentan unas características farmacocinéticas, de selectividad y de afinidad intrínseca por uno o ambos receptores cannabinoides que les confieren un interesante potencial terapéutico (Howlett, et al. 2002). Así por ejemplo el Δ^9 -THC como principal fitocannabinoide con efecto psicoactivo presenta una constante de afinidad (K_i) \sim 30-60 nM por ambos receptores (Marzo and Petrocellis 2006, Onaivi, et al. 2002), mientras que su homólogo sintético HU-210 es mucho más potente con una $K_i=0.061$ nM para CB1 y 0.52 nM para CB2, y genera el mismo efecto psicoactivo (Pertwee 2006). Con el objetivo de mejorar la especificidad y la afinidad, también se han modificado como es el caso de JWH-015 selectivo solo para CB2.

El segundo grupo, el de los *cannabinoides no clásicos*, fue desarrollado por el equipo de investigación de Pfizer en los 1970. Son bastante similares en estructura al grupo anterior y consisten principalmente en análogos del Δ^9 -THC bicíclicos y tricíclicos sin el anillo pirano; algunos ejemplos son el CP55940, el CP55244, el CP50556 (Fattore and Fratta 2011, Pertwee 1997). El tercer grupo, el de los *aminoalquilindoles*, engloba compuestos que son estructuralmente muy diferentes de los dos grupos anteriores y el prototipo de este grupo es el WIN55212-2 con alta afinidad por receptores CB1 y CB2. Además podría interactuar con otros receptores no identificados (Pertwee 1997). La gran variedad de agonistas que se pueden encontrar dependiendo de sus diversas características a nivel de afinidad, potencia, especificidad y activación selectiva, permite un amplio uso en diferentes campos de investigación.

1.2.5 Antagonistas selectivos para receptores cannabinoides

Los estudios de estructura-actividad de los compuestos que ejercen su acción sobre los receptores cannabinoides también han permitido el desarrollo de antagonistas selectivos para bloquear la señalación de cada uno de ellos. El primero en ser desarrollado fue el SR141716A también conocido como Rimonabant (Rinaldi-Carmona, et al. 1994), éste muestra una marcada selectividad por los receptores CB1, tanto a nivel *in vivo* como *in vitro* se ha demostrado que puede prevenir o revertir los efectos mediados por agonistas CB1 (Howlett, et al. 2002, Pertwee 2005). En cuanto a los antagonistas selectivos para CB2 el SR144528 es uno de los más notables, se une con alta afinidad a los receptores CB2 (Rinaldi-Carmona, et al. 1998), además puede comportarse como agonista inverso lo que significa que puede por sí mismo producir efectos cannabimiméticos inversos a través de los receptores CB2. (**Figura 1.4**).

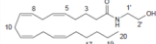
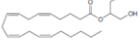
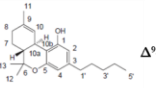
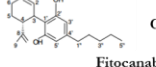
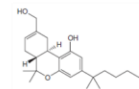
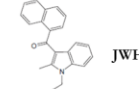
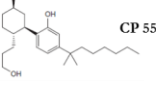
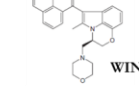
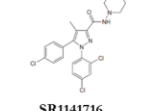
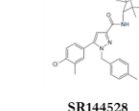
Eicosanoides:		K_i (nM)		K_i (nM)	
Cannabinoides Endógenos		CB1	CB2	CB1	CB2
	AEA	78	>500	58	145
	2-AG				
Cannabinoides clásicos:		K_i (nM)		K_i (nM)	
Fitocannabinoides		CB1	CB2	CB1	CB2
	Δ^9 -THC	40	32	0.1	0.2
	CBD	211	126	383	13,8
	HU-210				
	JWH-015				
Fitocannabinoides		Sintéticos			
Cannabinoides no clásicos:		Aminoalquilindoles			
	CP 55,940	1.4	1.4	9.8	3.3
	WIN-55,212-2				
Antagonistas CB1		Antagonistas CB2			
	SR1141716	11	>500	305	0,6
	SR144528				

Figura 1.4: Estructura química y constantes de afinidad (K_i) para algunos compuestos cannabinoides. (Pertwee 2008, Pertwee 2005)

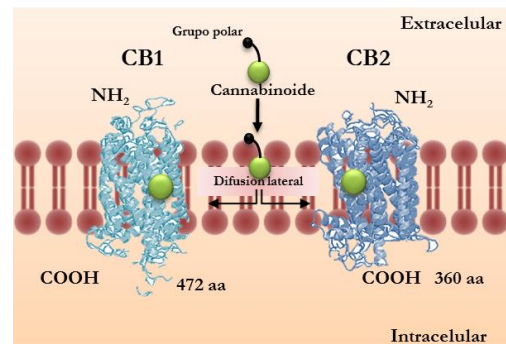


Figura 1.5: Modelo de unión de los cannabinoides a sus receptores. El ligando se integra en la bicapa lipídica y, mediante difusión lateral, se une a la proteína heptahelicoidal.

1.2.6 Señalización mediada por los receptores cannabinoides

1.2.6.1 Los receptores cannabinoides actúan a través de proteínas G

El modo en que los ligandos cannabinoides se unen a sus receptores representa un área de estudio de gran importancia dado que puede contribuir a la mejora del diseño de agonistas y antagonistas cannabinoides. Con los datos actuales se postula que estos compuestos se unen a sus receptores mediante su inserción y difusión lateral dentro de la bicapa lipídica (**Figura 1.5**). Uno de los factores más importantes en ese proceso parece ser la localización de los grupos polares de estos ligandos cannabinérgicos. Se ha descrito que cambios de posición de estos grupos en las moléculas pueden alterar su conformación, localización y orientación en la bicapa, modulando así su actividad biológica (Makriyannis, et al. 2005).

1.2.6.1 Los receptores cannabinoides actúan a través de proteínas G

Las proteínas G heterotriméricas comprenden una subunidad alfa ($G\alpha$) (determinante en la activación de señales intracelulares en vías de señalización vinculadas típicamente a la activación por un GPCR) y una subunidad compuesta por el dímero beta-gamma ($G\beta\gamma$) (capaz de activar algunas vías de señalización de manera más específica). En condiciones basales la subunidad α está unida a GDP y estrechamente asociada con el dímero $\beta\gamma$. Sin embargo, cualquier GPCR induce el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α causando su disociación del dímero $\beta\gamma$ (Howlett 2004).

Los CBR se asocian principalmente a proteínas G inhibitoras (G_i) y se ha demostrado que la unión del cannabinoide estabiliza al receptor en una conformación activa, permitiendo el contacto entre los

dominios intracelulares del receptor y la subunidad α de la proteína G. Esta interacción cataliza el recambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha_i$ y permite la disociación del heterodímero $G\beta\gamma$. Por otro lado, los dímeros $\beta\gamma$ pueden activar diferentes cascadas de señalización como la de fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K)-AKT, las MAPK y la Jun N-terminal quinasa (JNK) (Herrera, et al. 2006, Jie, et al. 2000, Rueda, et al. 2000). Se ha descrito que los CBR pueden asociarse también en menor medida, a proteínas G estimuladoras (G_s), así como a G_q y G_{13} (Bonhaus et al., 1998, Lauckner et al., 2005). En un trabajo reciente se ha encontrado que los CBR son capaces de estimular de manera significativa no sólo las subunidades inhibitoras G_i clásicas, sino también otras subunidades G como $G\alpha_z$, $G\alpha_{q/11}$, y $G_{12/13}$. Además, el patrón específico de la activación de la subunidad de la proteína G es diferente dependiendo de si el ligando es THC, WIN55212 o ACEA (análogo sintético de la anandamida) (Ibarra-Lecue, et al. 2015).

1.2.7 Los receptores cannabinoides median la inhibición de la producción de AMPc, principalmente a través de CB1

Tanto CB1 como CB2 se han asociado a la inhibición de la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Glass and Northup 1999). Se ha descrito que después de la activación del receptor y la disociación, $G\alpha_i$ puede unirse con su efector la adenilato ciclasa (AC), lo cual conlleva a una reducción en los niveles de AMPc, esta disminución también causa la activación de la proteína quinasa A (PKA), que requiere cAMP con el fin de disociarse de su subunidad auto-inhibitoria (Francis, et al. 2002). Ambos CBR tienen afinidad muy similares por proteínas G inhibitoras; sin embargo, las señales intracelulares que se desencadenan pueden variar dependiendo de si se activa CB1 o CB2. Estas diferencias se han mostrado mediante el uso de la toxina pertussis, el agente biológico que causa la tosferina y cuyo mecanismo de acción afecta el funcionamiento de los GPCRs. Esta toxina impide que la proteína G interactúe con el receptor, evitando la disociación de las subunidades, lo que conlleva a una falta en la inhibición de AC y por ende una acumulación de los niveles intracelulares de AMPc (Jakobs, et al. 1984). Utilizando esta PT se ha visto como un efecto estimulador de CB1 produce una acumulación de AMPc por la ausencia de una $G\alpha_i$. En contraste con el receptor CB1, la estimulación de CB2 bajo el tratamiento con PT, no muestra efectos en la acumulación de AMPc (Glass and Felder 1997). Lo anteriormente expuesto indica que a pesar de que CB1 y CB2 estén catalogados como GPCRs y estén asociados a los mismos mecanismos de señalización como lo son las proteínas G inhibitoras, tienen una capacidad de señalización interna variada dependiendo de cuál de los dos sea estimulado.

1.2.8 Interacciones del receptor CB1 con la vía de las MAPKs

La familia de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) participa en vías que se encargan de la transmisión de estímulos extracelulares a respuestas intracelulares. Las MAPKs coordinadamente regulan funciones a nivel de la proliferación celular, la diferenciación, la motilidad y la supervivencia (Roux and Blenis 2004). Dentro de la familia, una de las proteínas más destacadas es la

proteína quinasa p42/p44 MAPK, también conocida como quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK1/2).

En previos estudios se ha demostrado que ERK1/2 es fosforilada a través de proteínas G en respuesta a la estimulación del receptor CB1 en diversos tipos celulares como fibroblastos, astrocitos y células de glioma (Bouaboula, et al. 1995, Guzmán and Sánchez 1999, Sánchez, et al. 1998). Uno de los mecanismos propuesto para esta activación de ERK1/2 por CBR es la activación por medio del dímero $G\beta\gamma$ que activa la PI3K, la cual en su forma activa se encarga de fosforilar fosfolípidos de membrana para reclutar y activar a la proteína quinasa B (PKB, también conocido como AKT) el cual es el objetivo principal de la vía de señalización de PI3K.

En varios estudios que utilizan una combinación de estimuladores de los CBR e inhibidores farmacológicos de PI3K, se ha demostrado la participación de la vía PI3K al verse afectada la posterior activación de AKT (Galve-Roperh, et al. 2002, Sánchez, et al. 2003). Sin embargo, la activación de la vía PI3K/AKT no siempre depende de que en primer lugar se active ERK1/2 y puede ser específico del tipo de célula. Por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación de CB2 en la línea de células de leucemia promielocítica humana HL60, activa la fosforilación de ERK 1/2, pero no la vía PI3K/AKT (Kobayashi, et al. 2001). Por el contrario se requiere la activación de ERK 1/2 para la activación de PI3K y AKT, al estimular CB1 o CB2 en células PC-3 que provienen de cáncer de próstata (Sánchez, et al. 2003). Curiosamente, Molina-Holgado y colaboradores han demostrado que la activación de la vía PI3K/AKT en neuronas corticales primarias no dio lugar a la concomitante activación de las ERK 1/2 (Molina-Holgado, et al. 2005). Por lo tanto, es evidente que la activación de la vía PI3K/AKT no está siempre inducida por la activación de ERK1/2, ni que la activación de ERK 1/2 sea siempre un común denominador al activar los CBR; se debe tener en cuenta que el tipo celular, el estímulo y la activación de CB1, CB2 o ambos receptores influirán en la respuesta de su señalización. Se ha sugerido que la estimulación de CB1 conlleva a la activación de PKA a través de la activación de ERK1/2 (Bouaboula, et al. 1995), esto es importante ya que PKA está involucrada en procesos de reactivación del ciclo celular como sucede durante el reinicio de la meiosis en ovocitos. Sin embargo existen pocos datos que describan cómo se comportan estas vías de señalización y estimulación en ovocitos mamíferos.

1.3 El ovocito: maquinaria compleja para garantizar el origen de la vida

1.3.1 Foliculogénesis y desarrollo de la competencia del ovocito

Un ovocito competente se define como aquel que puede reiniciar la meiosis, ser fecundado, desarrollar un embrión viable con capacidad de implantarse y dar lugar a un individuo fértil para continuar con el mantenimiento de la especie (Duranthon and Renard 2001). Sin embargo, debido a que la maduración y fecundación de ovocitos *in vitro* se ha logrado con éxito en muchas especies, este concepto normalmente se asocia con aquellos ovocitos que completan las etapas finales de la maduración y que son capaces de ser fecundados y sustentar el desarrollo embrionario temprano.

Para comprender las relaciones intracelulares y moleculares de la maduración del ovocito y la adquisición de la competencia, es necesario abordar previamente la dinámica del crecimiento folicular. La complejidad de la foliculogénesis ha puesto en evidencia que el proceso de maduración del ovocito es complejo e involucra procesos como la síntesis y acumulación de ARN y proteínas, el reordenamiento de orgánulos y componentes citoplasmáticos, cambios en la configuración de la cromatina, además del reinicio de la meiosis (Fair 2003, Fulka, et al. 1998, Sanchez and Smitz 2012). Todos estos procesos están regulados por la comunicación entre los diferentes componentes que forman el folículo, como son el ovocito, las células del cúmulo, granulosa, teca y el fluido folicular (Kalinowski, et al. 2004, Nilsson and Skinner 2001) y controlados a nivel endocrino por cambios en las concentraciones de hormonas y factores de crecimiento dentro del ambiente folicular (Hsueh, et al. 2014, Sanchez and Smitz 2012).

Las hembras mamíferas al nacer tienen un número finito de folículos primordiales detenidos en la fase de diplotene de la profase I que están rodeados de células foliculares planas. Con la edad y tras la manifestación de cada ciclo estral, la reserva de folículos disminuye en cantidad y calidad, determinando una edad reproductiva para los mamíferos (Broekmans, et al. 2007). Por ejemplo, una mujer ovula menos de 500 ovocitos a lo largo de su vida reproductiva, pero una niña tiene unos 300.000-400.000 ovocitos en el momento del nacimiento (Block 1953, Forabosco, et al. 1991, Hansen, et al. 2008). Por lo tanto, en términos generales, sólo 1 de cada 1.600 folículos primordiales completa el proceso de foliculogénesis y llega a la ovulación.

Al llegar a la pubertad los folículos son llamados a crecer y deben progresar a través de todas las fases de desarrollo folicular: folículo primordial, primario, secundario, preantral, antral, dominante y ovulatorio (Fair 2003). En humanos, el proceso completo desde el estadio inicial de folículo primordial a folículo preovulatorio requiere más de 6 meses. En roedores, la duración de la foliculogénesis es mucho más corta que en humano. El tiempo requerido entre el reclutamiento de folículos primordiales y su crecimiento hasta folículos secundarios es aproximadamente de 30 días. Por lo tanto, se requieren 28 días para llegar a la formación temprana del antro folicular. Una vez en esta etapa, los folículos son sensibles a las hormonas

y serán reclutados en el siguiente ciclo estral convirtiéndose en folículos preovulatorios en tan solo 2-3 días (McGee and Hsueh 2000). Durante el curso de la foliculogénesis, el ovocito obtendrá gradual y secuencialmente la maquinaria citoplasmática y molecular necesaria para ser competente y soportar el desarrollo embrionario temprano (Gilchrist, et al. 2008, Sirard, et al. 1998).

En general, el crecimiento de los ovocitos en mamíferos puede resumirse en dos etapas: i) la transición desde estado quiescente del folículo primordial a estado de crecimiento activo, el cual es independiente de gonadotropinas y ii) el periodo preovulatorio o fase antral, donde las gonadotropinas inducen la separación de las uniones intercelulares presentes entre las células de la corona radiada y el ovocito, disminuyendo las concentraciones de AMPc, lo que activa el reinicio del ciclo meiótico y termina con la ovulación (Picton, et al. 1998). La activación del folículo primordial es la transición de folículo primordial a folículo primario. Ésta se caracteriza por un crecimiento del propio ovocito, así como por la proliferación, diferenciación y cambio en la forma de las células pre-granulosa que le rodean, que pasan de ser aplanadas a cuboides (Fair 2003, Fortune, et al. 2000). La activación se da gracias a proteínas como el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15), que se encargan de estimular la proliferación de las células de la granulosa, ya sea en ausencia o en sinergia con FSH (Eppig, et al. 2002). Una vez activada la proliferación, el folículo secundario se rodea de múltiples capas de células. Posteriormente, se da el reclutamiento de las células de la teca a partir de las células del estroma ovárico que rodean el folículo, formando la teca interna y la teca externa con vasos sanguíneos entre ambas capas (Reynolds, et al. 2002). Con la formación de la cavidad antral, el folículo continúa su desarrollo hacia folículo terciario y preovulatorio. En esta etapa, el folículo está expuesto a cualquier factor circulante a nivel sistémico, incluyendo factores de crecimiento y hormonas, que permiten la diferenciación de la de granulosa mural en la periferia del folículo y las células del cúmulo cercanas al ovocito (Eppig 2001). Finalmente con el pico preovulatorio de LH se activan diversas señales que desencadenan la ovulación de folículo liberando al ovocito hacia las fimbrias del oviducto (Baerwald, et al. 2012, Sanchez and Smitz 2012). **(Figura 1.6)**

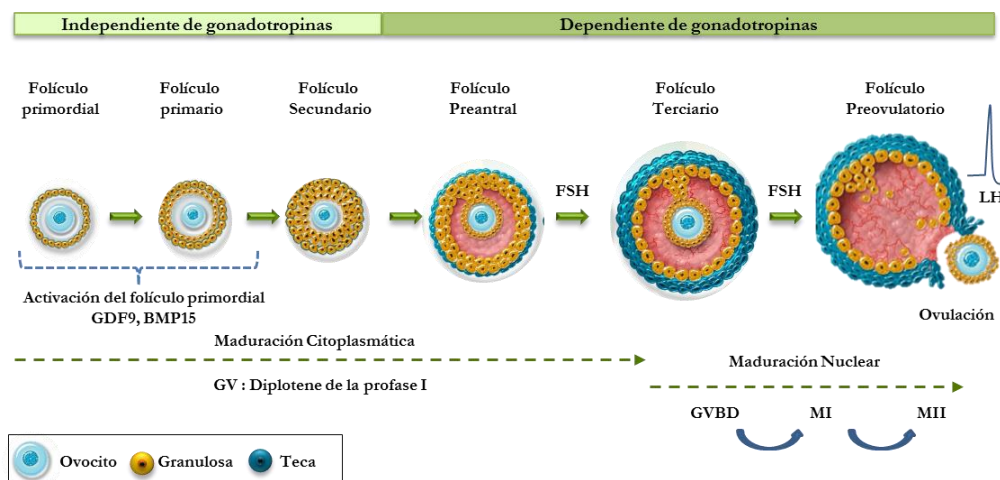


Figura 1.6. Resumen de las principales etapas de la foliculogénesis. La foliculogénesis comienza con la activación de los folículos primordiales que posteriormente son reclutados para convertirse en folículos primarios. Las CG proliferan y forman varias capas alrededor del ovocito. A partir de esta etapa, una capa de células de la teca rodea el folículo, y empiezan a producir andrógenos, que se convierten en estrógenos en células de la granulosa. Las primeras etapas de crecimiento folicular hasta folículo secundario y preantral son independientes de las gonadotropinas, la progresión más allá de esta etapa depende estrictamente de la estimulación de FSH. Finalmente se produce la ovulación, que se desencadena por un pico preovulatorio de LH.

1.3.2 Comunicación entre el ovocito y el cúmulo

Durante toda la foliculogénesis, el desarrollo del ovocito depende de su estrecha relación con las células de la granulosa que le rodean (células del cúmulo). El diálogo entre ovocito y células de la granulosa es esencial para la regulación de diferentes vías de señalización que afectarán al crecimiento y la diferenciación del ovocito, y es fundamental para el aporte de nutrientes, metabolitos y moléculas de bajo peso molecular, que se da por vías endocrinas, paracrinas y autocrinas (Eppig 2001). La comunicación entre células del cúmulo y los ovocitos es bidireccional y se establece desde el estadio de folículo primordial mediante prolongaciones citoplasmáticas de las células de la granulosa que cruzan la zona pelúcida y conectan con el ovoplasma mediante uniones tipo gap (Gilula, et al. 1978). Además, las células de la granulosa también se interconectan entre ellas mediante este tipo de uniones (Albertini, et al. 2001, Kidder and Vanderhyden 2010). Hablamos de una comunicación bidireccional debido a que los ovocitos secretan factores que regulan la expansión y la esteroidogénesis del cúmulo y, a su vez, las células granulosa proporcionan nucleósidos, aminoácidos y fosfolípidos que mantienen un balance iónico y la estabilidad en el ARNm de los ovocitos (Hunter 2000, Procházka, et al. 1998). Así, el ovocito secreta factores como el factor transformante del crecimiento beta ($TGF\beta$), GDF9 y BMP15 (Galloway, et al. 2000). Estos factores permiten controlar procesos de esteroidogénesis que se dan tanto en las células de la granulosa como de la teca, induciendo el mantenimiento de la producción de estradiol y la inhibición de la producción de la progesterona (Vanderhyden and Macdonald 1998). Además, inducen la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa para avanzar por los diferentes estadios foliculares, y la producción de sustancias como el ácido hialurónico, para inducir la expansión del cúmulo, lo cual favorece los procesos de ovulación y la posterior fecundación (Salustri, et al. 1990). Igualmente, las proteínas secretadas por las células de la granulosa en folículos preantrales, tales como cKit, interactúan con los receptores de la superficie del ovocito para promover su crecimiento (Hutt, et al. 2006).

Un elemento importante en la comunicación son las uniones Gap, canales transmembrana que están formados por moléculas de conexina. Las uniones compuestas de Cx37 y Cx43, también llamadas proteína de uniones gap 4 (GJA4) y 1 (GJA1), han sido descritas como necesarias para establecer la comunicación durante la foliculogénesis (Teilmann 2005). Permiten el paso de iones y pequeñas moléculas de hasta de 1 kDa, como nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), aminoácidos y los iones de calcio (Arellano, et al. 2002, Bornslaeger and Schultz 1985). Aunque las Cx37 y Cx43 no son las únicas proteínas de las familia de conexinas presentes en las células de granulosa y el ovocito, si son las únicas que tienen una contribución significativa al acoplamiento intercelular entre ovocito y granulosa (Kidder and Vanderhyden 2010). Al final de la foliculogénesis, estas uniones intercelulares entre células de la granulosa y ovocito desaparecen dando paso a la adquisición de la competencia meiótica y la progresión a la metafase II para completar el proceso de maduración (Veitch, et al. 2004).

1.3.3 Maduración del ovocito *in vivo*

1.3.3.1 Maduración citoplasmática: modificaciones en el número y organización de orgánulos

Durante la fase de crecimiento, el ovocito adquiere una organización citoplasmática que depende de la multiplicación, modificación y redistribución de orgánulos, además de la modificación postranscripcional de los ARNm que serán acumulados para su posterior uso durante el desarrollo embrionario temprano (Picton, et al. 1998, Smith 2001, Trounson, et al. 2001). Para ejemplarizar este tipo de maduración, hablaremos de algunos de los orgánulos más importantes y de los cambios que sufren durante el proceso de maduración.

- **Mitocondrias:** La población de mitocondrias varía durante el crecimiento y desarrollo de los ovocitos; sin embargo, las mitocondrias se mantienen en un estado inmaduro, caracterizado por una morfología ovoide y pocas crestas en la membrana interna (Stojkovic, et al. 2001, Tamassia, et al. 2004). La distribución intracitoplasmática es variable, pues puede ser pericitoplásmica, perinuclear o difusa dependiendo de los requerimientos energéticos diferenciales de cada etapa (Tarazona, et al. 2006, Wilding, et al. 2001). Se ha visto que la actividad mitocondrial del ovocito durante la foliculogénesis es baja, pero tras la maduración nuclear se eleva considerablemente (Cummins 2004).
- **Aparato de Golgi:** Se cree que el aparato de Golgi es un orgánulo autónomo, estable y capaz de modular su propia organización (Payne and Schatten 2003). Aunque se sabe muy poco de este orgánulo en el ovocito, por el momento está claro que el aparato de Golgi es importante durante el crecimiento y maduración, y necesario para la expresión de proteínas de membrana involucradas en diferentes rutas de señalización (Ferreira, et al. 2009, Payne and Schatten 2003). Participa en la exportación de glicoproteínas para formar la zona pelúcida y en la formación de los gránulos corticales que evitan la polispermia (Picton, et al. 1998).
- **Retículo endoplásmico:** Los eventos de activación posteriores a la fecundación incluyen la exocitosis del contenido de los gránulos corticales hacia el espacio perivitelino, la formación de los pronúcleos y el reinicio de la meiosis (Terasaki, et al. 2001). Estos procesos ocurren como consecuencia de las oscilaciones de iones de calcio liberados desde el retículo endoplásmico hacia el citosol (Wakai, et al. 2013). Estas ondas de Ca^{++} se inician con la entrada del espermatozoide y están mediadas por un mecanismo dependiente de inositol trifosfato (IP3). Sin embargo, se ha comprobado que la sensibilidad al IP3 se adquiere de forma gradual durante la maduración del ovocito y corresponde a la reorganización del retículo endoplásmico y al incremento en el número y redistribución de los receptores de IP3 (Mehlmann, et al. 1995).

1.3.3.2 Expresión génica y actividad transcripcional

La reorganización de orgánulos y su maduración funcional no son los únicos cambios durante el crecimiento del ovocito, ya que también se producen modificaciones en la producción de ARN y proteínas durante la foliculogénesis. En la fase de crecimiento, el ovocito sintetiza grandes cantidades de los diferentes tipos de ARN: 60-65% de ARN ribosomal (ARNr), 20-25% de ARN de transferencia (ARNt) y 10-15% de ARN heterogéneo (ARNh). Este último incluye el ARN mensajero (ARNm), que será almacenado en el

ovocito para soportar el desarrollo embrionario (Picton, et al. 1998). Debido a la importancia que tiene la diferenciación entre el ARNm de uso inmediato y el de reserva, el ovocito ha desarrollado dos estrategias de protección contra la degradación: 1. la poliadenilación en el extremo 5', con una secuencia de poli A que es común para ambos tipos de ARNm, pero que difiere en longitud; 2. una poliadenilación corta en 3' del ARNm de almacenamiento con una secuencia conservada (AAUAAA) que encubre el ARNm para no ser traducido tempranamente (Bashirullah, et al. 2001, Picton, et al. 1998). El ARNm modificado también se une a proteínas, formando un complejo ribonucleoproteico que lo protege contra la degradación y le permite permanecer almacenado en el citoplasma hasta ser llamado por señales reguladoras durante la maduración o el desarrollo temprano del embrión (Fulka, et al. 1998).

El ovocito en crecimiento es muy activo para la síntesis de transcritos nucleares y mitocondriales. Las proteínas sintetizadas son usadas para su propia diferenciación, para la comunicación con las células de granulosa, para la formación de la zona pelúcida, durante la fecundación y para el desarrollo temprano (Picton, et al. 1998, Trounson, et al. 2001). Se ha demostrado que en el ovocito se expresan activamente alrededor de 900 genes (Merton, et al. 2003), cuya transcripción se detiene en el momento en que se rompe la vesícula germinal (Christians, et al. 1999).

1.3.3.3 Maduración nuclear: señalización del reinicio de la meiosis

La maduración nuclear constituye la señal necesaria para desencadenar el reinicio de la meiosis. En la mayoría de las especies mamíferas, la señal que lo desencadena es el pico preovulatorio de LH (Chen, et al. 1994, Webb, et al. 2002). Sin embargo, la maduración nuclear comprende tres fases distintas. En primer lugar, el período comprendido entre el primer arresto meiótico que se dio antes del nacimiento, donde los ovocitos se encuentran detenidos en la fase de diplotene de la profase I y que también se conoce como estadio de Vesícula Germinal (GV) (Picton, et al. 1998, Sagata 1998). En este estadio, la meiosis se mantiene inhibida por diferentes factores provenientes del ambiente folicular y por la señalización proporcionada por las células de la granulosa. Esta primera etapa termina una vez se alcanza el máximo tamaño en el folículo preovulatorio, tan sólo unas horas antes de la ovulación, momento en el cual la estimulación por parte de LH permite al ovocito reanudar la meiosis y tiene lugar la ruptura de la GV (Smith 2001), conocido por su nombre en inglés *Germinal vesicle breakdown* (GVBD) (Picton, et al. 1998). El segundo período, que sigue a la reanudación de la meiosis I después del estímulo hormonal, es el progreso hasta metafase I, que se caracteriza por la segregación de cromosomas homólogos y expulsión del primer cuerpo polar. En contraste con el período anterior, este dura sólo unas horas. No obstante, es de vital importancia para generar un ovocito competente. El tercer período se da justo antes de la ovulación y constituye el paso a la metafase II de la meiosis II, donde se da el segundo arresto meiótico, que requiere del contacto entre el espermatozoide y el ovocito para reanudar nuevamente la meiosis II, alcanzar el estado haploide y expulsar el segundo cuerpo polar (Rodríguez and Farin 2003, Sun and Nagai 2003).

El papel del AMPc en la regulación del ciclo meiótico está bien establecido en ovocitos: altos niveles en el ovoplasma inhiben la progresión de la meiosis, mientras que los niveles bajos la activan (Sirard et al.,

1998). Se han planteado diferentes hipótesis para la regulación de los niveles de AMPc dentro del ovocito: i) la regulación mediante las uniones Gap, donde la granulosa transfiere AMPc al ovoplasma; ii) la producción interna de AMPc en el ovoplasma mediado por la AC, que transforma ATP en AMPc, y iii) la activación de fosfodiesterasa (PDE) que inactiva el AMPc transformándolo en 5'AMP, el cual es inefectivo para la activación de la PKA dependiente de AMPc, una de las principales proteínas reguladoras de la cascada del factor promotor de la metafase (MPF) (Kalinowski et al., 2004). Normalmente, se asume que el descenso del AMPc está ocasionado por el pico preovulatorio de LH, que modula la rotura de las uniones Gap. Este evento se ha relacionado con la fosforilación de Cx43 por una PI 3 quinasa, lo cual conduce al cierre de la comunicación del complejo de la unión Gap, y por tanto disminuye el suministro de AMPc hacia el ovoplasma (Sun and Nagai 2003) **(Figura 1.7)**.

Se ha postulado que la fosforilación del MPF, también llamado factor promotor de maduración, es lo que finalmente desencadena el reinicio del ciclo meiótico (Adhikari and Liu 2014). El MPF es una quinasa serina/treonina y se considera el regulador universal del ciclo meiótico. Consta de una subunidad catalítica la quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1) también llamada p34CDC2, y una subunidad reguladora Ciclina B (CYCB) (Trounson, et al. 2001). El ovocito acumula durante la foliculogénesis las subunidades CDK1 y CYCB en forma de un complejo pre-MPF, que se mantiene inactivo por la alta concentración de AMPc que activa a la PKA, que a su vez fosforila a la quinasa WEE2 (activándola) y a la fosfatasa inductora de la fase M (CDC25B) (inhibiéndola). La quinasa WEE2 (anteriormente llamada WEE1B), junto con la quinasa MYT1, fosforilan en dos residuos a la treonina 14 y la tirosina 15 en CDK1 para inhibirla (Parker, et al. 1991, Schindler 2011) **(Figura 1.7)**.

Para que se reanude la meiosis, el complejo pre-MPF es activado sincrónicamente con el GVBD. Para esto se debe desfosforilar CDK1 para que se le pueda unir la ciclina B y formar el MPF. Por una parte, hay datos que confirman que la necesaria disminución en la concentración de cAMP se consigue mediante la activación por fosforilación de la PI3K, que fosforila a la AKT, que a su vez fosforila a la fosfodiesterasa 3A (PDE3A). Esta PDE degrada el cAMP y, debido a la disminución en la concentración de cAMP, se desfosforila e inhibe la PKA, WEE2 y MYT1, mientras que la desfosforilación de la CDC25B la activa. La CDC25B activa se transloca al núcleo y activa a la CDK1 por desfosforilación. Ese hecho hace posible la unión de CDK1 y la ciclina B para crear el MPF activo (Schindler 2011). Esto conllevará a la desintegración de la membrana nuclear en el GVBD, la condensación de los cromosomas y la aparición de microtúbulos dentro de la zona nuclear para formar la placa metafásica, signo característico de que la reanudación de la meiosis se está dando correctamente. La meiosis debe terminar con la migración de esa placa metafásica a la periferia del ovocito y la expulsión de un juego de cromosomas en forma de un cuerpo polar, generando un ovocito con un juego de cromosomas haploide listo para ser fecundado (Sathananthan, et al. 2006) **(Figura 1.7)**.

Es muy importante averiguar cuáles son las señales externas que ayudan a desencadenar y regular todas estas cascadas durante el reinicio de la meiosis, ya que, actuando sobre dichas señales mediante fármacos, podríamos modular el proceso de maduración.

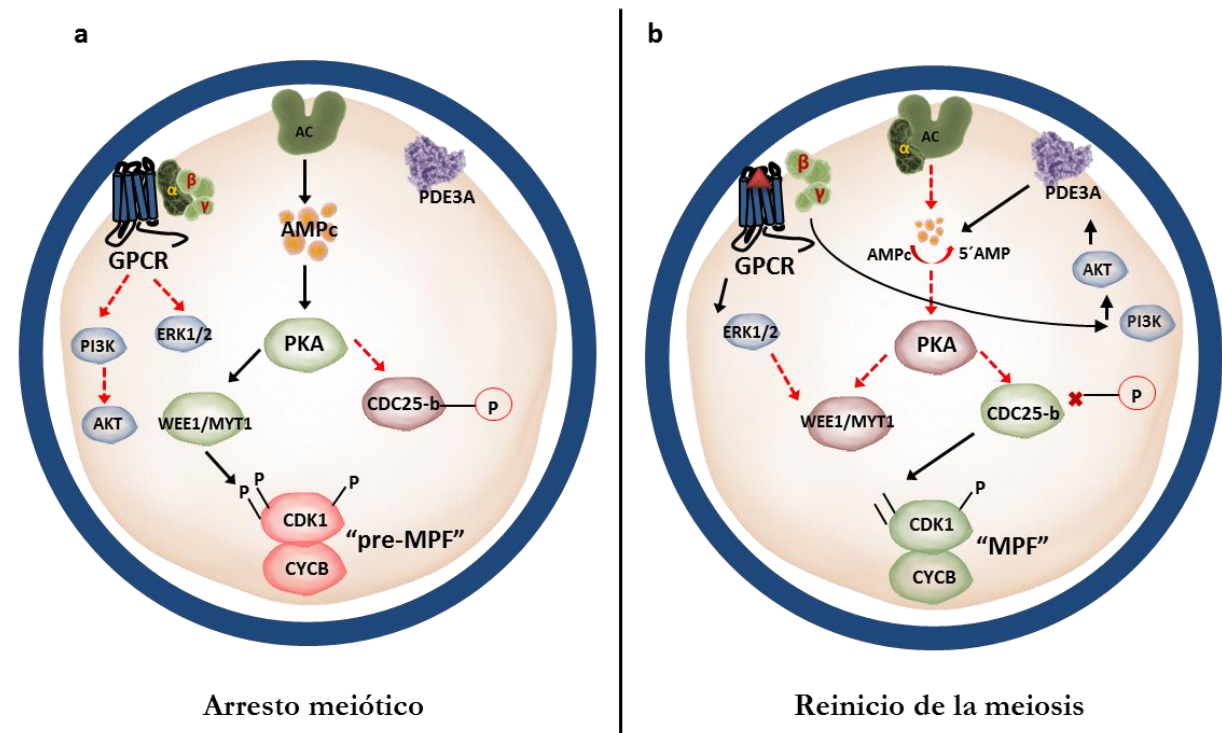


Figura 1.7 Vías de señalización para activar el reinicio de la meiosis en ovocitos. (a) Señalización que mantiene altas cantidades de AMPc para mantener el ovocito en arresto meiótico. (b) vías para activación de la meiosis que disminuyen la cantidad de AMPc. Modificado de (Mehlmann 2005)

1.3.4 Maduración del ovocito *in vitro*

La maduración *in vitro* (MIV) es el proceso por el cual los ovocitos se extraen de un folículo del ovario y maduran en un medio de cultivo en un laboratorio. En 1965, R. G. Edwards basándose en los trabajos pioneros desarrollados en conejo (Pincus and Enzmann 1934) fue uno de los primeros en describir la maduración *in vitro* de ovocitos, obteniendo ovocitos madurados en el laboratorio de diferentes especies mamíferas como ratón, oveja, vaca, cerda, perro, mono Rhesus y humano (Chang 1955, Edwards 1962), sin la necesidad de administrar hormonas exógenas para estimular los ovarios. Edwards maduró con éxito los ovocitos de ratón en medio Difco 199 suplementado con 15% de suero, encontrando que el 80% de los ovocitos reanudaban la meiosis (Edwards 1965).

Actualmente, existen diversos tipos de medios que se utilizan como medio base para los procesos de maduración, incluyendo TCM-199, medio SOF (fluido del oviducto sintético), KSOM (medio optimizado simple de potasio), Ham F-12, MEM (medio esencial mínimo) o DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) entre otros. Los medios de cultivo para maduración consisten generalmente en

una solución equilibrada de sales, un tampón de bicarbonato y una suplementación que suele estar compuesta por aminoácidos y una fuente de energía. La función de las sales inorgánicas equilibradas es regular la osmolaridad (Wright and Bondioli 1981), obteniendo generalmente una presión osmótica de entre 265 a 300 mOsmol (Rosenkrans and First 1994, Thompson 1996) que puede variar dependiendo de la especie de la cual proviene el ovocito. Existen también en el medio iones inorgánicos que juegan un papel en las rutas metabólicas y de señalización, como el sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) (Thompson 1996). El bicarbonato que se utiliza como tampón suele estar a una concentración de 25 mM para mantener el pH entre 7.2 y 7.4, que es el pH fisiológico en unas condiciones controladas de cultivo, generalmente en una atmósfera con un 5% de CO_2 . Normalmente, la fuente de energía en los medios de maduración es el piruvato, además de aminoácidos y minerales que complementan el componente nutricional. Finalmente, se añaden hormonas como FSH, LH, estradiol o factor de crecimiento epidérmico (EGF) para simular la señalización *in vivo* que origina el pico preovulatorio de LH y poder obtener una reanudación de la meiosis (Sirard, et al. 1988). Aparte de estos componentes en los medios, la temperatura también es un factor importante del sistema de maduración, la cual varía dependiendo de la especie con la que se trabaja oscilando entre 37 y 39°C.

1.3.4.1 Importancia de la maduración *in vitro*

La MIV incrementa sustancialmente el número de ovocitos disponibles para ser fecundados y este factor es imprescindible para cualquier producción a gran escala de embriones, ya sea en las industrias de producción de ganado comercial como a nivel de clínicas de fertilidad en humanos, además de proporcionar un importante modelo para la investigación de fallos reproductivos.

En los últimos años se ha estimado que entre un 10% y un 15% de las parejas en edad reproductiva (edad de la mujer entre 15 y 44 años) son estériles (Healy, et al. 1994, Ombelet, et al. 2008); entendida la esterilidad como la incapacidad para conseguir el embarazo tras un año de relaciones sexuales con fines reproductivos (Gnoth, et al. 2005). En el único estudio llevado a cabo en España sobre la prevalencia de la esterilidad, se llegó a la conclusión de que la infertilidad en España afecta al 19,2% de las mujeres (F Pizarro and Velasco 2007).

La MIV consiste en extraer los ovocitos inmaduros (en estadio de vesícula germinal; GV) desde los folículos ováricos antrales sin estimulación hormonal de la paciente y madurarlos exógenamente en medios de cultivo suplementados con diversas moléculas coadyuvantes del proceso. La MIV fue propuesta por Pincus y Enzmann en 1934 y fue en 1991 cuando Cha reportó el primer embarazo mediante esta técnica (Cha, et al. 1991, Pincus and Enzmann 1934). Lo más interesante de este proceso es que, al no ser necesaria la estimulación con gonadotropinas, o al menos no una estimulación con dosis altas de éstas como en los ciclos convencionales para fecundación *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), se convierte en una alternativa para un elevado número de pacientes que acuden a las clínicas de reproducción pero no logran obtener un parto a término por problemas asociados a la maduración del ovocito, lo que las convierte en casos especiales que aún hoy no encuentran respuesta a sus problemas de

infertilidad. A continuación se describen algunos de los casos donde la MIV puede tener aportes importantes a nivel de clínicas de fertilidad.

1. Pacientes con ovarios poliquísticos: debido a la baja respuesta que tienen estas pacientes a la estimulación ovárica, así como al aumento del riesgo que muestran estas pacientes de sufrir el síndrome de hiperestimulación ovárica (Griesinger, et al. 2006, Nader 2010)
2. Pacientes con síndrome de hiperestimulación ovárica: debido a los ciclos reproductivos. Es la consecuencia más severa y ocurre en un 33% de los ciclos de FIV, y en el 2% de los ciclos llega a ser severo (Delvigne and Rozenberg 2002, Halupczok, et al. 2015)
3. Pacientes con disfunción ovulatoria o anovulación: debido a la incapacidad de obtener ovocitos maduros de dichas pacientes aun con estimulación hormonal (Luciano, et al. 2013)
4. Pacientes con reserva ovárica disminuida: debido a que la calidad de las células germinales se encuentra normalmente disminuida a la hora de intentar conseguir un embarazo; la maternidad tardía es el ejemplo más común (Lee, et al. 2015).
5. Pacientes con diagnóstico de infertilidad inexplicada: debido a que no se puede descartar que una maduración incorrecta de los ovocitos pudiera estar condicionando el posterior proceso reproductivo (Coticchio, et al. 2015).
6. Pacientes a las que se les practique congelación o vitrificación de ovocitos y tejido ovárico: debido a enfermedad preexistente en la que no se aconseja estimulación hormonal de la paciente o no haya tiempo para poder realizar un ciclo normal de FIV. El caso más común son las pacientes en edad reproductiva con cáncer sometidas a quimioterapia/radioterapia (Nikseresht, et al. 2015).

Por último, se debe reseñar que la MIV sería una alternativa mucho más confortable para cualquier paciente que acude a una clínica de reproducción, debido a que la obtención de ovocitos se realizaría con una mínima o nula administración de fármacos para la estimulación ovárica (Söderström-Anttila, et al. 2005). De esta manera, se evitaría el paso más peligroso de todo el tratamiento de reproducción, ya que la hormonación de la paciente supone un gran desgaste y la aparición de efectos secundarios desagradables a diferentes niveles (Cousineau and Domar 2007). Además, el coste económico de cada ciclo sería menor (Söderström-Anttila, et al. 2005).

A pesar de las ventajas que puede representar, hoy en día la MIV es un protocolo que no supera el 0,1% de todos los ciclos realizados anualmente. Según los últimos reportes de la Sociedad de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) y la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), solamente 23 ciclos de los 68.756 realizados en España utilizan este sistema (0,06%), que no difiere mucho de la media europea (0,08%) (Kupka, et al. 2016). Del total de ciclos realizados por MIV, el 37% de los ovocitos no pudieron ser utilizados por no llegar a madurarse y, de los ovocitos que alcanzan el estadio de la MII y son considerados maduros, el 72% generó un embrión viable para transferir, y como resultado final produjeron un 17% de gestaciones

y un 13% de partos por ciclo iniciado (Registro SEF, 2012), datos que están muy por debajo del éxito que tienen ahora las técnicas de reproducción asistida que parten de un ovocito madurado *in vivo*.

1.3.5 Otros componentes y vías de señalización importantes en la maduración

1.3.5.1 Los GPCRs y su maquinaria durante la maduración ovocitaria

Gracias al análisis del transcriptoma se han identificado alrededor de 15 GPCRs que se expresan en ovocitos (Mehlmann, et al. 2004). Sin embargo, la función de la mayoría de estos receptores sigue siendo desconocida, al igual que los posibles ligando que los activan. Solo un grupo de receptores en los que se incluyen el GPR3 y GPR12 ambos asociados a G_s , serían constitutivamente activos y mantendrían el arresto meiótico (Hinckley, et al. 2005, Mehlmann, et al. 2004). También se ha propuesto que podría existir un GPCR acoplado a G_i , como inductor de la maduración meiótica, pero se desconoce cuáles serían sus ligandos (Mehlmann 2005). La señalización a través de G_s o G_i ha sido descrita en ovocitos como la presencia de AC o PDE (Horner, et al. 2003, Richard, et al. 2001, Shitsukawa, et al. 2001). Asociando así este tipo de receptores con la regulación del AMPc, principal regulador del reinicio de la meiosis. En este punto es importante destacar que aún no se ha encontrado ese posible receptor asociado a G_i ni que vías podría estar regulando en la maduración del ovocito.

Los receptores de las dos principales gonadotropinas que regulan la función reproductiva, el receptor para FSH (FSHr) y el receptor para LH (LHr), también forman parte de la familia GPCRs (Ascoli, et al. 2002, Themmen and Huhtaniemi 2000). Al igual que la mayoría de los GPCRs, FSHr y LHr regulan la señalización después de su activación por el desacoplamiento de la membrana mediado por β arrestinas (Ferguson, et al. 1996, Lowther, et al. 2011). Es sabido que el pico de LH también activa la señalización por parte del factor de crecimiento epidermal EGF y su receptor (EGFr) (Park, et al. 2004, Su, et al. 2010). Aunque no pertenece a la familia de los GPCRs su relación con la actividad de otros GPCRs como LHr y su señalización durante el reinicio de la meiosis, le ha hecho una molécula importante de estudio en el proceso de maduración ovocitaria, de hecho se utiliza en muchos de los protocolos de maduración *in vitro* en ausencia de LH mostrando igualmente altos porcentajes de maduración (Lonergan, et al. 1996, Lopera-Vasquez, et al. 2015)

1.3.5.2 Papel de la vía MAPK durante la maduración del ovocito

El papel principal de la vía de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) es la transducción de señales extracelulares en respuestas celulares. En ovocitos, uno de los primeros eventos asociados con la estimulación de los receptores de LH y FSH es precisamente la activación de la vía de las MAPKs (Seger, et al. 2001, Sela-Abramovich, et al. 2005), activación que también se reporta por otros tipos de GPCRs (Ferguson, et al. 1996). Hasta el momento es clara su participación en la regulación de la esteroidogénesis, en la supervivencia y la proliferación de células de la granulosa, el reinicio de la meiosis, la dinámica de microtúbulos y especialmente en el mantenimiento de la organización de la metafase II (Sasseville, et al. 2010, Schindler 2011, Seger, et al. 2001, Su, et al. 2007). Curiosamente, estudios del

proteoma de ovocitos en diferentes estadios reveló que la vía de las MAPKs es la que más se expresa durante el estadio de metafase II, donde se cree que ejerce una importante regulación para que se dé el segundo arresto meiótico (Wang, et al. 2010).

Las proteínas ERK1 y ERK2 representan unas de las proteínas mejor caracterizadas dentro de la señalización de las MAPKs (Zhang and Liu 2002). Ambos tipos de ERK han sido aisladas de los ovocitos durante la maduración (Duranton and Renard 2001) y juegan un papel importante en las cascadas de señalización que conducen a la adquisición de la competencia nuclear (Sun and Nagai 2003). Los ovocitos provenientes de ratones donde se ha suprimido la expresión de ERK (*Erk1/2^{-/-}*) no reanudan meiosis a pesar de ser inyectados con hCG (Fan, et al. 2009). En modelos *in vitro* también se ha descrito su activación por la estimulación del EGFR (Fan, et al. 2009, Yamashita, et al. 2009). Por lo anteriormente expuesto se podría considerar a la ERK1/2 como un marcador importante para ser evaluado durante la maduración del ovocito (Conti, et al. 2012).

1.3.5.3 Papel de la vía PI3K/ AKT durante la maduración del ovocito

La vía PI3K es una vía clásica de señalización que consta de varias moléculas, incluyendo quinasas, fosfatasa y factores de transcripción que establecen una cascada de señalización intracelular que es fundamental para procesos como la proliferación celular, la supervivencia, la migración y el metabolismo (Blume-Jensen y Hunter, 2001, Cantley, 2002 y Stokoe, 2005). En los últimos años la información proporcionada por los modelos de ratones genéticamente modificados ha puesto de manifiesto que la señalización de PI3K juega un papel vital en la ovogénesis, la foliculogénesis, la ovulación y la carcinogénesis en el ovario de ratón (Zheng, et al. 2012).

Las PI3K son quinasas de lípidos y se dividen en tres clases (clase I, clase II y clase III). El grupo de la clase I ha sido asociado a la fisiología reproductiva y este puede ser activado por receptores tirosina quinasa como es el caso del EGFR o por GPCRs, como los FSHr y LHR (Vanhaesebroeck, et al. 2010). La función principal de PI3K es la fosforilación de grupos hidroxilos de fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PIP2) para convertirlo en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) que funciona como segundo mensajero para la activación de los diferentes componentes de la vía. Los componentes de la vía PI3K incluyen la proteína quinasa B más conocida como AKT, la quinasa dependiente de proteína tipo 1 (PDK1), factores de transcripción como FOXO y las proteínas quinasas GSK-3 α y GSK-3 β (Liu, et al. 2007, Reddy, et al. 2005). Se ha demostrado que todos ellos se encuentran a nivel del ovocito, por lo que ha sido una de las vías más estudiadas para entender los mecanismos de maduración (Liu, et al. 2006). La fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) es una fosfatasa lipídica, que se encarga de convertir el PIP2 de nuevo a PIP3, y revierte el proceso de activación por esta razón se considera el principal regulador negativo de la vía.

La AKT es la molécula clave de la vía PI3K, su activación se da en dos pasos i) el PIP3 producido por PI3K atrae hacia la membrana a la AKT inactiva y la fosforila en el residuo treonina 308 para activarla

parcialmente. La AKT monofosforilada es liberada al citoplasma donde es fosforilada por el complejo mTOR en el residuo serina 473 activándola completamente. Una vez activa, AKT interactúa sobre muchas dianas regulando múltiples vías de señalización. (Manning and Cantley 2007). AKT se ha relacionado con el desarrollo folicular (Cecconi, et al. 2012), a nivel de maduración del ovocito con la reanudación de la meiosis y la formación del huso meiótico (Hoshino and Sato 2008, Kalous, et al. 2009) y con la expulsión del segundo cuerpo polar en el estadio de metafase II (Cecconi, et al. 2010). Inclusive se ha descrito el papel de AKT durante el desarrollo embrionario y cómo su inactivación puede afectar la eclosión en blastocistos murinos (Riley, et al. 2005). Por último, se han demostrado problemas de fertilidad en ratones *Akt1^{-/-}* (Brown, et al. 2010) y en humanos se ha asociado la desregulación AKT con varias enfermedades a nivel reproductivo, como el síndrome del ovario poliquístico y el cáncer de ovario (Cecconi, et al. 2012).

1.4 Espermatozoide: Adquiriendo la capacidad para fecundar

1.4.1 Espermatogénesis y espermiogénesis

La espermatogénesis y espermiogénesis son procesos complejos y altamente coordinados que implican la proliferación, diferenciación y morfogénesis de las células germinales masculinas. Como vimos anteriormente, la espermatogénesis comienza antes del nacimiento con la diferenciación de las PGCs hacia el linaje masculino. En el momento del nacimiento, la gónada masculina está poblada por células germinales diploides o espermatogonias de tipo A (Griswold and Oatley 2013). Con la llegada de la pubertad, las espermatogonias de tipo A experimentan un número limitado de divisiones mitóticas dando lugar a espermatogonias de tipo B. Éstas comienzan el proceso de meiosis I y al dividirse se convierten en espermatocitos primarios ($2n4c$). Después de completar la meiosis I, pasan a ser espermatocitos secundarios ($1n2c$), y al terminar la segunda división meiótica, forman células haploides llamadas espermátidas (Griswold 2016). Finalmente, las espermátidas sufren una fase prolongada de diferenciación, conocida como espermiogénesis, en la que experimentan modificaciones en el volumen, la pérdida del contenido citoplasmático y la reorganización de la cromatina nuclear (Shang, et al. 2010), que les llevan a convertirse en células altamente especializadas, los espermatozoides. Una vez completado el proceso, los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero (Clermont 1972, Griswold 2016).

Las células de Sertoli, localizadas en los túbulos seminíferos, apoyan y crean un entorno de protección único durante todo el proceso de espermatogénesis. Su función principal es proporcionar hormonas, factores de crecimiento y glicoproteínas necesarias para el desarrollo desde espermatogonia hasta espermatozoide (Alves, et al. 2013, Griswold 2016). La función biológica de las células de Sertoli está controlada por la FSH, que mediante la unión a su receptor desencadena diferentes vías de señalización que conducen a la proliferación y diferenciación celular (Alves, et al. 2013).

1.4.2 Maduración a nivel del epidídimo

Los espermatozoides testiculares, aunque ya transformados en células altamente especializadas, no son competentes para llevar a cabo la fecundación del ovocito. Para ello, deben experimentar un proceso de maduración que tiene lugar durante su transporte a través del epidídimo (Yanagimachi 1994) y que implica: el desarrollo de la capacidad de movimiento progresivo (Yanagimachi 1994), alteraciones físico-químicas en los lípidos de la membrana (Wolf, et al. 1988), y cambios en el patrón de distribución del colesterol y las proteínas transmembranales (Suzuki 1990). Aunque algunos espermatozoides alcanzan su capacidad fecundante en la región proximal del epidídimo, se considera que la cola del epidídimo, principal reservorio de espermatozoides, es donde la mayoría adquiere su capacidad fecundante completa (Yanagimachi 1994).

Durante la eyaculación, los espermatozoides entran en contacto con el plasma seminal, compuesto por las secreciones de las glándulas accesorias del aparato genital masculino. En este proceso, los

espermatozoides entran en contacto con factores decapacitantes o estabilizadores del acrosoma, principalmente glicoproteínas de superficie, cuya función principal es evitar la capacitación y reacción acrosomal prematura de los espermatozoides (Töpfer-Petersen, et al. 2000).

1.4.3 Inicio de la capacitación espermática: transporte del espermatozoide

El sitio donde empieza y termina la capacitación puede variar de especie a especie. En las especies en las que el semen se deposita directamente en el útero durante el coito, la capacitación comienza en el útero, pero el sitio donde se completa es en el oviducto (Hunter and Rodriguez-Martinez 2004).

El transporte de los espermatozoides a través del tracto genital de la hembra se puede dividir en tres etapas: i) un transporte rápido trans-uterino inmediatamente después de la deposición del semen, ii) la formación, en el oviducto, del reservorio espermático en la región del istmo y iii) una lenta liberación de espermatozoides desde el reservorio hacia el lugar de la fecundación, aproximadamente en la unión ampul-istmo (Hunter and Rodriguez-Martinez 2004). Se ha demostrado que todo este proceso en ratones dura tan solo 15 minutos desde el momento del coito hasta la llegada de los espermatozoides al istmo en el oviducto (Muro, et al. 2016).

La adquisición de la capacidad fecundante requiere el contacto entre el espermatozoide y el tracto reproductivo femenino, para liberarse de los factores decapacitantes antes de llegar al lugar donde se llevará a cabo la fecundación (Töpfer-Petersen, et al. 2000). *In vitro*, la capacitación de espermatozoides de especies como el ratón, la rata o el ser humano, puede darse tras un periodo corto de incubación en un medio químicamente definido y relativamente simple (Yanagimachi 1994). En otras especies como el toro, el cerdo y el conejo, la capacitación en medios artificiales no es suficiente y se requiere la utilización de factores capacitantes como heparina o cafeína (Fraser, et al. 2005, Parrish 2014).

En el oviducto, las células epiteliales de la región del istmo permiten la creación de un depósito que asegura la disponibilidad de espermatozoides competentes en el momento de la ovulación (Yanagimachi 1994). Las funciones de este reservorio espermático son: prevenir la polispermia, permitiendo que sólo un número reducido de espermatozoides llegue a la zona de fecundación, y modular la capacitación espermática (Smith 1998); aunque todavía no se han dilucidado todos los mecanismos y moléculas implicadas en el retraso de la capacitación. Hasta el momento se cree que intervienen tanto las secreciones del oviducto como la interacción célula a célula entre los espermatozoides y la membrana apical de las células epiteliales del oviducto (Murray and Smith 1997).

1.4.4 Fin de la capacitación espermática: hiperactivación, reacción acrosomal y fusión de membranas

La motilidad del esperma es un fenómeno complejo, regulado por iones, metabolitos y factores enzimáticos, que permite cambios rápidos y muy específicos en respuesta al ambiente en el que se encuentra el espermatozoide (Guraya 2012). En el momento de la liberación del reservorio oviductal, los

espermatozoides se someten a cambios metabólicos rápidos como el aumento de calcio intracelular, la remodelación de fosfolípidos en la membrana plasmática y la fosforilación de proteínas. Estos cambios causan un aumento de la frecuencia del batido flagelar, hiperactivando al espermatozoide y permitiendo su migración hacia la región ampular (Gualtieri, et al. 2005). Numerosos estudios han identificado múltiples receptores en los espermatozoides que reaccionan con proteínas de la zona pelúcida para permitir el reconocimiento especie específico entre espermatozoide y ovocito (Abou-Haila and Tulsiani 2000).

Con el reconocimiento de los gametos se inicia el proceso de fecundación, el cual requiere tres eventos diferentes de fusión de membranas (Gadella and Evans 2011). En primer lugar, la reacción acrosómica, donde la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana exterior del acrosoma se unen en múltiples sitios para liberar el contenido enzimático compuesto principalmente por dos enzimas: hialuronidasa y acrosina, permitiendo que el esperma penetre la zona pelúcida (Abou-Haila and Tulsiani 2000) (aunque en algunas especies la reacción acrosómica se produce antes del contacto con la zona pelúcida (Muro, et al. 2016). En segundo lugar, el espermatozoide se une al ovocito mediante un reconocimiento específico de receptores y fusiona su membrana plasmática con la del ovocito. Y en tercer lugar, la entrada del espermatozoide activa ondas de calcio en el ovocito fecundado que activa la reacción cortical en el ovocito. La fusión de las membranas de los gránulos corticales con la membrana plasmática del ovocito permite la exocitosis de las proteínas, que son liberadas al espacio perivitelino y son responsables de bloquear la polispermia mediante la modificación de la zona pelúcida del ovocito (Liu 2011). El ovocito, ahora fecundado, continúa su desarrollo como cigoto y comenzará el desarrollo embrionario temprano.

1.5 Desarrollo embrionario temprano

Los estudios sobre el desarrollo del embrión en mamíferos, especialmente en el ratón, han proporcionado información clave para el entendimiento de los complejos procesos que se dan durante esta etapa, como la cinética de desarrollo, el momento de la activación del genoma embrionario, los patrones de expresión génica, la segregación de cromosomas y los patrones de las modificaciones epigenéticas (Gutierrez-Adan, et al. 2015, Niakan, et al. 2012, Santos and Dean 2004, Schultz 2002). Sin embargo, existen diferencias especie-específicas, que cambian de un modelo embrionario a otro. Por esta razón describiremos a continuación brevemente el desarrollo embrionario temprano en los modelos murino y bovino, comparado con el humano para entender cuáles son las similitudes y diferencias que presentan cada uno de ellos.

La duración de la etapa preimplantacional, tomando como inicio el momento de la fecundación y como final la formación de un blastocisto viable para la implantación, dura en el caso del modelo murino 4 días (Bedzhov, et al. 2014), mientras que otras especies como bovino y humano se requieren 7 días para completar el proceso (Lonergan, et al. 2016, Norwitz, et al. 2001). Durante esta etapa, el embrión se desarrolla en un ambiente oviductal y uterino que le proporciona los nutrientes y condiciones adecuadas para su desarrollo (Besenfelder, et al. 2012). Sin embargo, la creación de medios de cultivo químicamente definidos y de condiciones controladas de laboratorio que asemejen el ambiente oviductal, ha permitido el desarrollo y la evaluación de todas las etapas de división a nivel *in vitro* (Maillo, et al. 2016).

1.5.1 Morfología del desarrollo embrionario preimplantacional

El desarrollo embrionario depende inicialmente de la calidad del ovocito y de la maquinaria compuesta por los ARNm maternos y las proteínas almacenadas durante la foliculogénesis y la maduración, que servirán para dirigir los primeros eventos de división y proliferación (Hardy 2002, Telford, et al. 1990). Después de la fecundación, tanto los embriones *in vivo* como los producidos *in vitro* van pasando por varias etapas diferenciadas morfológicamente según el número de células, a las que se les denominan estadios embrionarios.

La primera de ellas es la etapa de cigoto; en esta etapa tiene lugar el desarrollo pronuclear, la síntesis de ADN y comienza la transcripción de ARN. Finalmente, los pronúcleos femenino y masculino se fusionan (singamia) para formar el cigoto (Rahman, et al. 2008). En las diferentes especies de mamíferos, esta etapa se caracteriza generalmente por una marcada degradación del ARNm materno (Schultz 2002), que impulsa las primeras divisiones cuando el embrión recién formado es transcripcionalmente inactivo (Barnes and Eystone 1990, Schier 2007). Además, influye en la determinación de los ejes embrionarios (Piotrowska and Zernicka-Goetz 2001).

La siguiente etapa es el estadio de 2 células, que corresponde a la primera división mitótica de dos células simétricas. En ratón, esta división se da en el primer día de desarrollo, aproximadamente 24 horas después de la fecundación (hpf); mientras que en humano se da a las 25 hpf y en bovino puede variar entre 28 y 32 hpf (Rahman, et al. 2008). El proceso continúa con las siguientes divisiones, también simétricas, y que dependiendo de la especie se pueden diferenciar claramente un estadio de 4 a 8 células y más tarde un estadio de 8 a 16 células. En el ratón, la formación del embrión de cuatro células se da a las 36 hpf y las ocho células se observan alrededor de las 48 hpf, mientras que en bovino los intervalos son de 36 y 50 hpf y en humano de 40 y 50 hpf (Rahman, et al. 2008).

Durante estas etapas de división se da la activación del genoma del embrión, que se caracteriza por el inicio de la actividad transcripcional del genoma embrionario. El estadio en el comienza este período depende de la especie considerada. En el ratón ocurre en la etapa de 2 células, en el embrión humano en la transición de 4 a 8 células y en bovino en la transición de 8-16 células (Latham 1999). Y continúa hasta la etapa de blastocisto, durante este periodo se promueve la expresión de genes claves durante los procesos de diferenciación y proliferación celular (Hamatani, et al. 2004).

La siguiente etapa a destacar es el periodo de compactación, donde las células adquieren una morfología de epitelio polarizado y aumenta la adhesión celular entre ellas, adquiriendo la morfología característica de una mora, por lo cual se denomina a los embriones mórulas. En ratón, el proceso de compactación se inicia en el embrión de 8 células. Nuevamente, en el caso del humano y el bovino esta etapa es más tardía, considerando el inicio de la compactación para el embrión humano en el estadio 16 células y para el bovino cuando alcanza las 32 células (Rahman, et al. 2008).

Al finalizar la compactación, las células más externas comienzan a bombear fluido desde el exterior hacia el interior del embrión, el líquido se acumula en los espacios intercelulares, que se van uniendo progresivamente y forman una cavidad que aumenta gradualmente de tamaño, a la que denominamos blastocele. A partir de este momento el embrión entra en la siguiente etapa que es la formación del blastocisto. Sin duda el evento más importante que se da durante la etapa de blastocisto es la clara diferenciación de dos linajes celulares, donde las células más internas forman la masa celular interna o ICM por su nombre en inglés "Inner Cell Mass", y que dará origen al futuro embrión, y las células más externas que rodean a la ICM formaran el trofoectodermo que dará origen a la placenta (Zernicka-Goetz, et al. 2009). En algunas especies como el ratón, se ha observado que esta diferenciación temprana entre células de la ICM y del trofoectodermo tiene lugar en el estadio de mórula (Zernicka-Goetz., 2015).

1.6 Sistema cannabinoide en reproducción

La descripción del sistema endocannabinoide (SEC) y la presencia de receptores CB1 y CB2 se han descrito tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos (Figura 1.8). Estos hallazgos han dado lugar a una intensa investigación sobre las funciones desempeñadas por este sistema. Muchas de estas funciones se han determinado a partir del estudio de los efectos del uso lúdico de cannabis, mientras que otras lo han sido a partir de los efectos de la administración de cannabinoides en modelos animales y sistemas *in vitro*. El consumo de cannabis es un hábito que se ha extendido entre las personas en edad reproductiva y se ha llegado a asociar con problemas de fertilidad. Para esta tesis nos centraremos en describir más en detalle las implicaciones que tiene a nivel del sistema reproductivo tanto en hembras como en machos.

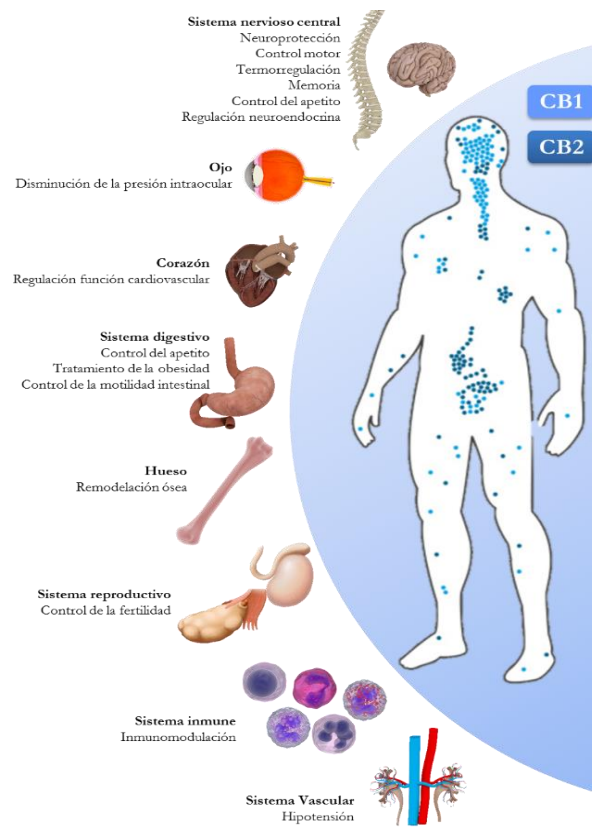


Figura 1.8: Acciones del sistema endocannabinoide en diferentes sistemas y órganos. Se muestra la presencia de receptores en azul claro CB1 y azul oscuro CB2. (Modificado de Carracedo 2006)

El SEC está implicado en eventos reproductivos como la gametogénesis, la fecundación, la implantación, la placentación, la preñez y el parto. Por lo tanto, este sistema ha sido propuesto como posible biomarcador para predecir el potencial reproductivo en la práctica clínica. A continuación describiremos de forma general la presencia del sistema cannabinoide y sus componentes en diferentes tejidos reproductivos así como los efectos que pueden generar en procesos fisiológicos asociados a la reproducción. Para esto hemos revisado lo aportado por los diferentes modelos animales, así como la investigación que se ha realizado en patologías reproductivas y en la práctica clínica de la reproducción asistida en humanos.

1.6.1 Sistema cannabinoide en la fertilidad de la hembra

1.6.1.1 Ovario y ovocito

Una de las primeras observaciones que centraron las investigaciones en cannabinoides hacia el sistema reproductivo, fue el hallazgo de la presencia de AEA en el fluido folicular (Schuel, et al. 2002a) y la alteración de sus niveles en el plasma durante la ovulación y la preñez temprana (El-Talatini, et al. 2009b). Además, tanto la AEA como las enzimas que la metabolizan fueron localizadas en el ovario humano (El-Talatini, et al. 2009a). Más tarde se demostró la presencia de CB1 y CB2 al igual que las enzimas NAPE-PLD, FAAH y MGLL en diferentes pasos del desarrollo folicular y durante el proceso de maduración de

ovocitos en diferentes especies como humanos y rata (Agirregoitia, et al. 2015a, Agirregoitia, et al. 2016, Bagavandoss and Grimshaw 2010). Sin embargo, todavía no se han descrito durante el proceso de maduración el comportamiento de los receptores para especies como ratón y vaca. Curiosamente, la AEA medida en el líquido folicular de mujeres sometidas a una hiperestimulación ovárica controlada para ser sometidas a técnicas de reproducción asistida como FIV e ICSI, fue mayor en los folículos con ovocitos maduros que en aquellos con ovocitos inmaduros (El-Talatini, et al. 2009b). También se han encontrado altas concentraciones de AEA a nivel de sangre periférica durante el momento de la ovulación (El-Talatini, et al. 2009b) y por otra parte, niveles más bajos (<2 nM) son necesarios para el éxito del embarazo (Habayeb, et al. 2004), lo cual correlacionan con altos niveles de FAAH en los linfocitos periféricos (Maccarrone, et al. 2000). Estos datos soportan la idea que los endocannabinoides podrían estar regulando la maduración en ovocitos, ejerciendo sus efectos durante la foliculogénesis (Maccarrone, et al. 2002, Schuel, et al. 2002b)

1.6.1.2 Transporte oviductal

Si continuamos a través del viaje que el ovocito sigue camino a la fecundación, encontramos nuevamente la presencia de AEA en el tracto oviductal (Gervasi, et al. 2013, Schuel 2006), lo cual ubica al sistema cannabinoide no sólo en la fisiología del ovario sino también durante los procesos de ovulación, fecundación y desarrollo embrionario temprano. Se ha demostrado, en el modelo murino, que CB1 regula el transporte oviductal, observando que tanto el silenciamiento genético como farmacológico de este receptor causan retención de los embriones en el oviducto (Wang, et al. 2006b). Este efecto está mediado por un equilibrio crítico entre la síntesis de AEA por NAPE-PLD y su degradación por FAAH en el epitelio oviductal, creando así lo que se conoce como "tono endocannabinoide" (Schuel 2006). A nivel de clínica reproductiva, este tipo de regulación cobra gran importancia debido a que la retención de embriones en el oviducto se asocia con un mayor riesgo de presentación de embarazos ectópicos. Curiosamente, las mujeres que padecen este tipo de patología presentan una expresión atenuada tanto del receptor CB1 como de la enzima FAAH, a nivel de los oviductos o trompas de Falopio (Gebeh, et al. 2012, Horne, et al. 2008).

1.6.1.3 Interacción ovocito-espermatozoide

El proceso de fecundación es otro de los eventos reproductivos controlado posiblemente por el SEC. Como ya hemos descrito, la presencia de receptores y enzimas en ambos gametos permite pensar que la interacción de los espermatozoides con ovocitos está regulada de alguna forma, por la señalización a partir de cannabinoides, teniendo en cuenta además, que dicha interacción se da dentro del ambiente del ámpula oviductal, sensible también a esta señalización. Es bien sabido que el oviducto funciona como reservorio de semen. Previo al proceso de fecundación, la interaccionan de los espermatozoides con las células del oviducto permite prolongar su vida y retrasar el proceso de capacitación hasta que las señales asociadas a la ovulación se produzcan (Hunter 2008). Un informe reciente ha documentado que el espermatozoide de toro y las células epiteliales del oviducto en la vaca expresan ambos receptores, CB1 y CB2, así como la AEA y la hidrolasa FAAH (Gervasi, et al. 2009). En este estudio se demostró que la unión de AEA a los receptores CB1 disminuía la unión de los espermatozoides a las células oviductales y que la adición de

SR141716A o AM251, ambos antagonistas selectivos para CB1, bloqueaba completamente la señalización de la AEA y aumentaba la unión al epitelio oviductal, mientras que los antagonistas selectivos a CB2 eran ineficaces, lo que indica que sólo CB1 estaba involucrado. Curiosamente la motilidad progresiva no fue inhibida, ni la reacción acrosomal fue inducida (Gervasi, et al. 2011). Finalmente, existe un gradiente de concentración de AEA en el oviducto proximal (Schuel, et al. 2002b) y una vez que las células espermáticas están expuestas a la reducción de la concentración de AEA, finalmente alcanzan la capacitación espermática. Además de revelar una nueva función dentro de los posibles mecanismos que regulan el SC, estos estudios de interacción entre gametos tienen un importante potencial clínico para el tratamiento de la infertilidad masculina.

1.6.1.4 Desarrollo embrionario temprano

La presencia de receptores cannabinoides durante el desarrollo embrionario temprano hace al embrión objetivo de la señalización por cannabinoides. Se ha descrito en el modelo murino que CB1 se expresa en embriones desde el final del estadio de 2 células hasta el estadio de blastocisto. Por el contrario, CB2 se expresa en embriones desde el estadio de 1 célula hasta el estadio de blastocito (Paria, et al. 1995). En esta última etapa y previo a la implantación, la expresión de CB1 se observa principalmente en las células del trofoectodermo, mientras que la expresión CB2 está restringida principalmente a la masa celular interna (Paria, et al. 1995). Además de la presencia de estos dos receptores, FAAH también está presente en los embriones de 1 y 2 células, pero ausente en los estadios de 4 y 8 células; sin embargo, es nuevamente detectable en el estadio de blastocisto al día 4 previo a la etapa de implantación (Paria, et al. 1999).

La generación de ratones knockouts para CB1, CB2, y FAAH ha proporcionado información valiosa para estudiar los efectos de la señalización de los cannabinoides. Los embriones recuperados de oviductos en el día 3 pc y de útero en el día 4 pc, provenientes de los genotipos knockouts para CB1 (*Cnr1*^{-/-}) y doble knockouts para CB1 y CB2 (*Cnr1*^{-/-} / *Cnr2*^{-/-}) mostraron un retraso en su crecimiento en comparación con los embriones derivados de hembras de tipo salvaje (*WT*) (Paria, et al. 2001). Sin embargo, los embriones en condición de heterocigosis recuperados de hembras *Cnr1*^{-/-} cruzadas con machos *WT*, que tendrían el fenotipo de retención en oviducto como se mencionó anteriormente, mostraron un desarrollo normal (Wang, et al. 2004). Esto permite pensar que la retención oviductal no es la causante del retraso en el desarrollo de los embriones, y muy posiblemente, este retraso sea por la falta de CB1 durante los procesos que competen al ovocito como la maduración.

En cuanto al efecto de los cannabinoides durante el desarrollo preimplantacional, se ha visto que niveles altos de AEA, 2-AG, Δ^9 -THC, o un agonista cannabinoide sintético, WIN55212-2, detenían el desarrollo de embriones entre los estadios de 2 células a blastocistos (Paria, et al. 1998, Paria, et al. 1995). Otro estudio revela que los blastocistos tratados con altos niveles de AEA disminuyeron el número de células del trofoectodermo, y además retrasaron el proceso de eclosión (Schmid, et al. 1997, Yang, et al. 1996). Este resultado también es apoyado por la observación de cultivos de trofoblasto *in vitro*, donde

concentraciones bajas de AEA, del orden de 7 nM, promueven el desarrollo, mientras que niveles más altos (28 nM) lo retrasan (Wang, et al. 1999).

1.6.1.5 Implantación

La implantación se produce sólo cuando el blastocisto es competente para implantarse y el útero alcanza la fase receptiva. La ventana de la receptividad uterina es transitoria, y una implantación retardada puede tener un efecto adverso y comprometer la gestación (Paria, et al. 1993, Sun and Dey 2008). Los endocannabinoides AEA y 2-AG, así como el receptor CB1, y las enzimas que regulan el sistema, están presentes en el útero de ratón (Sun and Dey 2008).

Se han observado niveles más altos en la expresión y activación de NAPE-PLD en los sitios inter-implantación. En contraste, en los sitios de implantación se observan bajos niveles de NAPE-PLD y mayor expresión de FAAH. Los patrones de expresión de NAPE-PLD y FAAH se encargan de mantener niveles bajos de la AEA en los sitios de implantación, por lo que existe la teoría que el SC podría estar regulando los mecanismos que señalizan al embrión el sitio adecuado de la implantación (Guo, et al. 2005, Wang, et al. 2007). Otras observaciones que apoyan esta teoría son que, altos niveles de AEA u otros cannabinoides sintéticos bloquean el crecimiento e inhiben la eclosión del blastocisto (Paria, et al. 1998, Schmid, et al. 1997). Inclusive, algunos autores indican que pueden llegar a inducir procesos de apoptosis (Turco, et al. 2008). Por el contrario, niveles bajos de AEA aceleran la diferenciación de trofoblasto y su crecimiento en cultivos *in vitro* (Paria et al., 1995, Paria et al., 1998, Schmid et al., 1997). Finalmente, se ha descrito que los niveles altos de AEA observados en ratones *Faab^{-/-}* retrasan el momento de la implantación y comprometen el éxito de la gestación (Wang, et al. 2006b). En humanos también se ha reportado que niveles altos de AEA en el momento de la implantación están asociados con la pérdida espontánea de la preñez (Maccarrone, et al. 2002, Maccarrone, et al. 2000).

El mecanismo por el cual la señalización cannabinoide regula la activación del blastocisto y la receptividad uterina no está claro. Existen evidencias que indican que AEA a bajas concentraciones activa la señalización de ERK de la vía MAPK y que lo hace a través de la activación del receptor CB1, mientras que a altas concentraciones de AEA, ERK no se ve estimulada (Wang, et al. 2003). Estos resultados ayudan a explicar cómo los endocannabinoides en diferentes concentraciones modulan la activación del blastocisto.

1.6.2 Sistema cannabinoide en la fertilidad del macho

1.6.2.1 Espermatogénesis y la adquisición de las funciones del espermatozoide

Algunos elementos del SEC se han detectado durante diferentes etapas de la espermatogénesis, tanto en testículos como en espermatozoides de diferentes mamíferos. En particular, se ha observado la presencia de CB1 y CB2 en espermatozoides de humano, cerdo, bovino y ratón (Agirreagoitia, et al. 2010, Gervasi, et al. 2009, Gye, et al. 2005, Maccarrone, et al. 2005, Rossato, et al. 2005). La activación de CB1 por parte de AEA en algunos casos se asocia con una reducción de la motilidad y la reacción acrosomal

(Battista, et al. 2008), mientras que en otros se reporta un aumento de la capacitación y activación del espermatozoide (Gervasi, et al. 2011). Por otra parte, CB2 se ha localizado en espermatogonias y células de Sertoli (Maccarrone, et al. 2003), y se ha mostrado cómo su activación promueve la meiosis mediante la vía MAPK a través de la fosforilación de ERK1/2 (Grimaldi, et al. 2009). A pesar de que con el desarrollo de la espermatogénesis la presencia de este receptor disminuye (Grimaldi, et al. 2009), sigue estando presente en el espermatozoide, y en humanos se ha descrito cómo su activación específica afecta la motilidad (Agirregoitia, et al. 2010). Finalmente, en las células de Leydig también se ha observado la expresión de CB1, lo que sugiere una implicación funcional en la esteroidogénesis mediada por los cannabinoides (Cacciola, et al. 2008). En cuanto al consumo de cannabinoides exógenos y sus posibles efectos, se ha informado que el uso a largo plazo de HU-210, un análogo sintético del THC y con alta afinidad por el receptor CB1, afecta la espermatogénesis a través de la disminución en el número de células de Sertoli (M Lewis, et al. 2012).

1.6.2.2 Motilidad espermática e interacción con el oviducto

Diversas investigaciones relacionan los cannabinoides con la motilidad espermática. Estudios realizados en ratones knockouts para CB1 demostraron que cualquier interrupción de la vía de señalización de este receptor conduce a la adquisición precoz de la motilidad de los espermatozoides a lo largo del tracto reproductivo masculino (Ricci, et al. 2007). Por otra parte, también se ha observado que los espermatozoides provenientes de epidídimo carentes de FAAH, presentaban una motilidad comprometida, y consecuentemente, alteraron el proceso de fecundación, lo cual ha sido atribuido a los elevados niveles de AEA en el tracto reproductor masculino (Sun, et al. 2009).

En relación a los efectos de los cannabinoides sobre la motilidad espermática, dependen del lugar en el que se encuentre el espermatozoide y del cannabinoide al que esté expuesto. Así, a nivel de epidídimo existe un gradiente de 2-AG desde la cabeza a la cola del epidídimo y existe la hipótesis de que la disminución de 2-AG promueve la motilidad y la puesta en marcha de los espermatozoides durante el viaje a través del epidídimo (Cobellis et al. 2010). Mientras que la AEA, a través de la activación de CB1, afecta negativamente a la motilidad del espermatozoide y afecta procesos vitales en la fisiología del movimiento, como la inhibición de la actividad mitocondrial (Rossato, et al. 2005), la respiración celular (Badawy, et al. 2009) y de la glucólisis (Barbonetti, et al. 2010). Se debe recordar que la presencia de un gradiente oviductal de AEA podría tener un impacto en las propiedades fertilizantes de células de espermáticas, participando en los complejos mecanismos que regulan el almacenamiento de espermatozoide, la capacitación y la selección dentro del oviducto (Talevi, et al. 2010, Wang, et al. 2006b).

En el caso de la interacción del espermatozoide con las células del oviducto se ha propuesto que la AEA estimula la adhesión en los reservorios de semen disminuyendo la motilidad y el metabolismo, lo cual es importante para prolongar la vida fértil del espermatozoide hasta el momento de la ovulación (Gervasi, et al. 2009) y esta hipótesis es apoyada por otros autores que asocian la disminución en la motilidad producida por la AEA podría actuar como una señal capacitante (Maccarrone, et al. 2005) ya que la interacción del

espermatozoide con los reservorios del oviducto esta descrito como un evento favorable para la capacitación.

1.6.3 El sistema cannabinoide como biomarcador de fertilidad

Los datos descritos en los apartados anteriores ponen de manifiesto que la activación o alteraciones de cualquiera de los componentes del SC pueden afectar la regulación de diferentes fases de la reproducción y poner en peligro la fecundación y el comienzo de una nueva vida. Por esta razón se comienzan a estudiar a los cannabinoides como posibles biomarcadores en el diagnóstico de la infertilidad o como posibles dianas terapéuticas para su tratamiento en la práctica clínica (Di Blasio, et al. 2013, Rapino, et al. 2014).

En lo que se refiere a la hembra, ya hemos visto como la concentración de AEA en líquido folicular puede ser un indicativo de maduración ovocitaria para seleccionar los ovocitos adecuados para tratamientos de fecundación *in vitro* (El-Talatini, et al. 2009b). Durante el embarazo temprano, la medición de AEA durante la fase lútea puede indicar el nivel de receptividad uterina, lo que podría ser de gran ayuda en el momento de la transferencia para obtener mayores tasas de implantación (El-Talatini, et al. 2009b). La medición de AEA en sangre, o la actividad de FAAH en linfocitos periféricos, permitiría controlar el riesgo de aborto, ya que mujeres que presentan abortos espontáneos durante las primeras 8 semanas, presentan un mayor nivel de AEA circulante que embarazos sanos (Maccarrone, et al. 2002, Maccarrone, et al. 2000). Este mismo patrón se observa en la presencia de patologías como en embarazo ectópico y para las mujeres que no lograron alcanzar un embarazo a término después de ser sometidas a técnicas de reproducción asistida (Gebeh, et al. 2012). Como nota final, un estudio reciente ha demostrado la expresión diferencial de NAPE-PLD y FAAH en la placenta con preeclampsia comparada con placenta normal (Aban, et al. 2013). Por lo anteriormente expuesto, se podría sugerir que los niveles de AEA y/o la actividad FAAH podría ser interesantes biomarcadores que se podrían añadir a los diagnósticos que ya se realizan a nivel clínico para distinguir un embarazo viable de uno no viable (Daponte, et al. 2013, Nicolaides, et al. 2014).

En lo referente al macho, el análisis de semen que se realiza a nivel clínico utiliza diversos parámetros como la concentración, la motilidad y la morfología de los espermatozoides, para cuantificar la calidad espermática. En esto contexto, algunos estudios han demostrado que los niveles de cannabinoides en plasma seminal disminuyen en los hombres infértiles con normozoospermia que estaban diagnosticados como infértiles, además de estar igualmente disminuidos en otras patologías como asthenozoospermia, oligoastenoteratozoospermia, y teratozoospermia (Amoako, et al. 2013, M Lewis, et al. 2012). Sería interesante determinar si la evaluación de componentes del sistema cannabinoide, como los receptores en las células espermáticas, o la presencia de cannabinoides en el plasma seminal podría ser un indicio de anomalías de espermatozoide, y por tanto, podría ser utilizado como una herramienta de diagnóstico en el campo de la medicina reproductiva.

En la actualidad el análisis clásico de semen no es una prueba perfecta y en muchos casos no puede predecir con precisión la capacidad para fecundar el ovocito (Guzick, et al. 2001, Jequier 2010). En los

últimos años, se han desarrollado un número de pruebas para evaluar más específicamente la calidad del ADN de espermatozoide con el que se va a fecundar, lo cual puede ser más informativo y relevante a nivel clínico (Vasan 2011). En este contexto, estudios recientes han explorado la posible implicación de la señalización CB1 en remodelación de la cromatina de las espermátidas de ratón (Cacciola, et al. 2013), se ha observado que la inactivación genética de CB1 parece aumentar la retención de histonas y disminuye la expresión de genes que tienen un papel directo en el mantenimiento de la integridad del ADN (Chioccarelli, et al. 2010). La retención de histonas está asociada a una mala calidad de la cromatina en espermátidas y podría afectar la longitud nuclear del espermatozoide maduro (Johnson, et al. 2011), algunos autores basándose en este concepto sugieren que podría ser utilizado como biomarcador para identificar morfológicamente espermatozoides normales y con buena calidad de la cromatina (Cacciola, et al. 2013).

2. Objetivos

Objetivo general

El objetivo de esta tesis es contribuir al conocimiento del sistema cannabinoide sobre la fisiología de los gametos, tanto ovocito como espermatozoide, describiendo cuales pueden ser los posibles efectos que producen los cannabinoides y cuáles pueden ser las vías de actuación. Este objetivo global se puede separar en tres objetivos generales relativos a los tres capítulos experimentales de la tesis:

Objetivos 1ª parte

La maduración *in vitro* (MIV) supone una alternativa para evitar la administración de fármacos para la estimulación ovárica. Actualmente se hace necesario mejorar los protocolos de maduración *in vitro* buscando compuestos que puedan impulsar las señales que conlleven a una adecuada maduración. El objetivo general de esta primera parte es analizar la importancia de la señalización cannabinoide, así como las señales que desencadena la activación de los receptores CB1 y CB2 durante la maduración, y cómo estas pueden afectar el reinicio de la meiosis, la fecundación y el posterior desarrollo embrionario.

Objetivos específicos

1. Analizar la dinámica de expresión y localización de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 durante las diferentes etapas de la maduración y el posterior desarrollo embrionario en el modelo murino.
2. Evaluar mediante el uso de modelos knockout *Cnr1^{-/-}*, *Cnr2^{-/-}* y *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* si la ausencia de los receptores cannabinoides afecta a los procesos de maduración, fecundación y desarrollo embrionario temprano.
3. Determinar el efecto de la adición de cannabinoides durante la maduración en la fosforilación de las proteínas AKT y ERK1/2, fundamentales en el reinicio de la meiosis.
4. Evaluar si la adición de cannabinoides durante la etapa de maduración afecta al posterior desarrollo embrionario.

Objetivos 2ª parte

A pesar de que el modelo murino muestra similitudes con el humano en la ubicación de los receptores cannabinoides durante la maduración del ovocito, se hace necesario evaluar otros modelos animales más similares al humano en cuanto a la fisiología ovárica y los procesos que se dan durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Menezo, et al. 2000). El objetivo general de la segunda parte es utilizar el modelo bovino de maduración *in vitro* para analizar la dinámica de expresión y localización de los receptores cannabinoides y determinar si su activación durante la maduración modula vías de señalización que afectan el reinicio de la meiosis y la calidad posterior de los embriones producidos.

Objetivos específicos

1. Analizar la dinámica de expresión y localización de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 durante las diferentes etapas de la maduración y el posterior desarrollo embrionario en el modelo bovino.
2. Determinar el efecto de la adición de cannabinoides durante la etapa de maduración en la fosforilación de las proteínas AKT y ERK 1/2 y sus posibles efectos en el reinicio de la meiosis y el desarrollo embrionario.
3. Evaluar la calidad de los embriones producidos a partir de ovocitos expuestos a cannabinoides

Objetivos 3ª parte

Conociendo la presencia de los receptores cannabinoides en espermatozoides de diferentes especies, y debido a que algunos autores han asociado el consumo de *Cannabis* o la incubación de los espermatozoides con compuestos cannabinoides con efectos sobre la motilidad, **el objetivo general de la tercera parte es analizar el efecto de los cannabinoides en los espermatozoides de ratón, analizando su efecto *in vitro* o en un modelo de consumo crónico de THC, determinando el efecto sobre su motilidad, su viabilidad espermática y su capacidad para fecundar y producir embriones.**

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de un tratamiento agudo con dosis crecientes de THC sobre los parámetros de motilidad espermática.
2. Evaluar si el tratamiento crónico de THC afecta la expresión del receptor CB1 y determinar si la regulación obedece a mecanismos epigenéticos.
3. Estudiar los efectos del consumo crónico de THC en el sistema reproductivo a nivel macroscópico evaluando el peso de testículos y epidídimos, y a nivel microscópico analizando cambios en la espermatogénesis a nivel de los túbulos seminíferos.
4. Determinar la capacidad para fecundar y producir embriones *in vitro* de espermatozoides sometidos a un tratamiento crónico de THC.

3. Materiales y Métodos

3.1 Animales

Todos los animales utilizados en el desarrollo de esta tesis fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y con ciclos de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, y se les dio libre acceso a agua y comida. Todos los procedimientos experimentales con ratones fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), con el número de permiso CEEA2012 / 021, y se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio avalado por la Sociedad para el Estudio de la Reproducción y la legislación europea. Los animales para todos los experimentos se sacrificaron por dislocación cervical evitando al máximo el sufrimiento del animal.

3.1.1 Animales de genotipo salvaje (WT)

Animales híbridos de la línea B6D2F1, producidos mediante el cruce de hembras C57BL6/J con machos DBA/2 (Harlan Iberica SL), se utilizaron como donantes de ovocitos y espermatozoides. Las hembras destinadas a ser receptoras para los experimentos de transferencia de embriones fueron de la línea CD1 (Harlan Iberica SL).

Para la realización de los experimentos que requerían la comparación de un genotipo WT con los genotipos knockouts, se utilizó la línea C57BL6/J (Harlan Iberica SL) como donante de ovocitos, espermatozoides o embriones, con el objetivo de que tuviese el mismo fondo genético que los modelos knockout.

3.1.2 Animales knockouts para receptores CB1, CB2 y doble KOs

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron diferentes modelos en los que se eliminaron los genes CB1 (*Cnr1^{-/-}*), CB2 (*Cnr2^{-/-}*) o ambos receptores (*Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}*) para la obtención de ovocitos o embriones, tanto para los trabajos *in vivo* como *in vitro*.

Los genotipos *Cnr1^{-/-}* y *Cnr2^{-/-}* fueron donados por *El Grupo de Señalización por Cannabinoides*, que pertenece al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de las Facultades de Ciencias Químicas y Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Con estos animales se estableció una colonia permanente en nuestro laboratorio, mantenidas siempre en homocigosis. Para la generación del tercer genotipo *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* o doble knockouts para ambos receptores, fueron cruzados hembras y machos de los genotipos *Cnr1^{-/-}* y *Cnr2^{-/-}* según leyes mendelianas hasta obtener fundadores doble knockouts, con los que se estableció la colonia para este genotipo.

3.1.2.1 Cría

Los procesos de cría y producción de animales se realizaron según la recomendación del departamento de Reproducción Animal del INIA. Brevemente, la creación de los cruces para el mantenimiento de las líneas se realizó teniendo en cuenta una proporción de dos hembras por macho, las

camadas obtenidas se destetaron a los 21 días postparto y fueron separados diferenciando machos de hembras.

3.1.2.2 Obtención de ADN de tejido de ratón para genotipado

Al día 12 post-parto se cortó un trozo de cola del animal y se incubo en 35 µl de una solución tampón compuesta por [Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, SDS 0.5% (p/v), pH 7.4] y 20 mg/mL proteinasa K (Sigma P-8044) durante toda la noche a 55°C. Al día siguiente se adicionó 200 µl de ddH₂O diluir la muestra, y se realizó agitación intensa, seguido de centrifugación a 10,000 rpm × 5 minutos a temperatura ambiente (TA).

El genotipado de los animales se realizó por PCR convencional con 1 µl de la solución anterior, una muestra del resultado se muestra en la **Figura 3.1**. Los oligonucleótidos y condiciones de PCR quedan recogidos en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1 Oligonucleótidos utilizados para el genotipado

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Producto (pb)</i>	<i>Condiciones (Tm y ciclos)</i>
<i>Cnr1</i>	P1	5' GCTGTCTCTGGTCCCTCTTAAA 3'	WT:400	54 °C, 35 ciclos
	P2	5' GGTGTCACCTCTGAAAACAGA 3'	KO: 300	
	P3	5' CCTACCCGGTAGAATTAGCTT 3'		
<i>Cnr2</i>	P1	5' AAATGCTTGATTGGTGTTCAGCTCTC 3'	WT: 1000	54 °C, 35 ciclos
	P2	5' GGCTCCTAGGTGGTTTTCACATCAGCCTCT 3'	KO: 800	
	P3	5' TAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTT 3'		

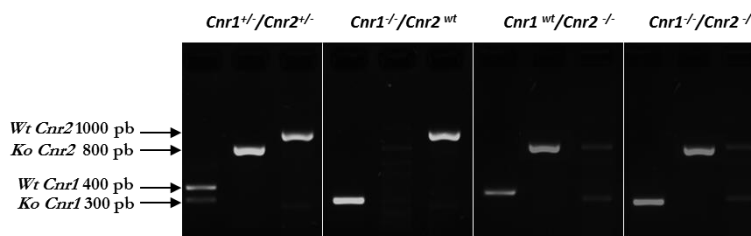


Figura 3.1 Ejemplo de resultado del genotipado de ratones control para la pcr en heterocigosis para ambos genes *Cnr1*^{+/-}/*Cnr2*^{+/-}, y de los diferentes genotipos de los animales transgénicos utilizados: *Cnr1*^{-/-}, *Cnr2*^{-/-} o doble knockout *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-}.

3.2 Producción de embriones *in vitro* en el modelo murino

3.2.1 Obtención de complejos cúmulo-ovocito (CCOs)

Se utilizaron hembras de 8-10 semanas de edad para tener una cantidad suficiente de CCOs en la recuperación ovárica después de la superovulación. Las hormonas utilizadas, tanto el suero de yegua preñada (PMSG) (Folligon®), como la Gonadotropina coránica humana (hCG) (Veterincorion® Equinvest), se utilizaron a 7.5 UI disueltas en suero fisiológico en inyecciones de 0,1 mL por animal. En el caso que los ovocitos fueran destinados para maduración *in vitro*, se realizó solo la inyección de PMSG. Para la obtención de ovocitos madurados *in vivo* y/o producción de embriones que no implicara maduración *in vitro*, se inyectaron las dos hormonas con un intervalo de 48 h entre ambas.

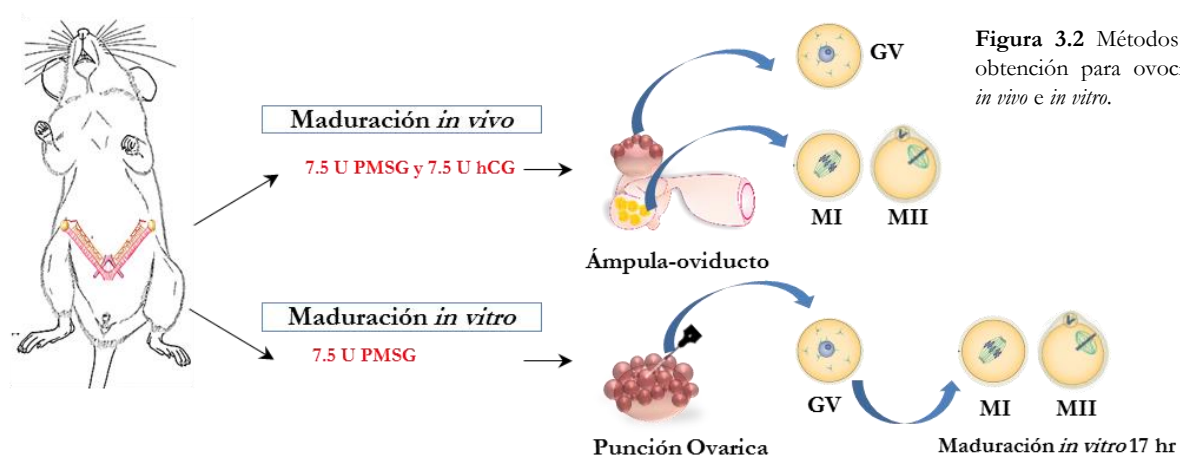


Figura 3.2 Métodos de obtención para ovocitos *in vivo* e *in vitro*.

3.2.2 Maduración *in vitro* de ovocitos

Este protocolo describe los pasos a seguir para madurar ovocitos murinos *in vitro*. Está basado en trabajos previos (Martin-Coello, et al. 2008) con modificaciones realizadas en el departamento de Reproducción Animal del INIA. Para la obtención de CCOs para maduración *in vitro*, los animales se sacrificaron por dislocación cervical entre 48 y 50 h después de la administración de PMSG. Se realizó una incisión en forma de "V" desde el abdomen inferior extendiéndose hacia los laterales del diafragma, con objeto de exponer todos los órganos de la cavidad peritoneal. Los ovarios se extrajeron, se limpiaron totalmente de la grasa y se colocaron en placas de 35 mm con medio M2 para realizar la punción de los folículos visibles utilizando una aguja de calibre 30-G (Figura 3.2).

Seguidamente se hizo la selección de los CCOs, todos ellos en estadio de GV, teniendo en cuenta la uniformidad del citoplasma y la presencia de células de granulosa rodeando totalmente al ovocito (**Figura 3.3**). El tiempo de punción y selección no superó los 30 minutos para evitar el detrimento en la calidad de los CCOs recuperados.

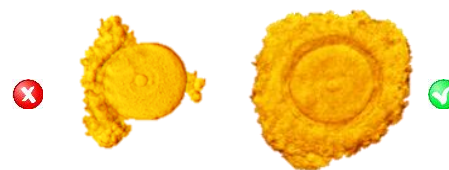


Figura 3.3: Criterios de selección de CCOs para maduración *in vitro*.

Como medio de maduración, se utilizó TCM-199 (Sigma-4530) suplementado con 0.5% de gentamicina (Sigma G-1272), 0,01 mg/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF; Sigma E-4127) y 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB). Los CCOs seleccionados se lavaron dos veces en medio M2 y una tercera vez en medio de maduración, se dividieron en grupos de entre 30 y 40 CCOs y se incubaron a 37°C en una atmósfera controlada de 5% de CO₂ y humedad saturada durante 17 h en placas Nunc de 4 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) que contenían 500 µl de medio de maduración. La suplementación con los compuestos cannabinoides y/o el vehículo se hizo en el medio de maduración 5 minutos antes de poner los CCOs para evitar su degradación. Cumplido el tiempo de incubación, los CCOs se utilizaron para la fecundación *in vitro* o para los análisis pertinentes que se describen en apartados posteriores.

3.2.2.1 Incubación con agonistas y antagonistas para CB1 y CB2

Durante la maduración, los CCOs se incubaron con diferentes dosis de un agonista para CB1 el HU-210 [(6aR,10aR)-3-(1,1-Dimethyl-heptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran -9-methanol], y un agonista selectivo para el receptor CB2 JWH-015 [2-methyl-1-propyl-1H-indol-3-yl)-1-naphtalenyl-methanone]. Las soluciones stock de HU-210 y JWH-015 se prepararon en DMSO debido al carácter lipofílicos de los compuestos utilizados. Grupos de 30 y 40 CCOs se expusieron a ambos cannabinoides, HU-210 y JWH-015, partiendo de concentraciones similares a las encontradas a nivel fisiológico en el plasma durante la fase folicular, 1 nM (Lam, et al. 2008). Siguiendo este parámetro se eligieron dosis crecientes de 1 nM, 10 nM y 100 nM, para evaluar el efecto en la activación de los receptor cannabinoides. Como control, uno de los grupos de CCOs se cultivó con la misma cantidad de DMSO que se usó para añadir los compuestos cannabinoides.

Para establecer la especificidad de la acción agonista de CB1 y CB2, se realizaron experimentos de antagonismo utilizando una dosis máxima de 100nM de SR141716A [N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride], también conocido como SR1, y de SR144528 [5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-[(4-methylphenyl)methyl]-N-[(1S,2S,4R)-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-1H-pyrazole-3-carboxamide], también conocido como SR2, antagonistas selectivos para los receptores CB1 y CB2 respectivamente. Estos compuestos también se prepararon en DMSO para garantizar su solubilidad. Para asegurar que se unieran adecuadamente a los receptores antes que los compuestos cannabinoides, y así evitar una posible activación prematura, los antagonistas se adicionaron en

primer lugar y en segundo lugar se adicionó el agonista. Finalmente, se realizó un grupo control utilizando solo los compuestos SR1 y SR2 para determinar si estos por sí mismos inducían algún efecto en la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario. HU-210, SR1 y SR2 fueron donados por Guillermo Velasco e Ismael Galve-Roperh (UCM, Madrid).

3.2.3 Maduración *in vivo* de ovocitos

Para obtener ovocitos madurados *in vivo*, las hembras se sacrificaron por dislocación cervical 14 h después de la administración de hCG. Se realizó una laparotomía mediante incisión en forma de "V" desde el abdomen inferior extendiéndose hacia los laterales del diafragma, con el fin de exponer todos los órganos de la cavidad peritoneal. Los oviductos se extrajeron realizando un corte entre el ovario y el infundíbulo, y entre la parte caudal del oviducto y la parte craneal del cuerno uterino, y se colocaron en placas de 35 mm con medio M2. Con ayuda de pinzas #5 se realizó la punción del ámpula para recuperar el cúmulo de ovocitos que ya han reiniciado meiosis y suelen encontrarse en estadio de MII y/o MÍ. Para la obtención de GV se realizó una punción ovárica de los folículos que no llegaron a ovular pero que lograron tener estimulación de ambas hormonas (**Figura 3.2**).

3.2.4 Fecundación *in vitro* (FIV)

La FIV se realizó siguiendo el método descrito por Martín-Coello y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. Se utilizó el medio HTF (*Human Tubular Fluid*) suplementado con 2 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA), tanto para la preparación del semen como para la con-incubación de los gametos (Quinn, et al. 1985).

3.2.4.1 Preparación de los espermatozoides

Los espermatozoides se obtuvieron de epidídimos de machos de fertilidad probada de la línea B6D2F1. El sacrificio se realizó por dislocación cervical y se extrajo en una placa de 35 mm la cola del epidídimo y parte del conducto deferente. Seguidamente, se procedió a limpiar la mayor cantidad de grasa y a retirar el vaso sanguíneo que acompaña al conducto deferente, y se transfirió la cola del epidídimo a una gota de 500 µl de HTF atemperada y cubierta con aceite mineral.

Utilizando unas pinzas, se hicieron pequeñas presiones en la base de la cola para obtener el semen. Los espermatozoides se incubaron a continuación durante 30 a 60 minutos a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad con 5% de CO₂ en aire para facilitar la disgregación. Pasado este tiempo, se realizó el cálculo de la concentración utilizando una cámara Burker.

3.2.4.2 Co-incubación de gametos

Tanto a los ovocitos madurados *in vitro* como aquellos obtenidos por superovulación *in vivo* se les realizaron dos lavados en medio HTF antes de transferirlos a placas Nunc de 4 pocillos que contenían 500 µl de HTF. Finalmente, se procedió a la inseminación con una dosis de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL. El

periodo de co-incubación de ambos gametos fue de 5 horas a 37 °C en atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂.

3.2.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Después de cumplir el periodo requerido para la fecundación, los presuntos cigotos se recogieron cuidadosamente y se transfirieron a una placa de 35 mm de medio HTF donde se eliminaron las células del cúmulo y los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida mecánicamente mediante pipeteo. Finalmente, los cigotos se lavaron dos veces en medio HTF, antes de ponerlos en cultivo en gotas de 25 µl de medio optimizado simple de potasio (KSOM+aa) (Global ®). Los embriones se cultivaron durante 5 días y se evaluó la tasa de división en el día 1, 24h después de la fecundación (hpf), y la tasa de blastocistos en día 4, (96-100 hpf).

3.2.6 Evaluación del transporte a través del tracto reproductivo

Se superovularon ratonas de los 4 grupos genotipos salvaje, *Cnr1*^{-/-}, *Cnr2*^{-/-} and *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-} (n = 6 por grupo) siguiendo el mismo protocolo de superovulación indicado en el punto 3.2.1. Las hembras fueron cruzadas con machos *WT* para la obtención de embriones y se sacrificaron el día 3.5 post-coito. Los oviductos y los cuernos uterinos se separaron y lavaron con medio M2. Todos los embriones recuperados en el lavado de los diferentes genotipos se contabilizaron (salvaje n=167; *Cnr1*^{-/-} n=117; *Cnr2*^{-/-} n=172; *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-} n=86) y se determinó su ubicación oviductal o uterina. Finalmente se realizó una clasificación de los diferentes estadios del desarrollo embrionario encontrados dentro de las siguientes categorías: ovocitos, 2 células, 4 células, mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos y blastocistos eclosionados recuperados a 3,5 dpc.

3.3 Producción de embriones *in vitro* en el modelo bovino

3.3.1 Aislamiento y maduración *in vitro* de complejos cumulo-ovocito (CCOs)

Los ovarios se obtuvieron de terneras adultas en el momento del sacrificio en los mataderos de Madrid Norte y Leganés (Madrid). Se transportaron en solución salina a una temperatura de 33-37°C. Los CCOs inmaduros se obtuvieron en un tiempo inferior a 4 h tras el sacrificio de las hembras mediante la aspiración de folículos de entre 2 y 8 mm de diámetro. El líquido folicular obtenido se dejó decantar durante 15 min y el botón celular se distribuyó en placas de 100 mm para realizar la búsqueda y selección de CCOs. Solo los CCOs con un citoplasma homogéneo y células del cumulo intactas se seleccionaron para el proceso de maduración en placas de 4 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark), utilizando 500 uL de medio de maduración TCM-199 suplementado con un 10% (v/v) de SFB y 10 mg/mL de EGF. Se maduraron grupos de 50 CCOs por pocillo durante 24h a 38.5°C con 5% de CO₂ y humedad relativa máxima (Rizos, et al. 2002).

3.3.1.1 *Suplementación durante la maduración con agonistas de cannabinoides durante la MIV*

Los CCOs se co-incubaron con los agonistas de cannabinoides HU-210 o THC. Las soluciones stock de ambos cannabinoides se prepararon en DMSO debido al carácter lipofílicos de los compuestos utilizados. La concentración final fue de 100 nM en el medio de maduración, de acuerdo con los experimentos llevados a cabo previamente donde se optimizó la dosis adecuada (López-Cardona, et al. 2014). Los CCOs incubados con y sin DMSO se usaron como controles. Se realizaron un total de 5 réplicas independientes.

3.3.1.2 *Progresión meiótica de los ovocitos bovinos madurados in vitro con cannabinoides exógenos*

Con el objetivo de determinar el impacto de HU-210 y THC en la rotura de la vesícula germinal (GVBD), los CCOs de ambos grupos experimentales, junto con el control con DMSO, se evaluaron las primeras 12 horas de maduración donde garantizando la observación del GVBD en el 100% de los ovocitos, como se ha descrito previamente (Khatir, et al. 1998). Se tomaron muestras de cada grupo a las 2, 4, 6, 8 y 12 h de la MIV (n=30 por cada estadio y grupo, en tres réplicas independientes). Brevemente, los CCOs se desnudaron parcialmente mediante agitación durante 3 min en 0,1% de hialuronidasa y fijados con paraformaldehído al 4% (Panreac, Barcelona, Spain) durante 20 min. Después, se lavaron dos veces en PBS y se incubaron en PBS con 10 µg/mL Hoechst 33342 durante 15 min. Los ovocitos se montaron en portaobjetos y cubiertos con cubre objetos para visualizar el estadio de maduración nuclear bajo un microscopio Nikon Optiphot-2 (Coy, et al. 2008).

3.3.2 **Fecundación *in vitro* (FIV)**

Después de 24 h de maduración, los CCOs se lavaron dos veces en medio de fecundación antes de ser transferidos en grupos de 50 a placas de cuatro pocillos, cada una con un volumen de 250 µl de medio de fecundación (medio FERT-TALP [Merck, Darmstadt, Germany] suplementado con 25 mM bicarbonato, 22 mM lactato sódico, 1 mM piruvato sódico, 6 mg/mL BSA libre de ácidos grasos y 10 mg/mL heparina). La pajueta que contenía los espermatozoides de toro se descongeló a 37°C durante 50 s y los espermatozoides motiles se separaron en un gradiente de densidad (BoviPure, Nidacon International, Mölndal, Sweden), centrifugados y re suspendidos en medio de fecundación. Posteriormente, 250 µl de esa suspensión se añadió a cada pocillo de fecundación para obtener una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL. Ambos gametos se co-incubaron durante 20 h a 38,5°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y humedad relativa máxima.

3.3.3 **Cultivo *in vitro* (CIV)**

Los presuntos cigotos se desnudaron mediante agitación durante 3 min y se lavaron dos veces en buffer fosfato salino (PBS) suplementado con un 3% de albúmina sérica bovina (BSA). Seguidamente, se procedió a cultivarlos en micro gotas de 25 µl de fluido sintético oviductal (SOF) (Holm, et al. 1999), suplementado con 5% de SFB bajo aceite mineral, distribuyéndolos en grupos de 25 embriones por gota.

Las condiciones para todo el periodo de cultivo de embriones fueron de 38,5°C en una atmósfera del 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, con una humedad relativa máxima. La tasa de división se evaluó en el día 2, (48 hpf) y la tasa acumulativa de blastocistos se evaluó los días 7, 8, y 9 post-fecundación.

3.4 Técnicas de imagen

3.4.1 Inmunofluorescencia de ovocitos y embriones

Para localizar inmunocitoquímicamente los receptores CB1 y CB2, se utilizaron 3 hembras WT y tres replicas independientes para obtener una muestra de 20 ovocitos de cada estadio evaluado (n=20), tanto para los ovocitos madurados *in vivo* y/o *in vitro*, como para los embriones de ratón de los diferentes estadios de desarrollo desde cigoto hasta blastocisto. En el caso de la evaluación de la localización para ambos receptores en la especie bovina y donde los ovocitos provenían solo de maduración *in vitro* se utilizaron ovarios de tres replicas independientes y se evaluaron 20 ovocitos de cada estadio de maduración (n=20).

Para los análisis de la fosforilación de AKT y ERK1/2, durante la maduración *in vitro* de ovocito de ratón en presencia o ausencia de cannabinoides, se utilizaron 20 ovocitos los cuales fueron retirados del medio de maduración a 0 y 1h para evaluar la respuesta inicial, y a las 17 h, para evaluar si los efectos en los cambios de fosforilación iniciales se mantenían hasta el final de la maduración. En el caso de la especie bovina, para analizar los mismos parámetros de fosforilación para AKT y ERK1/2 durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, en presencia o ausencia de cannabinoides, se obtuvieron 20 ovocitos del medio de maduración a 0, 5 y 30 min, para evaluar la respuesta inicial, y a las 24 h, para evaluar si la respuesta generada inicialmente por los cannabinoides producía un efecto en el ovocito maduro.

Los ovocitos /yo embriones se lavaron en PBS suplementado con un 1% de poly vinyl alcohol (PBS-PVA) (Sigma P-8136) y fijados inmediatamente en paraformaldehído al 4% (Panreac, Barcelona, Spain) durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron con PBS, y se incubaron 45 min a temperatura ambiente en PBS-PVA con un 10% (v/v) de SFB y un 1% de tritón X-100 con el fin de permeabilizar las células y permitir el marcaje de antígenos intracelulares. Por otra parte, el contenido alto de suero hizo la función de bloqueo de los lugares de unión inespecíficos. Tras este tratamiento, se incubaron durante toda la noche a 4°C en PBS-PVA, 5% de SFB normal y el primer anticuerpo deseado en cada análisis. La concentración para los diferentes anticuerpos se muestra en la **Tabla 3.4**. Tras cumplir el periodo de incubación con el anticuerpo primario, los ovocitos se lavaron dos veces y se incubaron a continuación en PBS-PVA suplementado con 5% de SFB, y 1:250 anticuerpo secundario policlonal de cabra Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados en PBS-PVA. En todos los casos, los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 5µg/mL después del segundo lavado para facilitar la determinación del estadio de maduración de cada ovocito y/o el número de células para determinar el estadio embrionario. Finalmente, cada ovocito se montó en microgotas con medio

de montaje Fluoromount G (EMS, Hatfield, UK) y se examinó con un microscopio confocal (Olympus Fluoview FV500). De la misma manera, se prepararon controles negativos en todos los experimentos omitiendo el paso del anticuerpo primario antes de la adición del anticuerpo secundario. En el caso de los receptores CB1 y CB2, se realizó un control negativo específico usando el péptido bloqueante de la misma casa comercial. Para los anticuerpos para pAKT y pERK, no se realizaron controles con péptido bloqueante debido a que ya habían sido probados previamente mediante otras técnicas como western blot donde se probó su especificidad.

3.4.2 Microscopio confocal

Se utilizaron dos modelos de microscopios para detectar la fluorescencia. Por una parte un microscopio confocal Olympus Fluoview FV500. Para captar el inmunomarcaje se utilizó un laser de argón excitando a 488 nm (azul) y recogiendo a 505-520 nm (verde). El Hoechst 33342 para el marcaje de núcleos fue visualizado con un laser de argón excitando a 405 nm (UV) y recogiendo a 440 nm (azul) pero de manera secuencial para que no se mezclaran las señales del Alexa-488 y el Hoestch 33342. Los objetivos utilizados fueron un 40X PlanApo de apertura numérica 0,85 y un 60X PlanApo de apertura numérica 1,4. Por otra parte se utilizó un microscopio de fluorescencia motorizado modelo Zeiss AccioObserver con sistema de iluminación estructurada Apotome 2. Los objetivos utilizados fueron un 40X PlanApo de apertura numérica 0,8 y un 63X PlanApo Chromat de apertura numérica 1,4.

3.4.3 Evaluación de la morfología de secciones de testículos

Los animales se sacrificaron tal y como se describe en la sección 3.1. Los testículos se extrajeron en una sola pieza, se lavaron en PBS, y se colocaron en solución de Bouin [ácido pícrico 1% (p/v), formaldehido 10% (v/v), ácido acético 5% (v/v)], donde se mantuvieron toda la noche. Al día siguiente, los testículos se lavaron varias veces y se mantuvieron en alcohol al 70%, para su envío a una empresa externa que se encargó de la inclusión del tejido en bloques de parafina y la realización de los cortes.

3.4.3.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina

Para desparafinar los portaobjetos con cortes de testículos se utilizaron pases por xilol (4 incubaciones de 4 min), y se pasaron a continuación por concentraciones decrecientes de etanol, 100, 96 y 70% (v/v), a razón de 1 min por cada solución. Seguidamente, los portaobjetos se lavaron exhaustivamente con agua corriente. Para el análisis de la morfología de los cortes de testículo, se realizó una tinción con hematoxilina Harris 3 min seguido por un lavado en agua corriente para permitir el viraje de color, seguido de una tinción con Eosina durante 1 min. Finalmente, se lavó con agua corriente y se pasó nuevamente por los pasos de alcohol creciente y finalmente por los 4 pases de xilol para nuevamente fijar la coloración. Las placas se cubrieron con medio de montaje y se utilizó un microscopio invertido Nikon Optiphot-2, para su evaluación.

3.4.3.2 Criterios de evaluación morfológica

Para la evaluación de cada animal se contaron un total de 200 túbulos seminíferos y se tuvieron en cuenta las anormalidades encontradas en otros estudios de consumo crónico de cannabinoides. En primer lugar se evaluó el total de túbulos que mostraban una actividad espermatogénica completa desde la presencia de espermatogonia hasta la presencia de espermatozoides en el lumen y en segundo lugar aquellos túbulos que no contaban con la presencia de espermatozoides en el lumen. Posteriormente se analizaron daños a nivel celular como la presencia de vacuolas en las células de sertoli, desprendimiento de células en el lumen o presencia de células gigantes asociados a daños degenerativos de las células espermáticas.

3.4.3.3 Determinación de apoptosis

Para la detección de células apoptóticas utilizamos la técnica del TUNEL (Terminal Deoxynucleotidil Transferase-mediated dUTP Nick end- Labeling). Se utilizaron cortes de testículo de 12 animales: 6 tratados con THC 10mg/kg/día durante 30 días y 6 tratados con vehículo. Para eliminar la parafina, los portaobjetos con cortes de testículos se incubaron en xilol (4 incubaciones de 4 min), y se pasaron a continuación por concentraciones decrecientes de etanol, 100, 96 y 70% (v/v), a razón de 1 min por cada solución. Seguidamente, los portaobjetos se lavaron exhaustivamente con agua corriente. Se utilizó el kit: In situ cell death detection Kit, TMR red. (ROCHE) y se siguieron las indicaciones del fabricante. El ensayo se basa en la presencia de roturas en el ADN que pueden ser identificadas mediante la desoxinucleotidil transferasa terminal o TdT, más una enzima que catalizará la adición de dUTPs que se encuentran ligados a un segundo marcador (fluorocromo). Brevemente, para la tinción se utilizaron 60 µl de reacción compuesta por 55 µl de Label Solution + 5 µl de enzima, y se añadieron 20 µl por cada punto o sección de tinción. Los portaobjetos fueron incubados a 37°C en cámara húmeda durante 1 hora, y transcurrido ese tiempo se realizaron dos lavados con PBS de 5 min cada uno. Finalmente se realizó una tinción con Hoechst 33342 10 µg/mL en PBS durante 15 min. Para realizar los controles de la técnica, una muestra del mismo tipo de tejido fue incubada con todos los componentes descritos, excepto la transferasa terminal. Las células teñidas de rojo brillante se consideraron dañadas en su ADN y, por tanto células en proceso apoptótico. Para la cuantificación se evaluaron 100 túbulos seminíferos contando el número de células positivas a TUNEL. La relación entre el número de túbulos con presencia de células TUNEL-positivas y el número total de túbulos seminíferos fue calculada y expresada como porcentaje de túbulos TUNEL positivos en cada grupo.

3.5 Tratamientos de consumo de THC en ratones para evaluar fertilidad en el macho

3.5.1 Exposición aguda a THC

La motilidad fue determinada después de 20 s de adicionar el THC a las concentraciones de 1, 10 y 100 nM, o DMSO a la suspensión de espermatozoides. La evaluación se hizo de manera inmediata con el fin de evaluar la respuesta de los espermatozoides justo cuando entran en contacto con el THC.

3.5.2 Exposición crónica a THC

Se utilizaron ratones *WT* de 21 días de edad post nacimiento (pn 21) con el fin que hubiese un efecto de del tratamiento sobre todo el ciclo de la espermatogénesis, los ratones se dividieron en dos grupos. Al grupo expuesto a THC se le administró vía intraperitoneal una dosis diaria de THC de 10 mg/kg disuelto en el vehículo: etanol:cremofor:salino 1:1:18 durante 30 días. Al grupo control se le administró la misma cantidad de vehículo durante los mismos días de tratamiento. Hasta ahora se asocian consumos crónicos a tratamientos que utilizan concentraciones entre 5 a 10 mg/k de peso /día y una duración de 20 días. La pauta de administración y la dosis que se han utilizado para este experimento se cataloga dentro de un consumo elevado con el fin de asemejarlo más a un consumo crónico.

Los estudios realizados de consumo crónico en diferentes especies que incluyen ratón, rata, monos y humanos, difieren en cuanto al compuesto, que va desde el uso propio de la planta *Cannabis sativa*, extractos de la misma que contienen diferentes cannabinoides (THC, CBD, y CBN) hasta el uso propio del THC, la vía de administración y la concentración también varía en cada experimento.

3.5.2 Evaluación de la motilidad espermática

La muestra a analizar fue colocada sobre una lámina precalentada a 37°C y fue mantenida a esta temperatura durante la evaluación de la motilidad en el microscopio Nikon Eclipse 50i microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipado con una cámara digital Basler A312f (Basler AG, Ahrensburg, Germany) capaz de grabar 25 fotogramas/s. En cada muestra se grabaron 5 videos que contenían entre 20 a 60 espermatozoides móviles en el campo y se hicieron un total de 3 repeticiones por animal. El análisis de las imágenes se realizó mediante el software *Integrated Semen Analysis System* (ISAS; Projectes i Serveis130 R+D S.L., Valencia, Spain). Los parámetros de motilidad elegidos en la evaluación: motilidad total (MT; %), motilidad progresiva (MP; %), velocidad rápida (VR; %), velocidad media (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidad curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), rectitud del movimiento del espermatozoide (STR (%))= VSL/VAP), linealidad de la trayectoria curvilínea (LIN= VSL/VCL), oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio (WOB= VAP/VCL), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza con respecto a su trayectoria promedio (ALH; μm) y frecuencia de cruces o promedio de la frecuencia (en el tiempo) con la que la trayectoria curvilínea del espermatozoide cruza la trayectoria promedio (BCF; Hz).

3.6 Técnicas de biología molecular

3.6.1 Obtención de muestras

Los ovocitos y embriones para todos los experimentos se congelaron en grupos de 10 en tubos libres de ARNasas y congelados directamente en nitrógeno líquido a -196°C . Posteriormente, se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser usados para los análisis tanto para la extracción de ARN como para la de ADN.

Las muestras de tejidos se extrajeron de la corteza cerebral y para los testículos desde la túnica albugínea hasta la rete testis. Ambos tejidos se utilizaron para extracción de ARN con el objetivo de evaluar la expresión de los receptores. En el análisis de metilación, se utilizaron corteza cerebral y embriones que provenían de las mismas muestras anteriormente descritas.

3.6.2 Análisis de la expresión génica

Los procedimientos moleculares realizados para la cuantificación de la abundancia relativa del ARN mensajero (ARNm) se llevaron a cabo siguiendo protocolos estandarizado en el grupo de Embriología molecular, células troncales y transgénesis del departamento de Reproducción Animal del descritos previamente (Bermejo-Alvarez et al. 2010).

3.6.2.1 Obtención de ARN de ovocitos y embriones

Para la extracción del ARN poliadenilado se utilizaron grupos de 10 ovocitos/embriones de cada estadio a analizar mediante el kit de extracción directa de ARNm Dynabeads® ARNm DIRECT™ Kit (DynaL Biotech, Oslo, Noruega), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones (Bermejo-Alvarez, et al. 2010). Brevemente, el protocolo de aislamiento se basa en pares de base entre los residuos de poliA en el extremo 3' de la mayoría del ARNm y los residuos de oligo (dT) unidos covalentemente a la superficie del Dynabeads®. Otras especies de ARN que carecen de una cola poliA no se hibridan con los gránulos y se eliminan fácilmente. El ARN ribosómico, el ADN, las proteínas y pequeñas moléculas de ARN (como ARN de transferencia, micro ARN y pequeños ARN nucleolares) no se unen a los gránulos y se descartan. Las muestras de ARN obtenidas se resuspendieron en $30\ \mu\text{l}$ de Tris-HCl para continuar con el protocolo de la retrotranscripción. Para los experimentos de análisis de los receptores durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario y con objeto de compensar las posibles diferencias en el contenido de ARN entre los diferentes estadios a analizar, se añadieron a cada tubo $10\ \text{ng}$ del ARN mensajero de la globina del conejo (Sigma R1253) junto con el buffer de lisis con el fin de utilizarlo como un control exógeno.

3.6.2.2 Obtención de ARN de tejidos

Para la obtención de ARN de tejido se extrajo una biopsia de aproximadamente $4\ \text{y}\ 5\ \text{mm}^3$ de muestra previamente almacenadas a -80°C en un tubo eppendorf de $1.5\ \text{mL}$. En una campana extractora de gases, y sobre hielo, se añadió Trisure™ (Bioline) a razón de $800\ \mu\text{l}$ por tubo con el fin de conseguir la lisis celular y solubilizar el ARN. Seguidamente, utilizando mezcladores, se homogenizó el tejido hasta triturarlo completamente, se dejó reposar 5 minutos y se añadieron $160\ \mu\text{l}$ de cloroformo. Las muestras se

agitaron con la ayuda de un agitador mecánico, y se dejaron reposar 3 min a temperatura ambiente, después se centrifugaron por 15 min, $12,000 \times \text{rpm}$ a 4°C . Se obtuvieron dos fases, la inferior orgánica que contenía las proteínas y el ADN, y la superior acuosa con el ARN, que se transfirió a un nuevo eppendorf. El volumen con el ARN solubilizado se mezcló con un volumen igual de isopropanol, agitando por inversión, y mantenido a -20°C durante más de una hora para permitir la precipitación de los ácidos nucleicos. Se obtuvo un precipitado blanco por centrifugación (15 min, $12,000 \times \text{g}$, 4°C). Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v). Finalmente, se realizó una nueva centrifugación y se re suspendió el precipitado de ARN en 50 μl de Tris-HCl para continuar con el protocolo de la retrotranscripción.

3.6.2.3 Síntesis de ADNc por retrotranscripción

Para eliminar posibles contaminaciones con ADN, las muestras de ARN se incubaron con 5 U de ADNasa I (DNase I zymo research E1009) en una solución tampón durante 15 min a $20\text{-}30^\circ\text{C}$. Para la síntesis del ADNc, la solución de ARN se sometió a transcripción inversa utilizando oligonucleótidos poly(I), oligonucleótidos aleatorios (Biotools, España) y la enzima transcriptasa inversa MMLV (MMLV High Performance Reverse Transcriptase, Epicentre Biotechnologies) en un volumen total de 40 μl . En un primer paso, los tubos de cada muestra se calentaron a 70°C durante 5 minutos con objeto de desnaturalizar la estructura secundaria del ARN y permitir la unión de los cebadores. Tras esta incubación, la mezcla de la reacción de la TI se completó con 100 U.I de transcriptasa inversa MMLV. Tras 10 minutos a 25°C , la mezcla se sometió a una incubación de 37°C durante 60 minutos para permitir la transcripción inversa del ARNm, seguido de una incubación de 5 minutos a 84°C para desnaturalizar la enzima.

3.6.3 PCR convencional y electroforesis en geles de agarosa

La PCR se realizó a partir de ADN extraído de cola de ratón o bien de ADNc. Se usaron reactivos de Biotools, Madrid y Promega. Para la reacción, se utilizó un 1 μl de ADN en un volumen final de 25 μl compuesto de tampón de reacción [Tris-HCl 75 mM, MgCl_2 2 mM, KCl 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, pH 9.0], oligonucleótidos 0.2 μM (cada uno), dNTPs 0.2 mM (cada uno) y 1 U de ADN polimerasa. Para la PCR, se usó un termociclador Veriti 96-well (Life Technologies). Las condiciones para llevar a cabo la pCR fueron las siguientes. Los oligonucleótidos utilizados en PCR con ADNc como molde están recogidos en las **Tablas 3.5 y 3.6**. Cuando fue posible se diseñaron oligonucleótidos de tal forma que uno de la pareja hibridase con uniones exón-exón (específicos de ARNm maduros). Salvo excepciones indicadas, los oligonucleótidos son específicos para *Mus musculus*.

El producto de la PCR se completó con un tampón de carga, concentración final [Tris-HCl, 1.7 mM, azul de bromofenol 0.005% (p/v), xileno cianol 0.005% (p/v), glicerol 10% (v/v), EDTA 10 mM, pH 7.6], y fue resuelto mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) en TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0), suplementado con GelRed (Biotium, Hayward, EE.UU.) tras la disolución de la agarosa. Tras la electroforesis, se llevó a cabo en tampón TAE. Los marcadores para la

electroforesis de ADN fueron los siguientes: para PCR, Phi-X174/HaeIII (Promega) o el PCR low ladder set (Sigma-Aldrich); para plásmidos o fragmentos grandes, Lambda/HindIII (Promega) o 1 Kb Plus Ladder (Life Technologies). El resultado se visualizó mediante un transiluminador UV, y las imágenes captadas con una cámara CCD (charged coupled device), ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.)

De cada estadio de maduración (GV, MI and MII), el ARN procedente de 20 ovocitos (n=3) se extrajo tal y como se mencionó anteriormente. Se utilizaron cuatro grupos de cDNA por grupo experimental para determinar la presencia o ausencia de ARNm para CB1, CB2, y *H2afz* como gen housekeeping. Las células fetales y las células de sertoli de animales wild type se emplearon como controles de expresión, se utilizó como un control interno *H2afz*. Los oligonucleótidos usados para la PCR se describen en la **Tabla 3.5**. Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 95°C durante 3 min, 35 ciclos de 94°C durante 15 s, 54°C durante 25 s y 72°C durante 20 min, seguido de una extensión final a 72°C durante 5 min. La mezcla se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 2%.

3.6.4 PCR cuantitativa

Utilizando el termociclador Rotorgene 6000 Real Time Cycler (Corbett Research, Sydney, Australia) la qPCR se llevó a cabo añadiendo 2 µl de ADNc de cada muestra por cada 20 µl de mezcla final de reacción con GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) y oligonucleótidos específicos recogidos en la **Tabla 3.6**. El ciclo de PCR consistió en una primera incubación de 3 minutos a 94 °C seguida de 40 ciclos de 94 °C 10 s, 56 °C 30 s y 72 °C 30 s. La abundancia relativa de los ARNm fue calculada tomando el ARNm de *H2afz* como control o housekeeping. Las medidas se realizaron por duplicado en un total de mínimo tres muestras por grupo experimental.

El análisis de los datos se realizó mediante el método del ciclo umbral comparativo (Schmittgen y Livak 2008). En este método la fluorescencia es adquirida al final de cada ciclo para determinar el ciclo umbral (cycle threshold, Ct), o ciclo por encima del cual la fluorescencia se eleva por encima de la existente en el fondo de cada muestra, y capturándola en la fase logarítmica de la curva de emisión fluorescente. En esta zona una diferencia de un ciclo equivale al doble de cantidad del producto amplificado obtenido en la PCR. En cada muestra, los valores fueron normalizados frente a la cantidad de ADN presente en la muestra sustrayendo del Ct del gen a evaluar del Ct del gen de referencia o housekeeping en nuestro caso la *H2afz* (dCt). De la misma forma, la relativización de cada grupo experimental se determinó utilizando el dCt más alto de los grupos analizados, como constante arbitraria para ser sustraída del dCt del resto de las muestras (ddCt), aplicando posteriormente ese valor a la fórmula 2^{-ddCt} . La concentración de ADN de las muestras se determinó de manera que se ajustaran al rango dinámico de la qPCR.

3.6.5 Secuenciación genómica mediante bisulfito para análisis del patrón de metilación de la región promotora del gen *Cnr1*

3.6.5.1 Extracción de ADN y tratamiento con bisulfito

Para el análisis del estado de metilación de la región promotora del gen CB1 se trabajó con ADN genómico obtenido a partir de muestras de cerebro y embriones. Las muestras fueron inicialmente digeridas con 500 µl de proteinasa K (20mg/ml) en buffer STES (50 mM Tris-HCl pH=8, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) durante 1 h a 55 °C, con posterior inactivación de la proteinasa K a 95 °C durante 5 min. Una vez digeridas, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 min, y 200 µl del sobrenadante fue utilizado para la obtención del ADN genómico mediante el método de extracción con fenol-cloroformo. El ADN genómico obtenido fue re suspendido en 100 µl de agua libre de ARNasas/ADNasas, y se procedió a su cuantificación en un espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf) mediante lectura de la absorbancia a 260 nm.

Aproximadamente 500 ng del ADN genómico de cada muestra fue tratado con bisulfito utilizando el kit MethylEdge® Bisulfite Conversion System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de conversión fue realizada añadiendo 130 µl del reactivo de conversión Bisulfite ME Conversion Reagent a cada muestra e incubando las mismas en un termociclador a 94 °C durante 8 min y 54 °C durante 60 min. Posteriormente se procedió al lavado y desulfonación del ADN convertido, empleando para ello las columnas y reactivos provistos por el kit. Finalmente, el ADN convertido fue diluido en 20 µl de buffer de elución y se procedió inmediatamente a su amplificación por PCR como se describe a continuación.

3.6.5.2 Diseño de oligonucleótidos y amplificación mediante PCR

Empleando el programa MethPrimer (www.urogene.org/methprimer/) se diseñaron 4 pares de cebadores para amplificar 3 islas CpG contenidas en la región promotora del gen CB1. El primer par de cebadores (Forward 1: 5'-GTTAGGTAGTTGAGGATTGGAGG-3', Reverse 1: 5'- AAAACTCTACA AACAACCCAACTC - 3') se utilizó en una primera reacción de PCR para amplificar un producto de 907 pb. Dicha reacción de PCR se llevó a cabo en todas las muestras en un volumen final de 25 µl conteniendo 3 µl del ADN convertido con bisulfito, 10 µM de cada cebador, 0.1 mM de dNTPs (Biotools, Madrid, Spain), 2 mM de MgCl₂, 5X GoTaq Flexi Buffer y 1U de enzima GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). El programa de amplificación fue el siguiente: 95 °C - 2 min, 5 ciclos de 95 °C - 20 seg, 50 °C - 1 min, 72 °C - 1 min y 15 seg, seguido de 30 ciclos de 95 °C - 20 seg, 50 °C - 1 min, 72 °C - 1 min y 30 seg, y finalmente una etapa de extensión final a 72 °C durante 4 min. Finalizada esta reacción, se utilizó el producto de esta primera PCR para realizar 3 reacciones de PCR anidada para amplificar las 3 islas CpG mencionadas anteriormente, utilizando para ello las siguientes combinaciones de cebadores: A) *Forward 2*: 5'- GTTAGGGAGTAGAGTAGGGTGAGGT- 3' y *Reverse 2*: 5'- TATTAATAAACCTTTATCCTACCCT - 3' para amplificar una región de 235 pb de la región promotora que contiene 26 CpG , B) *Forward 3*: 5'- AGGGTAGGATAAAGGTTTATTAATA - 3' y *Reverse 3*: 5'- CCCTAAAACCTAACTCCCTAAACTC - 3' para amplificar una región de 245 pb de la región promotora que contiene 24 CpG y C) *Forward 4*: 5'- TGATTTTITAGTGAGGTTTITGGTAATG - 3' y *Reverse 4*: 5'-

ACCTCACCTACTCTACTCCCTAAC – 3' para amplificar una región de 131 pb de la región promotora que contiene 9 CpG. En estos tres casos la PCR se realizó a partir de 2 µl de la primera PCR y utilizando el siguiente programa de amplificación: 95 °C - 3min, 35 ciclos de 95 °C - 20 seg, 54 °C - 30 seg, 72 °C - 45 seg y una etapa de extensión final a 72 °C durante 20 min. Para confirmar la presencia y el tamaño esperado de los productos de amplificación, 5 µl de cada reacción de PCR fueron sometidos a una separación electroforética a 120 V durante 20 min en un gel de agarosa al 2 % teñido con safe view.

3.6.5.3 Clonado y secuenciación

Los productos de PCR que presentaron el tamaño esperado fueron purificados con el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit (Favorgen Biotech Corp) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, los productos purificados fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) y transformados en bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5α. Las bacterias transformadas fueron luego sembradas en placas de LB agar suplementadas con ampicilina, IPTG y X-gal, y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente se seleccionaron 10-20 colonias blancas independientes por cada isla CpG/muestra analizada y mediante PCR se confirmó que dichas colonias tuvieran el inserto de interés. Las colonias positivas fueron luego crecidas durante toda la noche a 37°C en agitación a 500 rpm en medio LB con ampicilina (50 µg/ml), y se procedió luego a purificar los plásmidos utilizando el kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Tras extraer el ADN plasmídico, se determinaron los estados de metilación de las distintas islas CpG mediante secuenciación, utilizando un cebador para T7, secuencia contenida en el vector. Las muestras se enviaron al servicio de secuenciación INIA-CISA. Finalmente, las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa Codon Code Aligner. Adicionalmente se utilizó el programa CpGviewer para analizar los datos de metilación.

3.7 Otras técnicas

3.7.1 Programas utilizados

3.7.1.1 Biología molecular

- Primer-BLAST: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) Diseño de oligonucleótidos y comparación de secuencias con las bases de datos.
- CodonCode: (<http://www.codoncode.com/>) programa para alineamiento de secuencias utilizado en los análisis de los resultados de secuenciación.

3.7.1.2 Trabajo con imágenes

- FV10-ASW 3.0 Viewer de Olympus: utilizado para la operación del microscopio confocal y toma de imágenes.

- Adobe Photoshop CS3: (Adobe, San Jose, EE.UU.) Ajustes de imágenes.
- ImageJ (National Institutes of Health) Software gratuito usado para análisis de imágenes (área), y densitometría de blots.

3.7.1.3 Análisis de parámetros espermáticos

- ISAS; Projectes i Serveis130 R+D S.L., Valencia, Spain

3.7.1.3 Otros

- SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Análisis estadísticos.
- Endnote: Organización de documentos científicos y gestión de referencias

3.8 Estadística

Las pruebas estadísticas en los experimentos que requerían comparaciones múltiples, se realizaron mediante análisis simple de la varianza ANOVA de una vía, seguido de un análisis de comparaciones múltiples usando las pruebas post hoc Tukey o Bonferroni en la mayoría de los datos. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para $P < 0,05$ o $P < 0,01$. Para las comparaciones entre medias cuando se compararon dos grupos como en el capítulo 3, las diferencias se determinaron mediante el test t de Student para comparación de dos muestras independientes y se consideraron diferencias estadísticamente significativas para valores de $P < 0,05$.

3.9 Materiales

3.9.1 Reactivos

Todos los reactivos y medios usados en los experimentos fueron adquiridos en Sigma Chemical Co., a menos que se indique lo contrario.

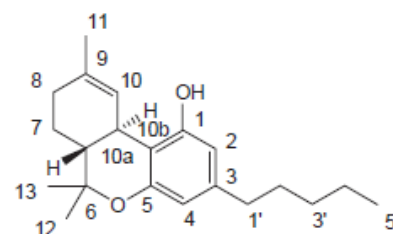
3.9.2 Agonistas y antagonistas cannabinoides

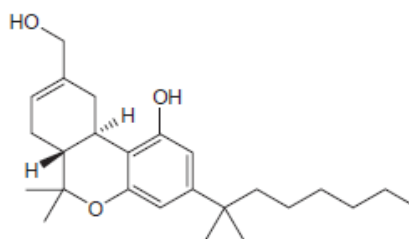
THC: (delta-9-tetrahidrocannabinol- Δ^9 -THC)

Principal constituyente psicoactivo del cannabis. Tiene afinidad por ambos receptores CB1 y CB2, aunque se ha comprobado una menor eficacia de unión hacia receptores CB1.

Referencia: 1972-08-3 THCpharm

Soluble: DMSO





HU-210: (6aR-trans-3-(1, 1-Dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-9-methanol)

Homologo sintético del THC mucho más potente, agonista a ambos receptores de cannabinoides, los valores de K_i son 0,061 y 0,52 nM en CB1 y CB2 respectivamente.

Referencia: Sigma H7909

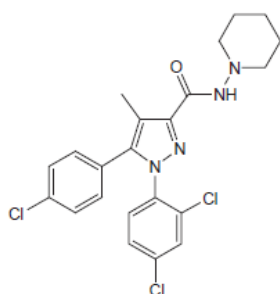
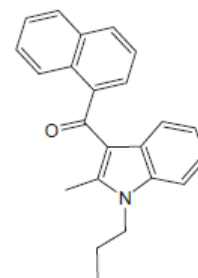
Soluble: DMSO

JHW-015: (2-Methyl-1-propyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenylmethanone)

Agonista selectivo para el receptor CB2, los valores de K_i son 13,8 y 383 nM para los receptores CB2 y CB1 respectivamente.

Referencia: Sigma H7909

Soluble: DMSO



SR1: SR1141716

También conocido como Rimonabant, es un potente antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB1.

Referencia: Sanofi–Aventis

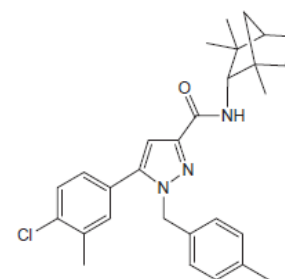
Soluble: DMSO

SR2: SR144528

Fue el primer compuesto identificado como un antagonista selectivo de los receptores CB2 selectiva. Está disponible solo para uso en investigación.

Referencia: Sanofi–Aventis

Soluble: DMSO



3.9.3 Medios para manipulación y cultivo de ovocitos y embriones murinos

3.9.3.1 Medio M2

Medio utilizado para todos los procesos de manipulación por periodos largos de tiempo fuera del incubado, también fue el medio utilizado para todos los procedimientos de recuperación de muestras, ovocitos o lavado para recuperación de embriones. **Tabla 3.2**

Tabla 3.2 Composición del medio M2

Reactivos			Cantidad	Concentración	
Orden	Nombre	Referencia	gr/L	PM	mM
1	Hepes	Sigma H-4043	4.969	238.30	20.85
2	Cloruro de Calcio (Cl ₂ Ca.2H ₂ O)	Sigma C-7902	0.252	147.01	1.71
3	Cloruro de Sodio (NaCl)	Sigma S-5886	5.533	58.44	94.68
4	Cloruro Potásico (KCl)	Sigma P-5405	0.356	74.55	4.78
5	Fosfato Potásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma P-5655	0.162	136.09	1.19
6	Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Sigma M-1880	0.293	246.47	1.19
7	Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	Sigma S-8875	0.349	84.01	4.15
8	Piruvato Sódico	Sigma P-2256	0.036	110.04	0.33
9	Glucosa Anhidra	Sigma G-7021	1	180.16	5.55
10	Lactato de Sodio 60% syrup (mL)	Sigma L-7900	3.77	112.06	33.64
11	Rojo de Fenol	Sigma P-5530	0,01	376.36	0.03
12	Penicilina	Sigma P-4687	0.0624	372.48	0.17
13	Estreptomina	Sigma S-9137	0,05	728.69	0.07
14	Disolver bien				
15	Ajustar pH, con NaOH 1M				
16	Medir Osmolaridad (250-255mosmoles)				
17	Albúmina (BSA)	Sigma A-3311	4	4mg/mL	
18	Esterilizar por filtración (filtros de 0.22µm)				
19	Rotular: Fecha de elaboración(dd/mm/aaaa)				
20	Almacenar a 4°C, usar durante 15 días				

3.9.3.2 Medio HTF

Uno de los medios de cultivo que más se han empleado en los laboratorios de FIV. Se dio a conocer con el nombre de HTF (Human Tubal Fluid) y consiste en una solución salina balanceada, libre de aminoácidos y en la que la concentración del ión potasio es igual a la del tracto reproductor femenino.(Quinn, et al. 1985). **Tabla 3.3**

Tabla 3.3 Composición del medio HTF

Orden	Reactivos		Cantidad	Concentración	
	Nombre	Referencia	gr/L	PM	mM
2	Cloruro de Calcio (Cl ₂ Ca.2H ₂ O)	Sigma C-7902	0.3	147.01	2.04
3	Cloruro de Sodio (NaCl)	Sigma S-5886	5.9375	58.44	101.60
4	Cloruro Potásico (KCl)	Sigma P-5405	0.3496	74.55	4.69
5	Fosfato Potásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma P-5655	0,0504	136.09	0.37
6	Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Sigma M-1880	0.0492	246.47	0.20
7	Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	Sigma S-8875	2.1	84.01	25.00
8	Piruvato Sódico	Sigma P-2256	0.0364	110.04	0.33
9	Glucosa Anhidra	Sigma G-7021	0.5	180.16	2.78
10	Lactato de Sodio 60% syrup (mL)	Sigma L-7900	3.42	112.06	30.52
11	Rojo de Fenol	Sigma P-5530	0.004	376.36	0,01
12	Penicilina	Sigma P-4687	0.075	372.48	0.20
13	Estreptomina	Sigma S-9137	0,05	728.69	0.07
14	Disolver bien				
15	Ajustar pH, con NaOH 1M				
16	Medir Osmolaridad (250-255mosmoles)				
17	Albúmina (BSA)	Sigma A-3311	4	4mg/mL	
18	Esterilizar por filtración (filtros de 0.22µm)				
19	Rotular: Fecha de elaboración(dd/mm/aaaa)				
20	Almacenar a 4°C, usar durante 15 días				

3.9.3.3 KSOMaa

Para el cultivo de embriones de ratón se utilizó el medio KSOM comercial MTI-GlobalStem (GSM-5140). El medio KSOM esta pre-esterilizado por filtración y se envía congelado. Un día antes de su uso se descongeló la botella en nevera entre 2°C y 8°C durante toda la noche. Antes de su uso, el medio descongelado se agitó suavemente para mezclar los componentes y se llevó a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y humedad relativa máxima. Se realizaron todas las acciones utilizando condiciones de cultivo aséptico para evitar contaminación.

3.9.4 Listado de anticuerpos primarios

Tabla 3.4 Listado de Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Casa Comercial	Referencia	Origen	Dilución	Uso
<i>Receptor cannabinoide tipo 1 (CB1)</i>	Cayman Chemical	10006590	Rabbit	1:100	IF
<i>Receptor cannabinoide tipo 2 (CB2)</i>	Cayman Chemical	101550	Rabbit	1:100	IF
<i>p-AKT (Thr308/Ser473)</i>	Cell Signalling	4060	Rabbit	1:100	IF
<i>p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr²⁰⁴)</i>	Cell Signalling	4370	Rabbit	1:100	IF

Tabla 3.5 Detalle de oligonucleótidos utilizados para PCR and qPCR en ovocitos y embriones murinos.

Gen	Nombre del Gen	Nº Acceso	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Producto longitud pb
<i>H2afx</i>	H2A familia de histonas, miembro Z	NM_174809	AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG	CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG	209
<i>Cnr1</i>	Receptor Cannabinoide tipo 1	NM_001242341.1	GTACCATCACCACAGACCTCCTC	GGATTCAGAATCATGAAGCACTCCA	301
<i>Cnr2</i>	Receptor Cannabinoide tipo 2	XM_010802588.1	TCTGGAAAGCCCACCGGCATGTAG	CAAGGCACAGCATGGAACAGAAGG	231

Tabla 3.6 Detalle de oligonucleótidos utilizados para PCR and qPCR en ovocitos y embriones bovinos.

Gen	Nombre del Gen	Nº Acceso	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Producto longitud pb
<i>H2afz</i>	H2A familia de histonas, miembro Z	NM_174809	AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG	CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG	209
<i>Cnr1</i>	Receptor Cannabinoide tipo 1	NM_001242341.1	GGTGAGGTTACCTGGTCT	GAAGGGGTCCCCGCTAA	305
<i>Cnr2</i>	Receptor Cannabinoide tipo 2	XM_010802588.1	GAGGCTGGGATCACTTGGCATG	AGGGATGGCTGGGAACAATTTCG	172
<i>Bax</i>	BCL2-asociado a proteína X	NM_173894.1	CTACTTTGCCAGCAAAGTGG	TCCCAAAGTAGGAGAGGA	158
<i>Bcl2</i>	BCL2-like 1	BC147863.1	GGAGCTGGTGGTTGACTTTC	CTAGGTGGTCATTCAGGTAAG	517
<i>Tp53</i>	Proteína tumoral p53	NM_174201.2	CTCAGTCCTCTGCCATACTA	GGATCCAGGATAAGGTGAGC	364
<i>Gpx1</i>	Glutación peroxidasa 1	NM_174076.3	GCAACCAGTTTGGGCATCA	CTCGCACTTTTCGAAGAGCATA	116
<i>Sod2</i>	Superoxido dismutasa 2, mitocondrial	S67818.1	GCTTACAGATTGCTGCTTGT	AAGGTAATAAGCATGCTCCC	101
<i>Dnmt3a</i>	DNA citosina-5-metiltransferasa 3 alfa	AY271299	CTGGTGCTGAAGGACTTGGGC	CAGAAGAAGGGGCGGTCATC	318
<i>Igf2r</i>	Receptor para factor de crecimiento insulínico tipo 2	NM_174352.2	GCTGCGGTGTGCCAAGTGAAAAAG	AGCCCCCTCTGCCGTTGTTACCT	201
<i>Slc2a1</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose 1 transporter), member	NM_174602.2	CTGATCCTGGGTTCGCTTCAT	ACGTACATGGGCACAAAACCA	68
<i>Gapdh</i>	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	BC102589	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	AYGCCTGCTTCACCACCTTC	247
<i>Pou5f1</i>	POU class 5 homeobox 1 (Oct3/4)	NM_174580.1	CGAGTATCGAGAACCGAGTG	CAGGGTTCTCTCCCTAGCTC	440
<i>Infτ</i>	Interferón tau	NM_001015511.3	GCTATCTCTGTGCTCCATGAGATG	AGTGAGTTCAGATCTCCACCCATC	359
<i>Gja1</i>	Proteína de uniones Gap, alfa 1 (llamada <i>Cx43</i>)	NM_174602.2	TGCCTTTCGTTGTAACACTCA	AGAACACATGAGCCAGGTACA	142

4. Resultados

Capítulo I

4.1 El receptor cannabinoide CB1 participa en la maduración de los ovocitos murinos a través de la activación de AKT y ERK1/2, afectando el posterior desarrollo del embrión

Ángela Patricia López-Cardona, Serafín Pérez-Cerezales, Raúl Fernández-González, Ricardo Laguna-Barraza, Eva Pericuesta, Naiara Agirregoitia, Alfonso Gutiérrez-Adán and Ekaitz Agirregoitia

Scientific reports (In review)

4.1.1 Expresión e inmunolocalización de los receptores CB1 y CB2 durante el reinicio de la meiosis en ovocitos: modelo murino.

Para entender el rol del sistema cannabinoide durante la maduración del ovocito, hemos determinado en primer lugar la presencia de los receptores CB1 y CB2 durante el proceso de reinicio de la meiosis en ovocitos de ratón. La presencia de dichos receptores ya ha sido descrita en ovocitos de otras especies como rata (Bagavandoss and Grimshaw 2010) y humano (El-Talatini, et al. 2009a, Peralta, et al. 2011). Sin embargo en ovocitos murinos no se ha caracterizado durante el reinicio de la meiosis. A nivel de expresión génica, detectamos la presencia del ARNm para el receptor CB1 en el estadio de GV tanto en ovocitos madurados *in vivo* como *in vitro*. No obstante, con el reinicio de la meiosis y la transición hacia MI y MII, la presencia del transcripto desaparece. En el caso del receptor CB2, nuestros resultados muestran que el transcripto está presente en todos los estadios desde GV hasta MII. (Figura 4.1.a)

A nivel proteico la localización de ambos receptores fue analizada mediante inmunofluorescencia durante el periodo de maduración nuclear. Dicho análisis reveló la presencia de ambos receptores CB1 y CB2 durante la maduración tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuando los ovocitos fueron madurados *in vitro*, CB1 fue localizado homogéneamente en todo el citoplasma en el estadio de GV pero, con el reinicio de la meiosis, en el estadio de MI la proteína comienza a adoptar una localización más periférica que termina por observarse claramente en el estadio de MII. Cuando los ovocitos fueron madurados *in vivo*, la localización de CB1 se observó en la periferia desde el estadio de GV hasta MII. Por el contrario, el receptor CB2 mostró una localización homogénea a nivel citoplasmático en todos los estadios de maduración y no presentó cambios en su distribución en ninguno de los modelos de maduración (Figura 4.1.b).

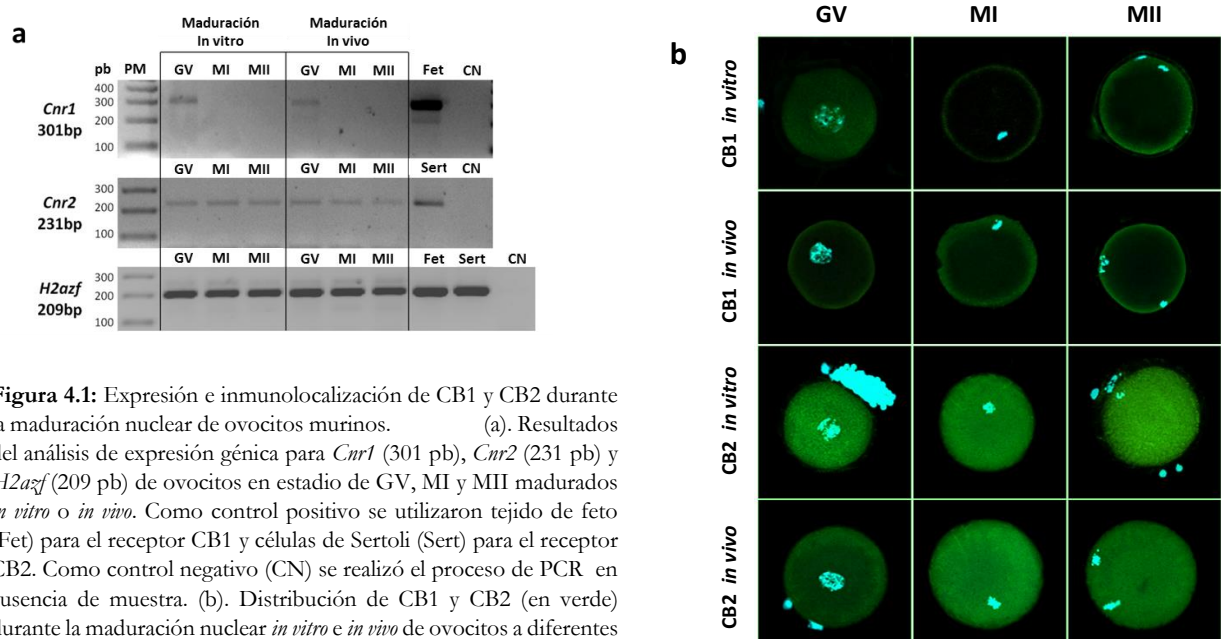
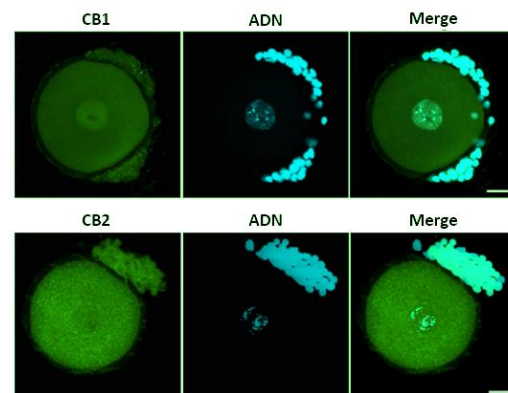


Figura 4.1: Expresión e inmunolocalización de CB1 y CB2 durante la maduración nuclear de ovocitos murinos. (a). Resultados del análisis de expresión génica para *Cnr1* (301 pb), *Cnr2* (231 pb) y *H2azf* (209 pb) de ovocitos en estadio de GV, MI y MII madurados *in vitro* o *in vivo*. Como control positivo se utilizaron tejido de feto (Fet) para el receptor CB1 y células de Sertoli (Sert) para el receptor CB2. Como control negativo (CN) se realizó el proceso de PCR en ausencia de muestra. (b). Distribución de CB1 y CB2 (en verde) durante la maduración nuclear *in vitro* e *in vivo* de ovocitos a diferentes estadios. Vesícula Germinal (GV), Metafase I (MI), y Metafase II (MII). El ADN (en azul) se muestra marcado con Hoechst-33342. n=15 ovocitos por estadio. La barra de escala representa 20 μ m.

Varios autores han descrito que las células de granulosa o células del cúmulo (CG) que rodean al ovocito juegan un papel clave en la adquisición de la competencia ovocitaria (Gilchrist and Thompson 2007). En particular, las células de la granulosa proporcionan nutrientes y señales moleculares que regulan el desarrollo y que son decisivas en el proceso de maduración nuclear de los ovocitos; y estos a su vez promueven la organización, proliferación y diferenciación de las células del cúmulo (Eppig 1991, Gilchrist, et al. 2004). Así, el complejo cúmulo-ovocito es considerado como una unidad funcional para el proceso de maduración. Por esta razón, hemos confirmado la presencia de ambos receptores cannabinoides en las células de granulosa que acompañan al ovocito (**Figura 4.2**), lo cual también se ha descrito recientemente en humano (Agirregoitia, et al. 2015b). Estos resultados nos permiten pensar que los CCOs son sensibles a las señales producidas por compuestos cannabinoides, sean de origen endógeno o exógeno, y que la activación de estos receptores puede tener implicaciones en vías de señalización que se dan durante la maduración del ovocito.

Figura 4.2: Localización de los receptores CB1 y CB2 (en verde) en células de granulosa. El ADN (en azul) ha sido marcado con Hoechst-33342. n=10 ovocitos por estadio, barra de escala representa 20 μm .



4.1.2 La dinámica de localización del receptor CB1 podría ser un indicador de maduración

Nuestros resultados confirman la presencia de ambos receptores durante la maduración, lo que convierte al ovocito en una posible diana de cannabinoides y un posible modelo para estudiar los posibles efectos que estos generen en procesos que regulan el ciclo celular. Interesante ha sido también la observación de que de los dos receptores analizados sólo CB1 tiene un cambio en su dinámica y localización desde una ubicación nuclear, hacia una ubicación periférica a medida que se dan los eventos característicos del reinicio de la meiosis como el GVBD, el paso a MI y finalmente el detenimiento en MII. (**Figura 4.3**).

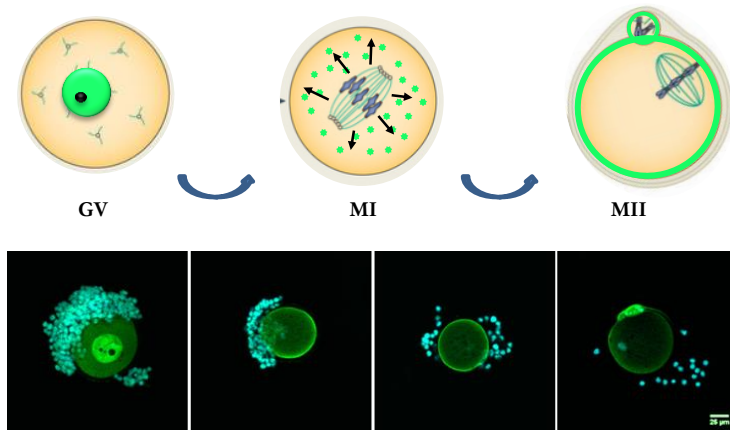


Figura 4.3: Cambios en la dinámica de migración del receptor CB1 (en verde) durante el reinicio de la meiosis en ovocitos murinos. El ADN (en azul) marcado con Hoechst-33342. La barra de escala representa 25 μm .

4.1.3 Dinámica de la expresión y localización de los receptores CB1 y CB2 durante el desarrollo preimplantacional del embrión de ratón.

Después de observar la dinámica de los receptores durante la maduración, quisimos evaluar de forma descriptiva cual era la dinámica de expresión de ambos receptores durante el posterior desarrollo embrionario tanto a nivel de ARN como en relación a la ubicación de la proteína. Anteriormente, ya se reportó en el modelo murino la presencia de los receptores cannabinoides durante diferentes etapas del desarrollo embrionario, concretamente se observó la expresión de CB1 desde el estadio de 4 células hasta blastocisto y en el caso de CB2 se reportó su expresión durante todo el desarrollo embrionario preimplantacional (Paria, et al. 1995, Yang, et al. 1996). Los estudios de Dey y colaboradores concluían que aunque el receptor se expresaba, no se conocía si este ARN se traducía eficazmente durante el desarrollo preimplantacional y desconocían cualquier función durante esta etapa (Yang, et al. 1996).

En cuanto a la expresión de CB1, observamos que el embrión durante el primer estadio de cigoto o 1 célula no expresa ARNm para CB1. Como se ha mostrado anteriormente, durante la maduración vimos como disminuían los niveles para este transcritto a medida que se daba el reinicio de la meiosis desapareciendo en su totalidad en el estadio de MII (**Figura 4.1.a**) lo cual implica a CB1 directamente en los procesos y vías que se dan durante esta etapa. Sin embargo, a partir del estadio de 2 células y coincidiendo con la activación del genoma embrionario para esta especie, observamos nuevamente expresión para CB1 que se mantiene en niveles más o menos constantes hasta la formación de la mórula para, posteriormente, en el paso de mórula a blastocisto, observar una leve disminución en la expresión. Como se ha reportado anteriormente, CB1 es importante durante la etapa de implantación en el ratón (Paria, et al. 2001), por ello quisimos monitorizar la expresión durante etapas posteriores a la formación del blastocisto como la eclosión y la re expansión antes a la implantación, para esto los embriones se mantuvieron en condiciones de cultivo *in vitro* por dos días más. Esto nos permitió ver el aumento progresivo de la expresión de CB1 en las etapas previas a la implantación, llegando a ser 7 veces mayor que la expresión en la formación inicial del blastocisto. (**Figura 4.4**). Con la caracterización de los perfiles de expresión también pudimos observar que el receptor CB1 no se expresa solo a partir de 4 células como lo reportaban anteriormente Paria y

colaboradores (Paria, et al. 1995), si no que los primeros niveles de expresión coinciden con la activación del genoma embrionario que se da en el estadio de 2 células en el modelo murino (**Figura 4.4**).

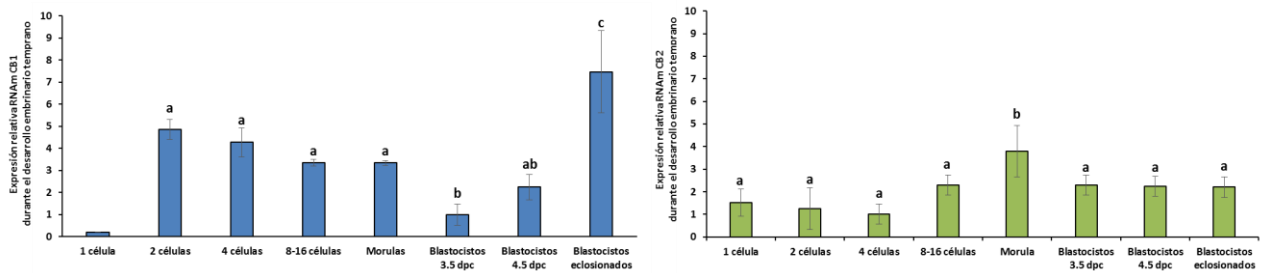


Figura 4.4: Dinámica de expresión del receptor CB1 (en azul) y CB2 (en verde) durante el desarrollo preimplantacional de embriones murinos.

Nuestros resultados han permitido confirmar y cuantificar la presencia de transcritos para CB2 durante toda la etapa preimplantacional, hemos observado cómo durante los primeros estadios desde el cigoto o embrión de 1 célula hasta el estadio de 8-16 células no existen grandes cambios en la expresión, sin embargo durante la etapa de mórula se observa un ligero aumento en la expresión, que luego disminuye hasta el estadio de blastocisto (**Figura 4.4**).

Aunque los reportes previos de Dey y colaboradores muestran niveles de expresión para ambos receptores durante la etapa preimplantacional, hasta la fecha no existía un estudio de caracterización sobre cuál es la dinámica para ambos receptores a medida que avanza el desarrollo embrionario. En un nuevo experimento quisimos caracterizar a nivel proteico la localización y ubicación celular de ambos receptores durante el desarrollo embrionario temprano. Es interesante observar cómo CB1 sigue presentando una clara distribución a nivel periférico en la membrana, sitio en el que el receptor puede activar la maquinaria de receptores de membrana unidos a proteínas Gi. Conforme avanza el desarrollo desde 1 célula hasta 4 células vemos claramente que todas las células presentan el receptor a nivel periférico, sin embargo en el estadio de mórula y blastocisto, vemos que la presencia de CB1 se ve limitada a las células más exteriores (**Figura 4.5.a**). Del análisis de inmunofluorescencia nuestras imágenes muestran que CB2 sigue los mismos patrones de localización que se dan durante la maduración del ovocito. De manera general lo ubicamos a nivel citoplasmático de una forma difusa y su dinámica de distribución no cambia conforme avanza el desarrollo embrionario (**Figura 4.5.b**).

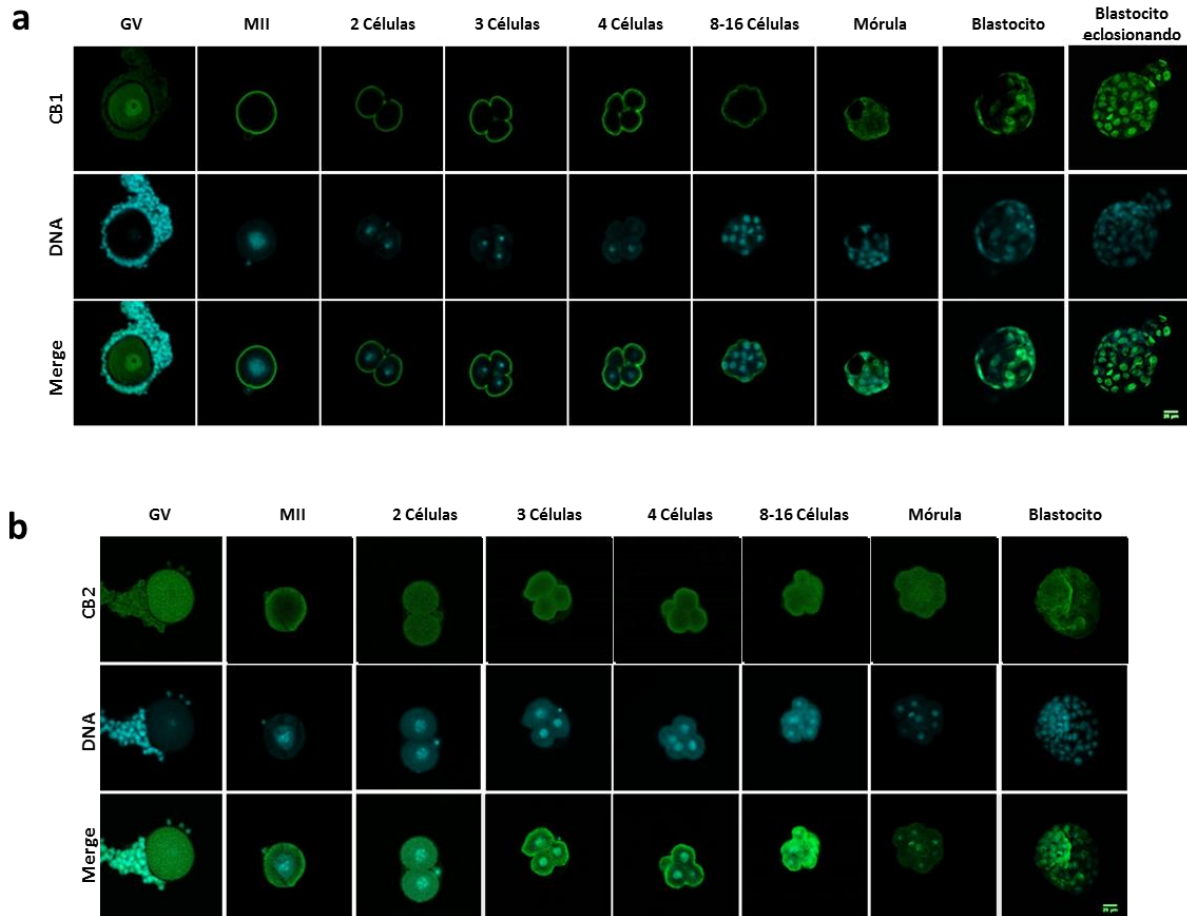


Figura 4.5: Dinámica de localización de las proteínas para receptores cannabinoides durante el desarrollo preimplantacional de embriones murinos desde GV hasta blastocisto. (a) CB1 y (b) CB2 en verde marcados con Alexa fluor 488 y ADN en azul marcado con Hoechst-33342. La barra de escala representa 25 μm .

4.1.4 La ausencia del receptor CB1 durante la maduración del ovocito tiene implicaciones en el desarrollo embrionario temprano *in vitro*

Con el fin de verificar si la presencia de los receptores, demostrada previamente durante las etapas de la maduración, tiene un papel relevante en los procesos de maduración y a posteriori en la fecundación y desarrollo embrionario, examinamos las consecuencias de la eliminación de los receptores cannabinoides mediante el uso de ratones transgénicos carentes de CB1, CB2 o ambos receptores. Para ello se utilizaron ovocitos de hembras transgénicas ($Cnr1^{-/-}$, $Cnr2^{-/-}$ y $Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}$) y como control se llevaron a cabo los mismos experimentos en paralelo con ovocitos provenientes de hembras wild type (WT) que expresaban ambos receptores de manera normal. Previamente se ha reportado que los embriones homocigotos para CB1 sufren retraso en el desarrollo embrionario y esto ha sido atribuido a un deficiente transporte en el oviducto (Wang, et al. 2004). Sin embargo nuestro objetivo fue ver si la falta de los receptores CB1 y/o CB2 durante el desarrollo del ovocito afectaban la maduración y el posterior desarrollo embrionario eliminando la variable del transporte, para ello se recuperaron por superovulación ovocitos los cuales habían tenido

carencia de CB1, CB2 o ambos receptores durante la foliculogénesis y se procedió a realizar la fecundación para lo cual se utilizó semen de machos *WT* con el fin de generar embriones heterocigotos. De este modo se pretendió determinar sólo el efecto de la falta del receptor en el ovocito durante el proceso de maduración *in vivo* y tener un comportamiento normal (a nivel de sistema cannabinoide) de los embriones a partir de la fecundación, ya que se ha demostrado que los sujetos heterocigotos carecen de fenotipo de retraso en el desarrollo mostrado por los embriones transgénicos (Wang, et al. 2004). Así podríamos ver los efectos de la eliminación del receptor solo en el ovocito y si tiene consecuencias en el desarrollo.

Los resultados mostraron que la falta de CB2 no afecta el porcentaje de ovocitos que completan el proceso de maduración nuclear, ni la competencia de estos para ser fecundados y alcanzar el estadio de blastocisto con porcentajes similares a los *WT* (**Figura 4.6.b**). Sin embargo, la falta de CB1 en ovocitos *Cnr1^{-/-}* conlleva una disminución significativa de los porcentajes de blastocistos y embriones divididos a 2 células. (**Figura 4.6.a**). Curiosamente, la carencia de ambos receptores en los ovocitos *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* muestra una alteración no sólo en el desarrollo *in vitro* de embriones que alcanzan la división a 2 células y el estadio de blastocistos, sino también una disminución en el porcentaje de fecundación y en el número de ovocitos que completan la maduración nuclear hasta el estadio de MII. (**Figura 4.6.c**).

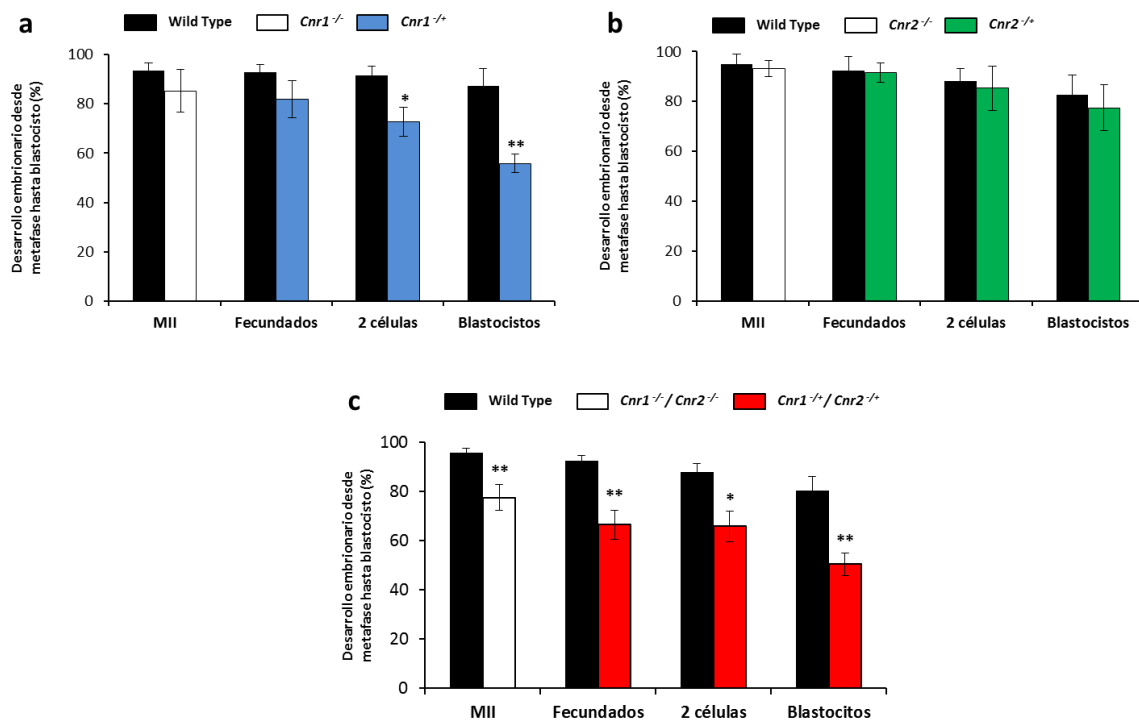


Figura 4.6: La ausencia de CB1 durante la maduración de ovocitos *in vivo* provoca una alteración en el desarrollo embrionario *in vitro*. **(a)** Porcentajes de ovocitos recuperados en metafase (MII) para hembras *WT* (negro) y *Cnr1^{-/-}* (blanco), y tasas de ovocitos fecundados y embriones de 2 células y blastocistos después de la fecundación *in vitro* usando esperma *WT*, para ovocitos *WT* (negras) y *Cnr1^{-/-}* ovocitos (azul). **(b)** Porcentajes de ovocitos recuperados en metafase (MII) para hembras *WT* (negro) y *Cnr2^{-/-}* (blanco), y tasas de ovocitos fecundados y embriones de 2 células y blastocistos después de la fecundación *in vitro* usando esperma *WT*, para ovocitos *WT* (negras) y *Cnr2^{-/-}* ovocitos (verde). **(c)** Porcentajes de ovocitos recuperados en metafase (MII) para hembras *WT*

(negro) y *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* (blanco), y tasas de ovocitos fecundados y embriones de 2 células y blastocistos después de la fecundación *in vitro* usando espermatozoides WT, para ovocitos WT (negras) y *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* ovocitos (rojo). Los resultados están expresados como media \pm SEM de 5 experimentos independientes. * P <0,05; **, P <0,01 entre los diferentes genotipos.

4.1.5 La deficiencia de CB1 durante la maduración de ovocitos retrasa el desarrollo del embrión *in vivo*

Para comprobar que los efectos perjudiciales observados en el desarrollo embrionario *in vitro* se debieron efectivamente a la ausencia del receptor cannabinoide durante la maduración y no a los procedimientos de fecundación y cultivo *in vitro* de los embriones, se quiso analizar el desarrollo embrionario *in vivo*. Para esto se utilizaron hembras WT, *Cnr1^{-/-}*, *Cnr2^{-/-}* y *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* que se aparearon con machos WT, con el objetivo de obtener embriones heterocigotos para nuevamente evaluar solo el efecto de la falta del receptor en el ovocito. Los embriones fueron recuperados de animales con presencia de tapón vaginal el día 3,5 después del coito (dpc).

Cuando utilizamos hembras *Cnr2^{-/-}*, las tasas de recuperación de blastocistos fueron similares a los WT (64% vs. 70%) (**Figura 4.7.a**). Por otro lado, al utilizar el genotipo *Cnr1^{-/-}* se observó un 18% menos de blastocistos que en el grupo WT (52% vs. 70%) (**Figura 4.7.a**). Sin embargo, la falta de ambos receptores durante la maduración de ovocitos *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* llevó a una marcada disminución en la tasa de blastocistos, la cual disminuyó un 37% en comparación con el uso de ovocitos de WT (33% vs. 70%) (**Figura 4.7.a**). Curiosamente, la falta de ambos receptores dio lugar a un 20% de embriones que a pesar de ser fecundados detuvieron su desarrollo en estadios previos a la formación de la mórula; la falta de CB1 produjo un 14% de embriones detenidos, mientras que la falta de CB2 presentó porcentajes similares al grupo WT (10% vs 9% respectivamente) (**Figura 4.7.a**). Estos resultados nos permiten pensar que el sistema endocannabinoide es especialmente crítico durante la maduración de ovocitos. Esto se refleja nuevamente en un alto porcentaje de ovocitos sin fecundar (30%) recuperados en el genotipo *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}*, que no se observa en los demás genotipos (**Figura 4.7 a**).

Otra prueba importante del retraso en el desarrollo del embrión causado por la deficiencia de receptores cannabinoideos durante la maduración fue el hallazgo de blastocistos eclosionados sólo en el grupo WT en el día 3,5 dpc (**Figura 4.7.b**), momento en que el embrión debe comenzar el proceso de implantación. Se ha descrito previamente que el desarrollo del embrión *Cnr1^{-/-}* es consecuencia de que los embriones se quedan atrapados en el oviducto (Wang, et al. 2004). Sin embargo, nuestros resultados confirman que la mayoría de los embriones derivados de los genotipos *Cnr1^{-/-}* y *Cnr2^{-/-}* se recuperaron en el útero como sucedió en ratones WT (**Figura 4.7, c**). Por lo tanto, el retraso en el desarrollo observado en los embriones *Cnr1^{-/-}* no puede atribuirse únicamente a un retraso en el transporte, como reportaban Wang y colaboradores cuando explicaban que el retraso en el transporte era debido a la ausencia de CB1 en el tracto reproductivo debido a que mantenía un tono contráctil del músculo liso que impedía el transporte del embrión por el oviducto (Wang, et al. 2004). Por último, en hembras *Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-}* podemos observar que la falta de ambos receptores sí refleja un retraso en el transporte de los embriones, encontrando un 51% de

los embriones retenidos en el oviducto; estos resultados, junto al retraso en el desarrollo indicado anteriormente, demuestran por primera vez la función de ambos receptores en el desarrollo embrionario y/o transporte en el oviducto.

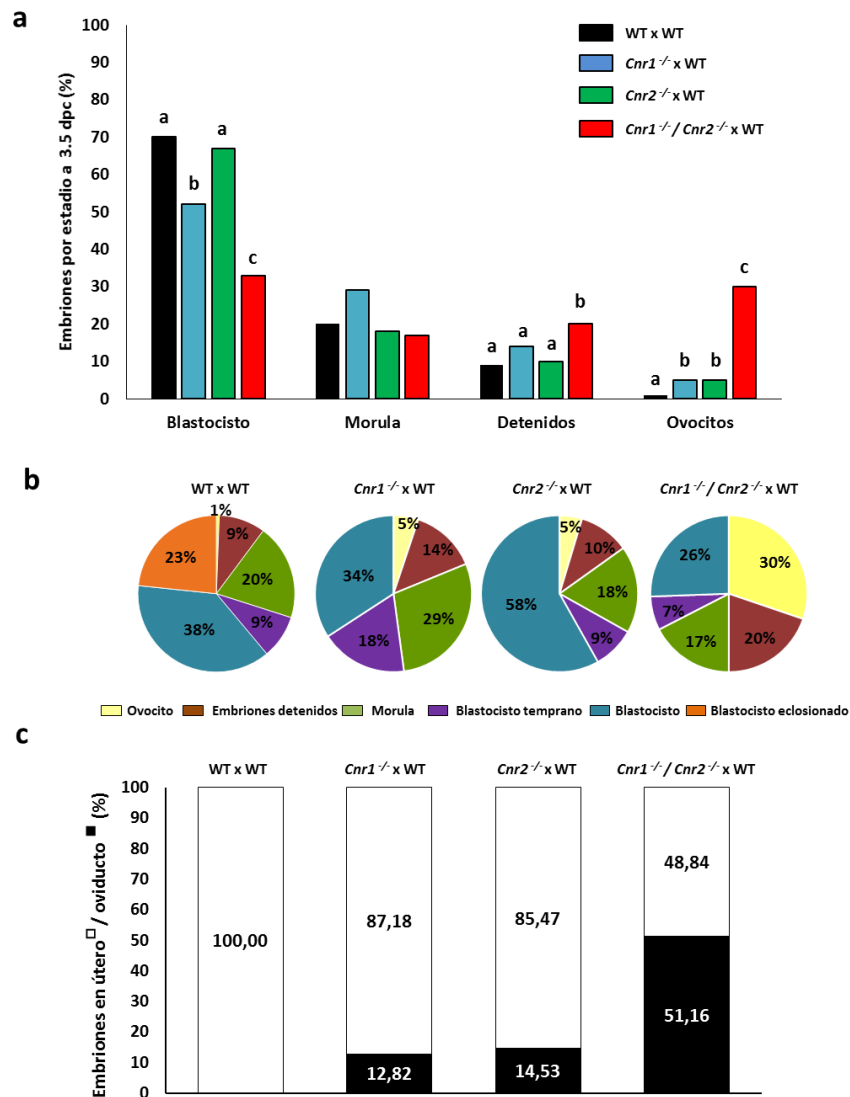


Figura 4.7: La deficiencia de CB1 *in vivo* durante la maduración retrasa el desarrollo del embrión *in vivo*. **(a)** Histograma que muestra el porcentaje de ovocitos, embriones detenidos, mórulas y blastocistos recuperados a 3,5 dpc (media mañana) a partir de los oviductos o úteros de hembras WT, Cnr1^{-/-}, Cnr2^{-/-} y Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-} cruzadas con machos WT. **(b)** Porcentajes de ovocitos, embriones detenidos, mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos y blastocistos eclosionados recuperados a 3,5 dpc a partir de los oviductos o úteros de hembras WT, Cnr1^{-/-}, Cnr2^{-/-} y Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-} cruzadas con machos WT. **(c)** Porcentajes por ubicación de embriones recuperados a nivel de útero u oviducto el día 3,5 dpc de hembras WT, Cnr1^{-/-}, Cnr2^{-/-} y Cnr1^{-/-}/Cnr2^{-/-} cruzadas con machos WT.

4.1.6 La activación farmacológica de CB1 durante la maduración de ovocitos *in vitro* modula la señalización de AKT y ERK1/2

Conociendo la presencia de los receptores durante la maduración y que su ausencia compromete las primeras etapas del desarrollo, quisimos evaluar mediante el uso de cannabinoides cuáles eran las posibles vías de señalización y si las vías se activaban mediante CB1, CB2 o ambos receptores.

Las vías de señalización PI3K/AKT y/o MAPKs fueron elegidas debido a que juegan un papel importante en la maduración de ovocitos (Sanchez and Smitz 2012, Su, et al. 2007). Observaciones previas muestran que una elevada actividad AKT es necesaria para reanudar la meiosis, y se ha observado que esta vía está implicada en la regulación de la emisión del cuerpo polar y la organización del huso meiótico (Ceconi, et al. 2010, Hoshino and Sato 2008). Por otra parte se ha descrito que la inhibición o desregulación de AKT en patologías ováricas que afectan negativamente la fertilidad, además de afectar el desarrollo del embrión preimplantacional (Ceconi, et al. 2012). Por otro lado, ERK1/2, una de las proteínas de mayor actividad en la vía de las MAPK, se considera un regulador clave de la proliferación y diferenciación celular. Se ha implicado en la maduración de ovocitos de una forma dinámica, donde su fosforilación es requerida para el proceso de expansión del cúmulo y la ovulación (Su, et al. 2003b), mientras que la desfosforilación activa en ovocitos es necesaria para la función normal del huso meiótico, emisión del cuerpo polar (Phillips, et al. 2002) y la formación del pronúcleo (Moos, et al. 1996).

Para determinar si la activación de los receptores CB1 y CB2 durante la maduración de ovocitos afectaría alguna de estas dos proteínas implicadas en las vías PI3K/AKT y/o MAPKs, se utilizaron cannabinoides sintéticos exógenos: el agonista HU-210 con mayor afinidad para CB1 y el agonista JWH-015 específico para CB2. Seguidamente se utilizará antagonistas SR141716A (SR1) y SR144528 (SR2) específicos para bloquear CB1 y CB2 respectivamente, con el fin de verificar la posible vía de activación. Se utilizó como grupo control la adición del vehículo usado para disolver los cannabinoides a la misma concentración que los grupos tratados con las drogas (DMSO al 0.1%).

En primer lugar, examinamos los efectos de concentraciones crecientes de HU-210 durante la maduración *in vitro* de ovocitos. Después de 17 hr de incubación (el tiempo requerido para la maduración de ovocitos de ratón), se observó un incremento en la fosforilación de AKT de manera dosis-dependiente, mientras que los niveles de proteína fosforilada permanecieron sin cambios en los ovocitos expuestos sólo al vehículo (**Figura 4.8.a**). Para comprobar que estos efectos eran específicos de la activación del receptor CB1, se incubaron los ovocitos con el antagonista selectivo de CB1 SR141716A (SR1), al mismo tiempo que con HU-210, y se pudo observar cómo la fosforilación de AKT fue bloqueada (**Figura 4.8.b**). Por el contrario, la fosforilación observada para ERK1/2 en el grupo control después de 17 hr de incubación con el vehículo se redujo cuando los ovocitos fueron madurados en presencia de HU-210 (**Figura 4.8.c**), pero al realizar la co-incubación de HU-210 con SR1 se rescató la fosforilación de ERK1/2 en los ovocitos maduros (**Figura 4.8.d**).

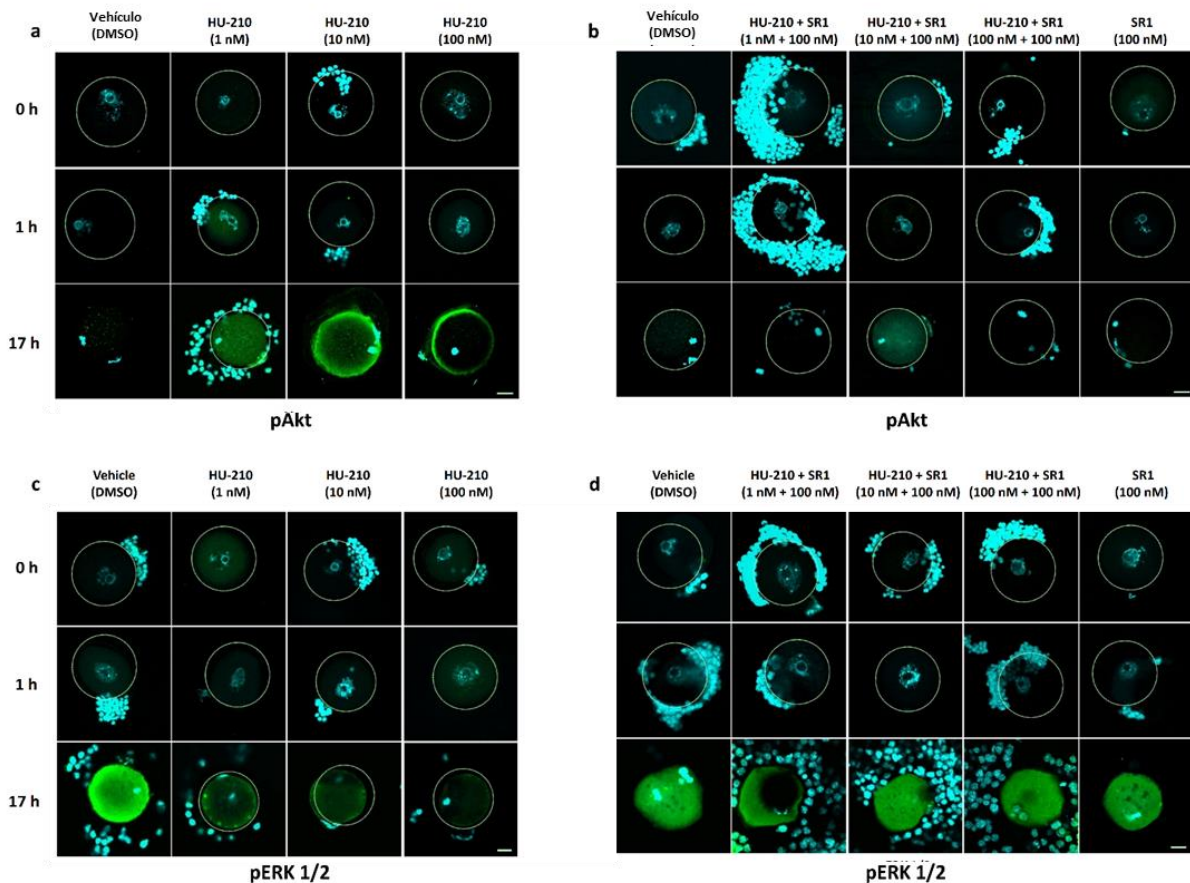


Figura 4.8: Activación de AKT y ERK1/2 por HU-210 durante la maduración de ovocitos *in vitro*. **(a)** Activación de AKT en ovocitos inmaduros (GV) cultivados *in vitro* en presencia de 1, 10 y 100 nM HU-210 durante 17 h; el nivel de fosforilación de AKT (pAKT) se observó a las 0, 1 y 17 hr **(b)** La activación de AKT dependiente de la dosis de HU-210 durante la maduración se invierte por el antagonista selectivo de CB1, SR141716A (SR1), que se utilizó a 100 nM. La incubación con SR1 no tuvo ningún efecto. **(c)** El estado de fosforilación de ERK1/2 (pERK1/2) se observó a las 0, 1 y 17 h, la inactivación de ERK1/2 se observó al final de la maduración de ovocitos (17h) bajo la mayor concentración del cannabinoide. **(d)** La presencia de SR1 durante el cultivo de los ovocitos con HU-210 recupera la pERK1/2 a las 17 h, como se observa también en el grupo control con el vehículo. Las imágenes mostradas representan antígenos marcados con Alexa488 en verde para ambas proteínas. ADN marcado con Hoechst en azul. La barra de escala representa 20 μm .

Tras someter a los ovocitos a concentraciones crecientes del agonista JWH-015 y el antagonista SR144528 (SR2), ambos selectivos para CB2, no se observaron cambios significativos en los patrones de fosforilación para AKT y ERK1/2 (**Figura 4.9**). Estos resultados indican que la activación de los receptores CB1, pero no la del receptor CB2, podría estar afectando el proceso de maduración a través de la regulación de proteínas AKT y ERK1/2, que están implicadas en vías que son biológicamente activas durante la maduración ovocitaria.

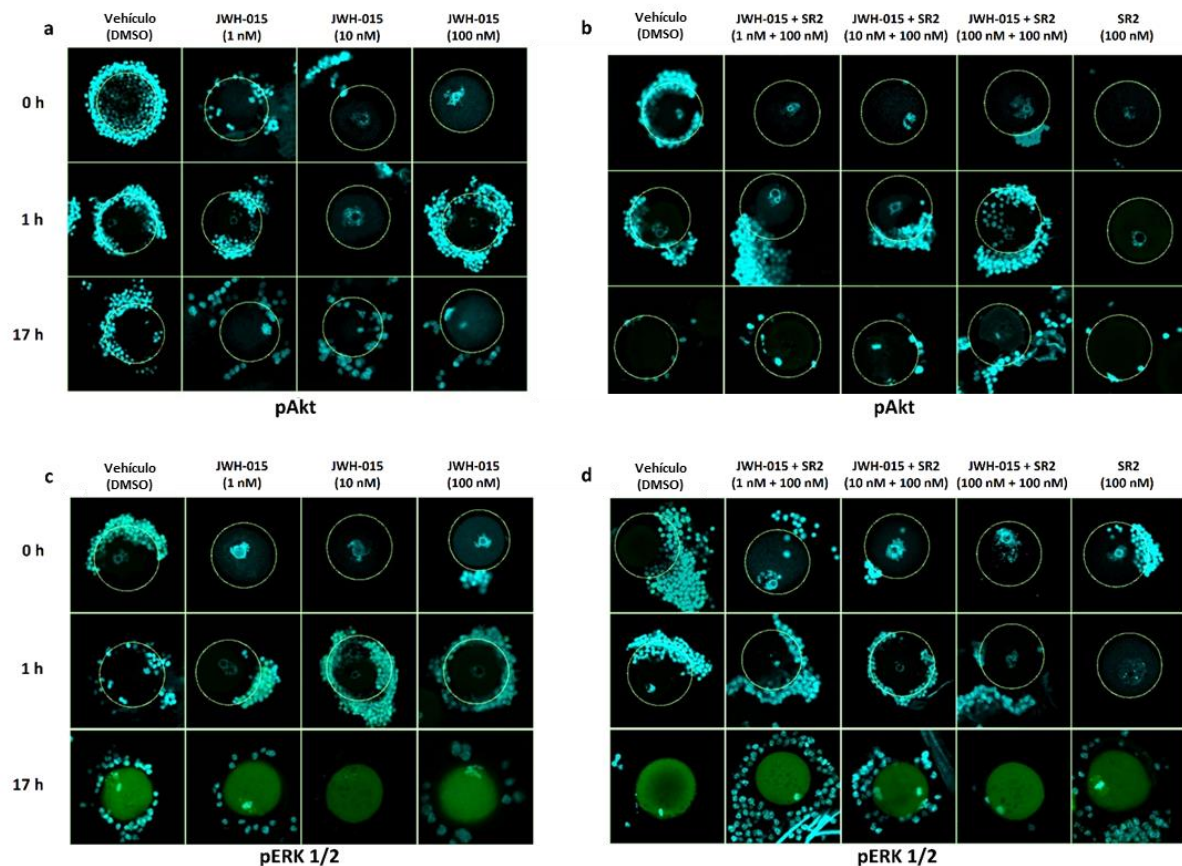


Figura 4.9: El agonista de CB2 selectivo JWH-015 no modifica el patrón de activación de AKT y ERK1/2 durante la maduración de ovocitos. **(a)** Patrón de fosforilación de AKT (pAKT); los ovocitos se incubaron con 1, 10 y 100 nM JWH-015 durante 17 h. La presencia de ambas proteínas se observó a las 0, 1 y 17 hr de maduración. **(b)** Patrón de fosforilación de AKT (pAKT); los ovocitos se incubaron con 1, 10 y 100 nM JWH-015 y con un antagonista selectivo para CB2; 100 nM SR144528 (SR2) durante 17 h. La incubación solo con SR2 no produce ningún efecto. **(c)** La activación de ERK1/2 se observó al final de la maduración de ovocitos (17 h) en presencia y ausencia de JWH-015. **(d)** La presencia de SR2 durante el cultivo de los ovocitos con JWH-015 no afecta los patrones de fosforilación, que no varían en ausencia o presencia del cannabinoide. Las imágenes mostradas representan antígenos marcados con Alexa488 en verde para ambas proteínas. ADN marcado con Hoechst en azul. La barra de escala representa 20 μm.

4.1.7 La presencia de cannabinoides durante la maduración *in vitro* de ovocitos murinos mejora las tasas de producción de embriones a través de la activación de CB1

El siguiente paso fue comprobar si la exposición a los cannabinoides durante la maduración de ovocitos influye en la fecundación y/o el desarrollo embrionario temprano. Los CCOs se maduraron *in vitro* durante 17 h en presencia o ausencia de agonistas y/o antagonistas sintéticos. Los cannabinoides fueron retirados al finalizar la etapa de maduración y los experimentos de fecundación *in vitro* se realizaron de manera convencional. Los resultados mostraron que la incubación con HU-210 no tuvo ningún efecto significativo sobre las tasas de ovocitos maduros (MII), cigotos fecundados y embriones divididos en 2 células en comparación con los ovocitos tratados con el vehículo. Sin embargo, la utilización de HU-210 dio lugar a una mejora significativa en el desarrollo embrionario en el estadio de blastocisto, ya que se

produjeron 2,4 veces más número de embriones cuando se utilizó una concentración de 100 nM del agonista en comparación con el vehículo (**Figura 4.10.a**). Para examinar adicionalmente si el efecto de HU-210 era totalmente selectivo a CB1, durante la maduración se co-incubaron los ovocitos con 100 nM del antagonista SR1. Los resultados muestran cómo el porcentaje de blastocitos disminuyó significativamente por la co-incubación con SR1 (**Figura 4.10.b**), lo cual demuestra que a pesar de tener afinidad por el receptor CB2 no tuvo el efecto que mostró a través de CB1. Igualmente, se descartó que la incubación sólo con el antagonista SR1 tuviese algún efecto sobre el desarrollo del embrión, ya que se ha reportado para este tipo de compuestos que pueden funcionar como agonistas inversos (**Figura 4.10.b**).

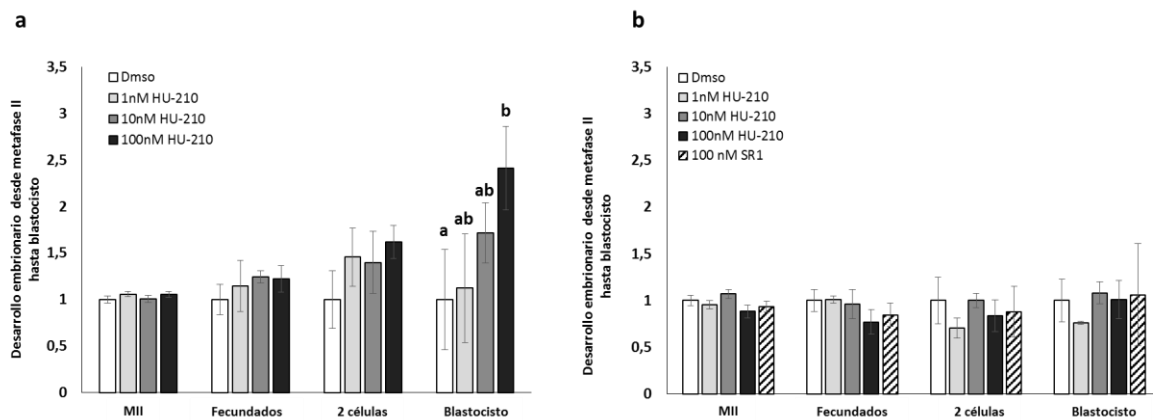


Figura 4.10: La activación farmacológica de CB1 durante la maduración de ovocitos tiene efecto sobre el desarrollo del embrión. **(a)** Respuesta dosis-dependiente a HU-210 durante la maduración de ovocitos (17 h) medida como porcentaje de ovocitos en metafase II (MII), ovocitos fecundados, embriones divididos en 2 células y blastocitos después de la fecundación *in vitro*. Se muestra el desarrollo del embrión para el grupo control de ovocitos madurados *in vitro* con el vehículo, DMSO (barras blancas); y para los ovocitos incubados con HU-210 a 1 nM (barras gris claro), 10 nM (barras gris oscuro) o 100 nM (barras negras). **(b)** Los experimentos de reversión se llevaron a cabo como los experimentos anteriores, pero en presencia de SR141716 (SR1), antagonista selectivo de CB1 a 100 nM. Se realizó un experimento adicional en el que los ovocitos se incubaron solo con SR1 (barra con líneas). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes (a, b); $p < 0,05$ en todos los casos.

Cuando se realizó el mismo experimento utilizando el agonista y antagonista selectivo de CB2 (JWH-015 y SR2) durante la maduración de ovocitos, no se observaron diferencias significativas en el desarrollo del embrión entre ovocitos madurados en presencia del cannabinoide o del vehículo (**Figura 4.11**). Estos resultados confirman que la vía de activación que ejercen los cannabinoides durante la maduración y que afecta el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto se da a través de la activación sólo del receptor CB1, lo que concuerda con los resultados previos donde sólo aquellos genotipos que carecían de CB1 vieron afectado su desarrollo embrionario preimplantacional.

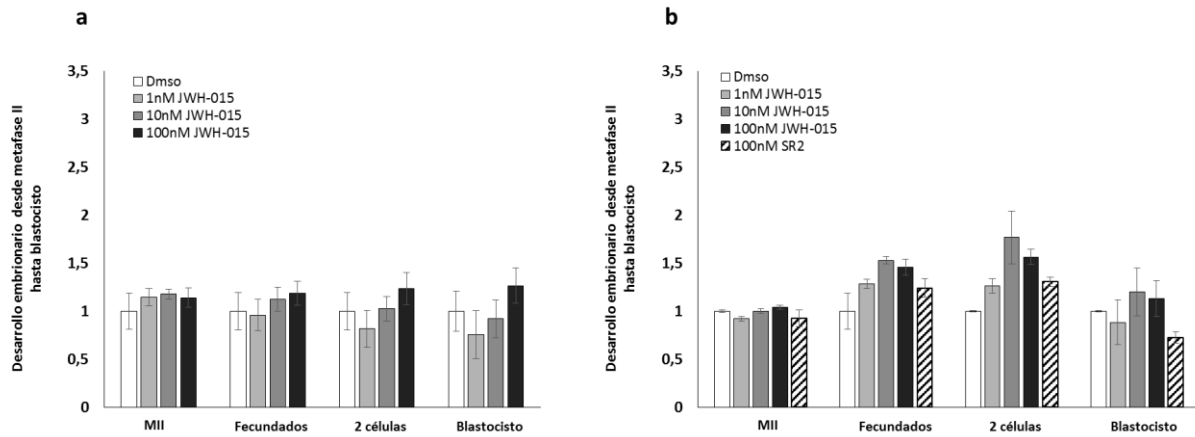


Figura 4.11: La activación farmacológica de CB2 durante la maduración de ovocitos no tiene efecto sobre el desarrollo del embrión. **(a)** Respuesta dosis-dependiente a JWH-015 durante la maduración de ovocitos (17 h) medido como porcentaje de ovocitos en metafase II (MII), ovocitos fecundados, embriones divididos en 2 células y blastocitos después de la fecundación *in vitro*. Se muestra el desarrollo del embrión para el grupo control de ovocitos madurados *in vitro* con el vehículo, DMSO (barras blancas); y para los ovocitos incubados con JWH-015 a 1 nM (barras gris claro), 10 nM (barras gris oscuro) o 100 nM (barras negras). **(b)** Los experimentos de reversión se llevaron a cabo como los experimentos anteriores, pero en presencia de SR144528, antagonista selectivo de CB2 (SR2) a 100 nM. Se realizó un experimento adicional en el que los ovocitos se incubaron solo con SR2 (barra con líneas). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes(a, b); $p < 0,05$ en todos los casos.

Es sabido que la activación partenogenética puede también inducir una marcada desfosforilación de ERK1/2 (Phillips, et al. 2002), por lo que, al evidenciar ese mismo comportamiento de desfosforilación con la adición de HU-210 durante la maduración, quisimos comprobar que no hubiese una activación que estuviese generando embriones partenogenéticos. Por lo tanto, quisimos comprobar que tras la estimulación de los ovocitos con HU-210 durante 17 h y una simulación de la fecundación en ausencia de espermatozoides seguidos del posterior cultivo (24 h) no se observara división ni formación de pronúcleos que indicará la presencia de embriones partenogenéticos; lo que confirmamos como se puede observar en la **Figura 4.12**.

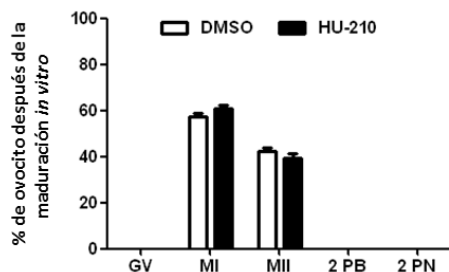


Figura 4.12: La presencia de cannabinoides durante la maduración de ovocitos no genera embriones partenogenéticos. Se muestran los porcentajes de ovocitos en estadio de GV, MI, MII y ovocitos con 2 cuerpos polares (2 PB) y 2 pronúcleos (2 PN) después de la maduración *in vitro* (17 h) en presencia de HU-210 (100 nM) o vehículo (DMSO) y cultivados durante 24 h, después de la simulación de fecundación en ausencia de espermatozoides.

Capítulo II

4.2 Los cannabinoides afectan la maduración in vitro de los ovocitos bovinos mediante la activación de AKT y ERK 1/2

Ángela Patricia López-Cardona, María Jesús Sánchez Calabuig, Paula Beltran-Breña, Naiara Agirregoitia, Dimitrios Rizos, Ekaitz Agirregoitia y Alfonso Gutiérrez-Adán

Reproduction REP-16-0199 (In press)

4.2.1 Expresión e inmunolocalización de los receptores CB1 y CB2 durante el reinicio de la meiosis en ovocitos bovinos

Durante la maduración *in vitro* de ovocitos de la especie bovina, el ARNm para CB1 fue detectado en los estadios de GV y MI, pero no en ovocitos que alcanzaron la MII. En contraste, los transcritos para CB2 aparecieron en todas las etapas que siguen al reinicio de la meiosis: GV, MI, y MII (**Figura 4.13.a**).

El análisis de inmunofluorescencia reveló a nivel proteico la presencia de ambos receptores CB1 y CB2 durante el proceso de maduración *in vitro* (**Figura 4.13.b**). CB1 se distribuyó en el núcleo de los ovocitos en estadio de GV; sin embargo, comenzó a adoptar una ubicación más periférica en el estadio de MI después de la reanudación de la meiosis, la cual se hizo mucho más evidente en MII. Por el contrario, la distribución del receptor CB2 fue homogénea en el citoplasma y sin cambios durante los diferentes estadios de maduración del ovocito (**Figura 4.13.c**). En conjunto, los resultados muestran los mismos hallazgos que encontramos en el modelo murino y que previamente se han descrito en humano (Peralta, et al. 2011), sugiriendo que este sistema podría estar implicado en general en la maduración de los ovocitos de mamífero.

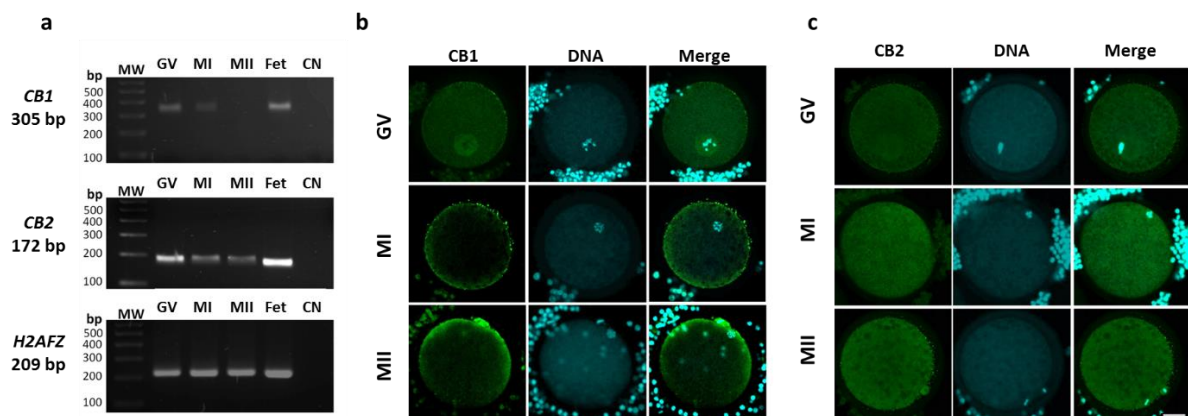


Figura 4.13: Expresión e inmunolocalización de CB1 y CB2 durante la maduración nuclear de ovocitos bovinos. **(a)** Resultados del análisis de expresión génica para Cnr1 (305 bp), Cnr2 (172 bp) y H2azf (209 bp) de ovocitos en estadio de GV, MI y MII madurados *in vitro*. Como control positivo se utilizaron tejido de feto (Fet). Como control negativo (CN) se realizó el proceso de PCR en ausencia de muestra. **(b y c)** Distribución de CB1 y CB2 (verde), respectivamente durante la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos a diferentes estadios. Vesícula Germinal (GV), Metafase I (MI), y Metafase II (MII). El ADN (azul) ha sido marcado con Hoechst-33342. n=15 ovocitos por estadio, barra de escala representa 20 μ m.

4.2.2 Dinámica de la expresión e inmunolocalización de los receptores CB1 y CB2 durante el desarrollo preimplantacional: modelo bovino

Como hemos indicado en el inicio de esta sección, la dinámica de expresión y localización de los CBR sigue los mismos patrones observados en otras especies durante el reinicio de la meiosis. En base a esto quisimos verificar si durante el desarrollo preimplantacional en la especie bovina se daban las mismas dinámicas de expresión para los receptores CB1 y CB2 que en la especie murina. Nuestros resultados muestran la expresión de CB1 a partir del estadio de 8-16 células y un aumento de la expresión en los siguientes estadios de mórula y blastocisto. Curiosamente, el inicio de la expresión para CB1 coincide en

ambos modelos animales con la activación del genoma embrionario para cada especie. En cuanto CB2 se observó expresión en todos los estadios del desarrollo embrionario partiendo desde cigotos hasta blastocistos, coincidiendo con el patrón que muestra la especie murina (**Figura 4.14.a**) y se observó un aumento significativo desde la activación del genoma embrionario en el estadio de 8-16 células hasta la etapa de blastocisto.

Los resultados de localización de la proteína indican como posible vía de actuación para la señal cannabinoide al receptor CB1, tanto durante la maduración como durante el desarrollo embrionario preimplantacional es el único que adquiere una ubicación periférica en la membrana de las blastómeras y pasando a una ubicación más nuclear en el estadio de blastocisto, similar a lo observado en el modelo murino (**Figura 4.14.b**). En relación al CB2 se observa normalmente distribuido en el citoplasma sin cambios significativos en su localización conforme avanza el desarrollo embrionario (**Figura 4.14.c**).

Estos resultados son los primeros en evidenciar la expresión de los CBR durante la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano en el modelo bovino.

4.2.3 La exposición a HU-210 y THC durante la maduración del ovocito bovino modifica los patrones de fosforilación de AKT y ERK1/2

Al confirmar que la distribución de los receptores durante la maduración del ovocito bovino sigue la misma dinámica y distribución que en el modelo murino, donde anteriormente se comprobó que las vías de señalización estaban mediadas por el receptor CB1, quisimos utilizar la maduración en el modelo bovino para evaluar la respuesta a dos tipos compuestos cannabinoide: el fitocannabinoide THC, que como se explicó anteriormente podría tener más posibilidades de uso a nivel clínico, y su análogo sintético el HU-210, del cual ya conocemos sus efectos y las posibles vías de activación. Para la realización de este experimento se utilizó como grupo control la adición del vehículo usado para disolver los cannabinoide a la misma concentración que los grupos tratados con las drogas (DMSO al 0.1%), y un segundo grupo control sin DMSO con el fin de descartar cualquier posible efecto del vehículo sobre las variables analizadas. No se encontró ninguna diferencia entre ambos grupos con o sin DMSO en la producción de embriones, los patrones de fosforilación de las proteínas analizadas durante el desarrollo embrionario, AKT y ERK1/2, o en la expresión génica de los blastocistos analizados. Basado en esto y en el hecho de que el DMSO fue el vehículo usado para ambos fármacos, se consideró el grupo DMSO como el grupo más adecuado para comparar todos los resultados como grupo control.

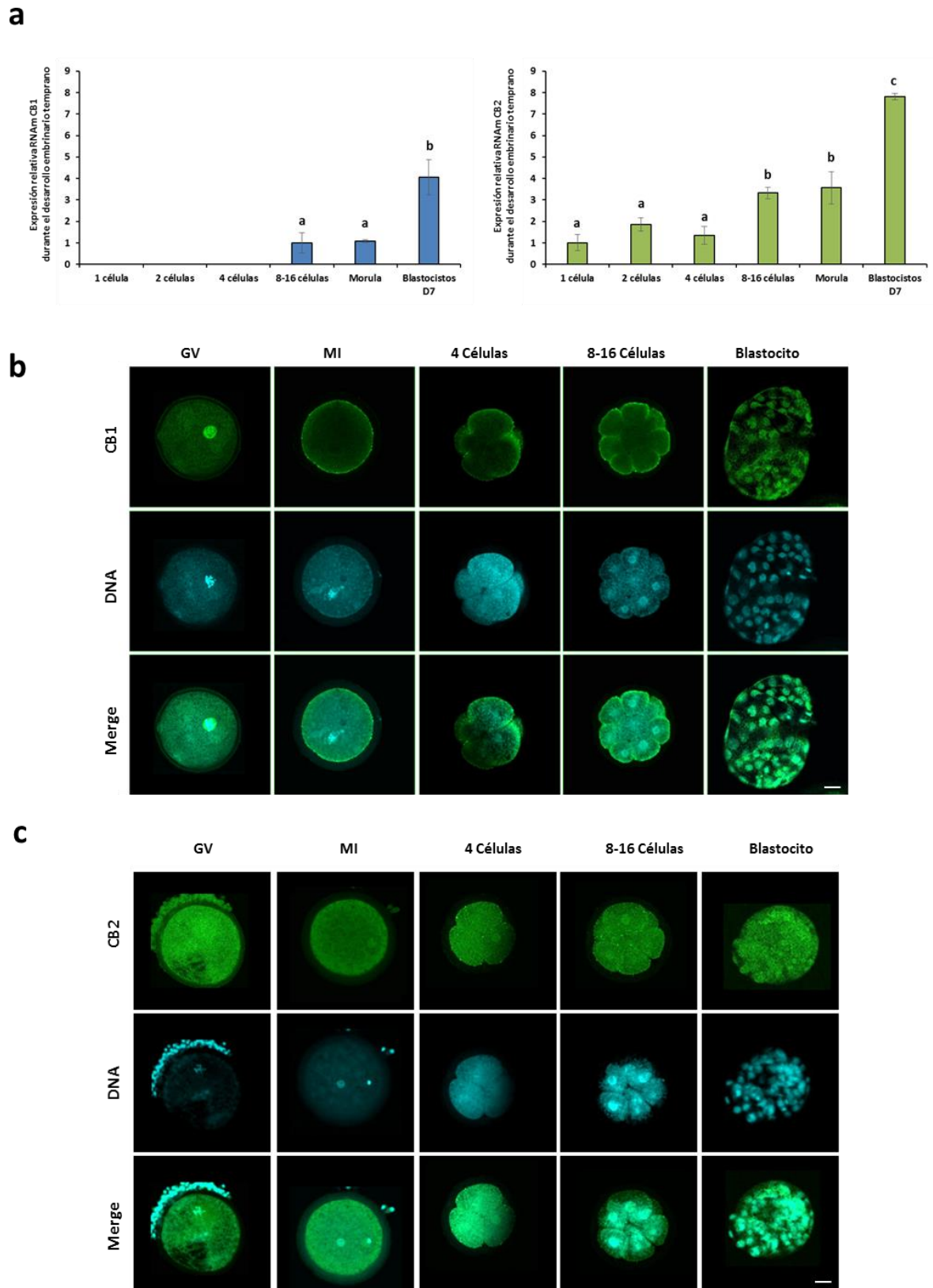


Figura 4.14: Expresión e inmunolocalización de CB1 y CB2 durante el desarrollo embrionario del modelo bovino. **(a)** Expresión del receptor CB1 (azul) y CB2 (verde). **(b y c)** dinámica de localización para el receptor CB1 y CB2 en estados representativos del desarrollo preimplantacional. GV; vesícula germinal, MI; Metafase I, 4 células, 8-16 células y blastocisto. Barra de escala representa 20 μ m.

Anteriormente se ha comentado como en el modelo murino vimos una diferencia clara en los patrones de fosforilación en los ovocitos tratados tras 17 h de maduración *in vitro*. Sin embargo, en el modelo bovino quisimos determinar cuál era la respuesta inicial que ejercían los cannabinoides sobre los patrones de fosforilación a tiempos más cortos de exposición. En la Figura 4.16 se puede observar que inicialmente no se observa fosforilación de ninguna de las proteínas examinadas antes de la adición de los fármacos (0 min). En el caso de la AKT, después de 5 min de tratamiento con HU-210 o THC, se detectó una clara señal de fosforilación de AKT en las células de la granulosa, junto con una tinción más débil en el citoplasma del ovocito, mientras que en el control con vehículo (DMSO) era mínima tanto para las células de la granulosa como para el ovocito (**Figura 4.15.a**). La normalización de los datos mostró una diferencia significativa en la fosforilación, tanto en el citoplasma del ovocito como en la granulosa que rodea al ovocito al usar ambos cannabinoides. Sin embargo, observamos que el THC generaba una respuesta inicial mayor en los patrones de fosforilación que su análogo sintético HU-210. Después de 30 minutos, este patrón de tinción se mantuvo bastante estable para esta proteína, mostrando siempre una mayor fosforilación en los grupos tratados con cannabinoides. Después de 24 h de incubación, el tiempo requerido para la maduración completa del ovocitos bovinos, la señal de la fosforilación en las células de la granulosa se vio disminuida y en una forma muy similar en todos los grupos. Sin embargo, pAKT continuó estando presente en el ovocito con una distribución homogénea en el citoplasma y una mayor intensidad de fosforilación en los grupos que fueron tratados con cannabinoides, llegando a ser 5 veces mayor que en el grupo control (**Figura 4.15.a**).

Los patrones de fosforilación para ERK1/2 muestran que tras 5 min de tratamiento con ambos agonistas cannabinoides se aumenta la señal de pERK1/2 en las células de la granulosa, la cual se observa más débil en el grupo del vehículo. Igualmente se observó señal en el citoplasma del ovocito tanto con HU-210 como con THC aunque más débil, pero sólo este último grupo difirió significativamente del control (**Figura 4.15.b**). Sin embargo, después de 30 minutos de incubación, pERK1/2 comenzó a ser evidente en el grupo control, mientras que los grupos de HU-210 y THC mostraron un aumento significativo de la fosforilación tanto en el ovocito como en la granulosa. Finalmente, después de 24 h, pERK1/2 disminuyó de forma similar en las células de la granulosa de los tres grupos. Por el contrario, en el ovocito evidencio un aumento muy marcado en la señal para pERK1/2, aunque nuevamente sin diferencias entre los grupos evaluados (**Figura 4.16.b**).

En conjunto, estos resultados muestran que la señal de ambas proteínas tiene un patrón de fosforilación que se inicia en las células de granulosa que están rodeando al ovocito y que con el paso del tiempo se va internalizando hacia el ovocito hasta alcanzar mayores niveles de fosforilación en los ovocitos después de 24 hr de maduración. A pesar que desde 5 minutos se puede observar una respuesta diferencial en los grupos tratados, en conjunto podríamos decir que para ambas proteínas después de 30 minutos de exposición a ambos cannabinoides la respuesta en la fosforilación es significativamente mayor que en el grupo con vehículo.

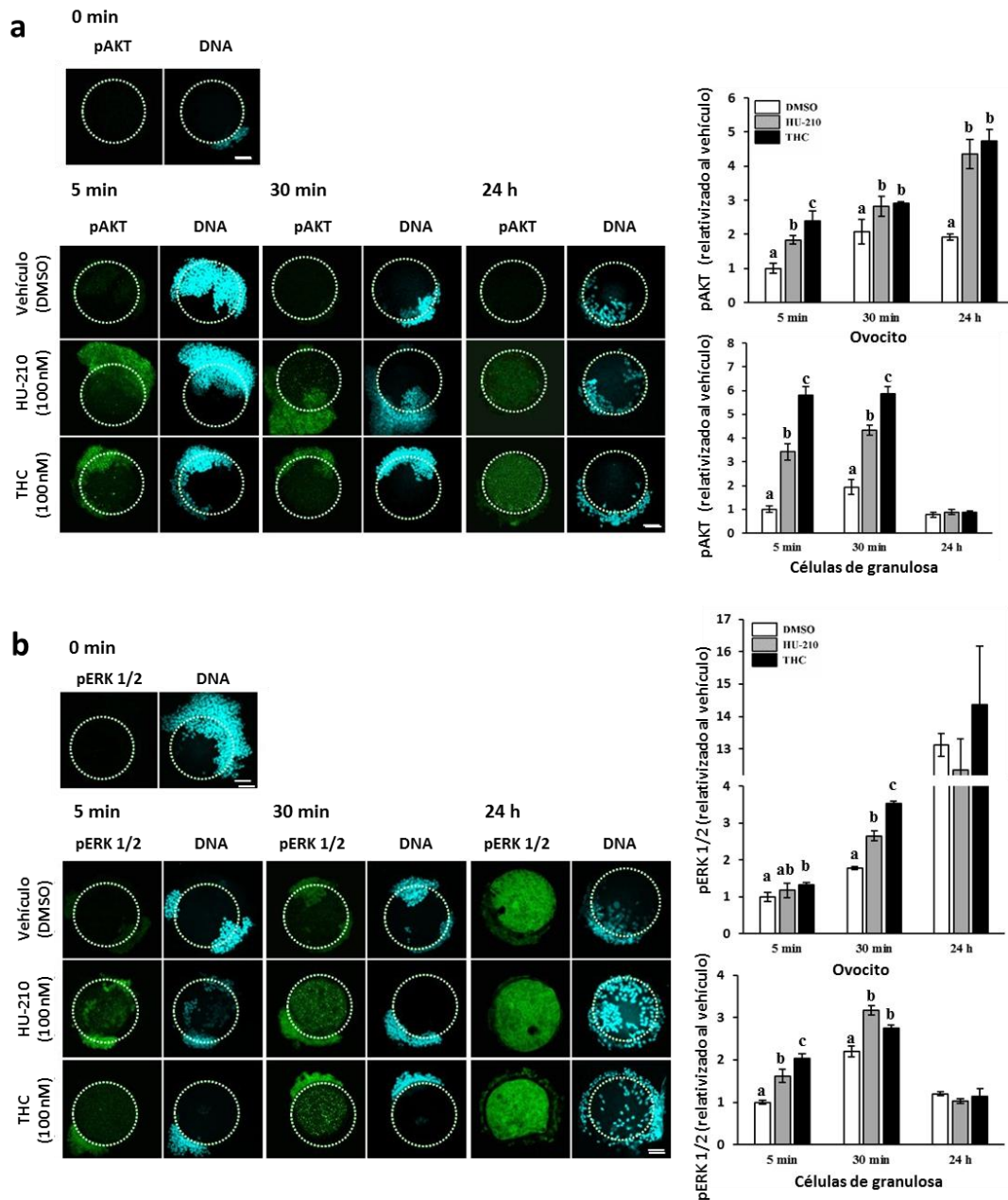
4.2.4 Cambios en la velocidad del reinicio de la meiosis en ovocitos bovinos expuestos a HU-210 y THC

Considerando que AKT y ERK1/2 están involucradas en otras vías de señalización nos preguntamos si podrían estar afectando el reinicio de la meiosis, por esta razón pasamos a evaluar los diferentes estadios de maduración nuclear en el ovocito durante su exposición a cannabinoides THC y HU-210.

AKT y ERK1/2 son proteínas que están implicadas en múltiples vías de señalización. En el ovocito, la pERK1/2 se ha asociado con el reinicio de la meiosis (Levesque and Sirard 1995). Por otra parte, se ha demostrado que pAKT puede inhibir a MYT, una de las quinasas que mantiene inactivo al factor promotor de la maduración (MPF) (Okumura, et al. 2002). Dado que la adición de ambos cannabinoides favoreció la fosforilación de ambas proteínas en el complejo cumulo-ovocito, quisimos ver si el reinicio de la meiosis se veía afectado evaluando la dinámica nuclear durante la maduración del ovocito. Para ello se analizaron ovocitos después de 0, 2, 4, 6, 8, y 12 h de maduración en presencia de HU-210, THC y vehículo. Según el estadio nuclear, los ovocitos fueron clasificados en vesícula germinal (GV), ruptura de vesícula o breakdown (GVBD), pro metafase I (PMI), metafase I (MI) y metafase II (MII). Como podemos ver, en la Figura 4.17 se muestra la dinámica de la maduración nuclear, donde observamos que a 0 hr todos los ovocitos se encuentran en el estadio de GV (**Figura 4.16.a**).

Sin embargo, después de 2 h de MIV se encontró un alto porcentaje de GVBD en los grupos con ambos cannabinoides comparados con el control (**Figura 4.16.a**). A las 6 h de MIV, la mayoría de los ovocitos avanzaron al estadio de pro-metafase I sin diferencia entre los grupos (**Figura 4.16.b**), y tras 8 h, todos los grupos alcanzaron sin diferencia el estadio de MI (**Figura 4.16.c**). Sin embargo, después de 12 h nuevamente se halló una diferencia significativa entre los grupos, observando un mayor porcentaje de ovocitos en el estadio de MII en ambos grupos experimentales comparados con el grupo control (**Figura 4.16.d**).

Finalmente, después de 24 hr de MIV todos los grupos alcanzaron el estadio de MII. Con estos resultados comprobamos que los cannabinoides están teniendo un efecto en el tiempo que los ovocitos tardan en realizar el GVBD y posiblemente la fosforilación de AKT y ERK1/2 podría estar mediando vías de señalización que aceleran el proceso de maduración nuclear. Sin embargo aún desconocemos si la diferencia en la velocidad presentada durante el inicio del proceso de maduración afecta el desarrollo embrionario o el número de embriones producidos a partir ovocitos tratados.



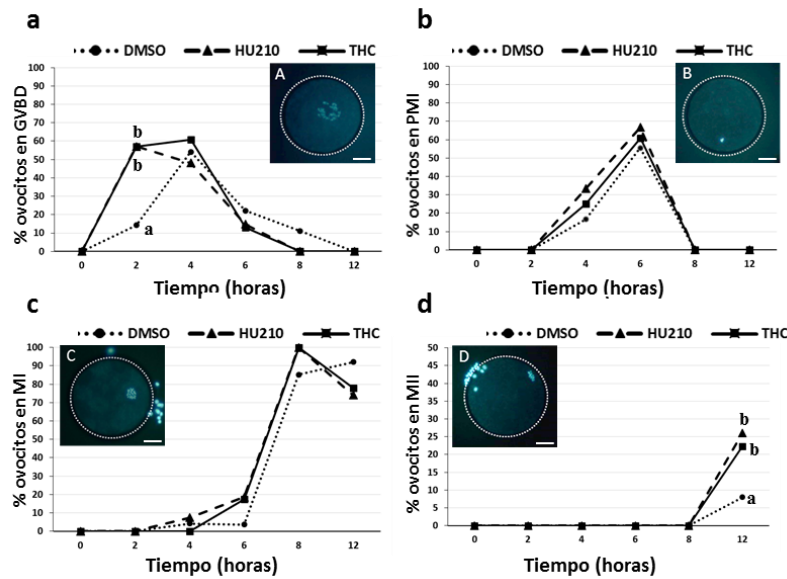


Figura 4.16: Cambios en el estatus nuclear de ovocitos a lo largo de la maduración, como consecuencia de la exposición a HU-210 y THC. Los resultados se expresan como porcentaje de ovocitos en cada etapa de maduración y punto de tiempo. Para simplificar el análisis, se eligieron cuatro etapas: **(a)** % de ruptura de la vesícula germinal (GVBD), definida por la ausencia de la membrana nuclear visible; **(b)** % de pro-metafase I (PMI), que se define por la condensación de la cromatina; **(c)** % metafase I etapa (MI), el material nuclear se muestra con cromosomas individuales y **(d)** % de metafase II (MII) caracterizado por la presencia de placa metafásica. Letras diferente ^{a-b} representan medias que difieren entre los tratamientos en el mismo tiempo ($P < 0,05$). Se muestran fotomicrografías representativas. A: imagen representativa de GVBD; B: imagen representativa de los ovocitos con PMI; C: imagen representativa de MI; D: imagen representativa de los ovocitos con MII. La barra de escala representa 20 μm .

4.2.5 Producción de embriones y expresión génica de blastocistos producidos con ovocitos madurados en presencia de HU-210 y THC

Nuestro siguiente paso fue comprobar si los tratamientos utilizados durante el periodo de maduración de los ovocitos podían tener un efecto en la fecundación, el desarrollo embrionario posterior y la calidad de los embriones producidos. En primer lugar, la incubación con 100 nM de HU-210 o THC no tuvo efectos significativos sobre las tasas de división al día 2 y tampoco sobre la producción de blastocistos en los días 7, 8 y 9 después de la fecundación *in vitro* $P > 0,05$ (**Tabla 4.1**).

Para determinar los efectos sobre la calidad del embrión, evaluamos la expresión de los ARNm para genes candidatos relacionados con diferentes procesos biológicos como apoptosis, estrés oxidativo, metilación, metabolismo, uniones celulares, pluripotencia e implantación. Los patrones de expresión de la mayoría de estos genes no presentaron diferencias en los embriones derivados de ovocitos madurados en presencia de THC o HU-210 en comparación con el control (**Figura 4.17**). Sin embargo, en los embriones que provenían de ovocitos tratados con cannabinoides, se observó una sobreexpresión ($P < 0,05$) en dos de los genes evaluados: el primero de ellos el relacionado con las uniones gap, la Gap proteína alfa-1 (*Gjal*), también conocido como conexina 43, que participa en la señalización celular relacionada con la formación de uniones entre las células y, el segundo de ellos fue el interferón-tau (*Ifnt*) que participa en la señalización celular relacionada con el reconocimiento del embrión para la implantación. El *Ifnt* se sobre expresó de

manera similar en los grupos madurados con HU-210 y THC, mientras que aunque la expresión de GJA1 también se incrementó en ambos grupos ($P < 0,01$, **Figura 4.17**), el aumento en la expresión fue más pronunciado en el grupo de THC en comparación con el grupo de HU -210 ($P < 0,01$ **Figura 4.17**).

Tabla 4.1 Producción de embriones a partir de ovocitos tratados con 100 mM of HU-210 o THC y grupo control con DMSO.

Grupo	Tasa de producción de blastocistos								
	n	% División		n	(% ± S.E)	n	(% ± S.E)		
		n	D2 (% ± S.E)					D7 (% ± S.E)	D8 (% ± S.E)
DMSO	190	146	77.31 ± 4.25	28	14.95 ± 1.38	42	23.01 ± 2.68	45	24.63 ± 2.62
HU210	227	180	77.94 ± 3.29	32	15.65 ± 3.53	50	23.08 ± 2.05	56	25.03 ± 1.33
THC	240	190	78.84 ± 2.75	31	13.19 ± 4.93	51	20.85 ± 5.71	53	21.81 ± 5.85

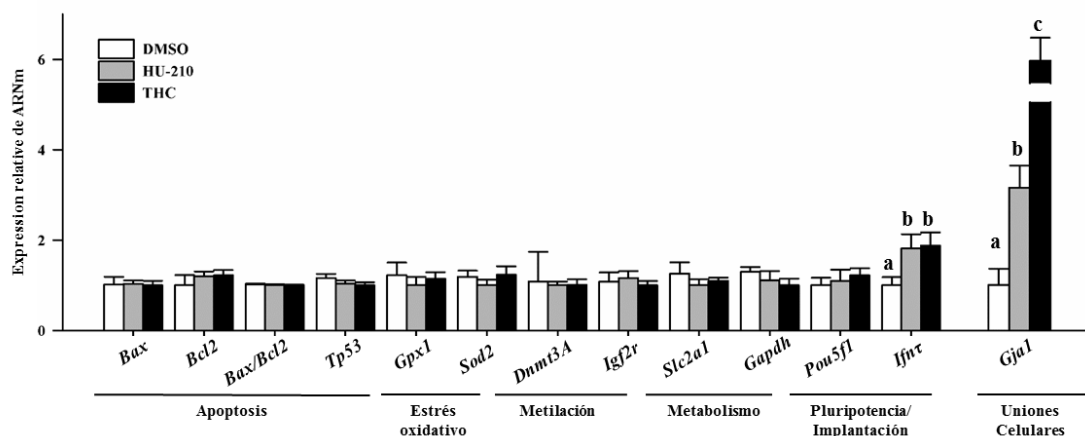


Figura 4.17 Expresión de ARNm de genes importantes para el desarrollo preimplantacional analizado por PCR en tiempo real (qPCR). La figura muestra los patrones de expresión en blastocistos bovinos derivados de ovocitos madurados en presencia de vehículo DMSO (control), o cannabinoides exógenos HU-210 o THC. Las barras con letras diferentes indican una diferencia significativa entre los tratamientos en $P < 0,05$.

Capítulo III

4.3 El consumo crónico de THC en ratones no afecta la fisiología testicular ni la capacidad de sus espermatozoides para fecundar in vitro

4.3.1 La exposición de forma aguda a THC no afecta a la motilidad de espermatozoides murinos

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los capítulos previos, referente a la parte femenina, donde el uso de cannabinoides durante la maduración del ovocito mejoró la producción de embriones en el modelo murino, y la calidad de los embriones en el modelo bovino, nuestra siguiente pregunta fue si en la parte masculina la exposición a cannabinoides podría afectar la capacidad de los espermatozoides para fecundar al ovocito, ya que, además, se ha demostrado que el espermatozoide presenta receptores CBR en los espermatozoides de diversas especies (Agirregoitia, et al. 2010, Aquila, et al. 2010, Gervasi, et al. 2009, Maccarrone, et al. 2005).

Con el fin de analizar la respuesta inmediata de los espermatozoides tras el contacto con THC, se evaluó la motilidad espermática a concentraciones crecientes de dicha droga comprendidas entre 0 y 100nM. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados en los espermatozoides tratados con respecto al grupo control (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2 Media y error estándar para parámetros de motilidad en ratones Wt tratados de manera aguda con THC

Parámetro	Concentración de THC (nM)			
	0	1	10	100
VCL	70 ± 4	69 ± 3	69 ± 2	71 ± 3
VSL	31 ± 1	33 ± 2	34 ± 1	34 ± 2
VAP	40 ± 1	41 ± 2	41 ± 1	42 ± 2
LIN	46 ± 3	49 ± 1	51 ± 1	50 ± 2
STR	77 ± 3	80 ± 1	82 ± 1	81 ± 1
WOB	58 ± 2	60 ± 1	61 ± 1	61 ± 1
ALH	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.5 ± 0.2
BCF	7.6 ± 0.5	7.5 ± 0.5	8.2 ± 0.5	8.0 ± 0.5

4.3.2 El consumo crónico de THC afecta al SNC, pero no tiene efecto en el sistema reproductivo

Al no encontrar cambios significativos en la motilidad de los espermatozoides incubados de manera aguda con THC, y dado que nuestros resultados no coinciden con lo descrito hasta la fecha, decidimos crear un modelo de consumo crónico de THC para evaluar la capacidad para fecundar de estos espermatozoides.

En primer lugar procedimos a comprobar que nuestro modelo crónico de administración de 10mg/kg/día de THC por vía intraperitoneal durante 30 días tenía realmente un efecto a nivel de la señalización cannabinoide. Como se ha descrito anteriormente, el consumo crónico de THC produce una desensibilización del receptor CB1 a nivel del SNC, disminuyendo su expresión (Sim-Selley 2003). Sin embargo, a nivel testicular no se ha descrito para este tipo de tratamiento si se altera la expresión de CB1. Por esta razón realizamos un análisis de la expresión génica del receptor CB1 en cerebro y testículo como tejidos representativos de cada sistema.

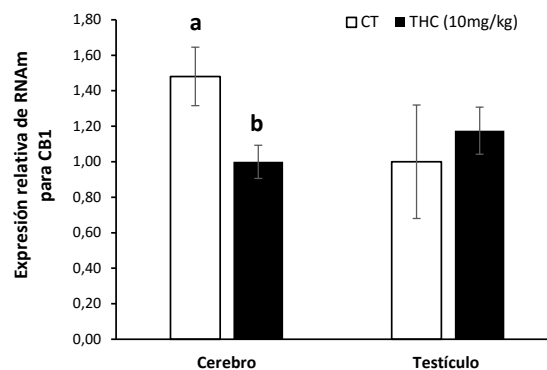


Figura 4.19 La exposición crónica durante 30 días a THC (10mg/kg/día) afecta a la expresión del receptor CB1 en el cerebro pero no en el testículo. El gen *H2afx* fue utilizado como gen de referencia. ^{a, b} Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los datos obtenidos demostraron que en el cerebro la exposición crónica a THC durante 30 días produce una disminución en la expresión del receptor CB1, lo que concuerda con lo que se ha descrito previamente a nivel de SNC (Sim-Selley 2003). Sin embargo, en el testículo no se vio afectada la expresión de dicho receptor (**Figura 4.19**). Estos resultados indican en nuestro modelo, que las dosis utilizadas si están llegando a nivel sistémico y son suficientes para observar un efecto en la regulación de la expresión del receptor CB1 en cerebro. Sin embargo, a nivel del testículo estas mismas dosis no desencadenan dicho mecanismo, por lo cual nos preguntamos si realmente el tratamiento con THC con la dosis y duración utilizadas tiene un efecto a nivel reproductivo.

Posteriormente, se realizó un análisis proteico para detectar la presencia del receptor y evaluar si la cascada de fosforilación que se desencadena por la activación de CB1 a nivel cerebral se encontraba igualmente afectada en los animales tratados. Efectivamente, los resultados del análisis proteico mostraron una disminución significativa del receptor CB1 y un aumento significativo de la fosforilación de AKT en la corteza cerebral de los animales tratados con THC en comparación con el grupo control. No se observaron diferencias en la cantidad total de AKT entre ambos grupos. Asimismo, se analizó si la fosforilación de AKT desencadenó la inhibición en la fosforilación de GSK3- β como se ha descrito anteriormente para esta vía. Los resultados evidencian que tanto la proteína total como la forma fosforilada de GSK3- β no tuvieron variaciones tanto en animales con tratamiento crónico como en el grupo control. (**Figura 4.20**). Por tanto, queda comprobado que la cantidad de THC administrada está activando el receptor CB1, causando un

aumento de la pAKT, la cual se encarga de mantener inhibida a GSK3- β evitando su fosforilación, la respuesta generada en esta vía de señalización concuerda con lo descrito previamente a nivel del SNC para la activación del receptor CB1 (Ozaita, et al. 2007).

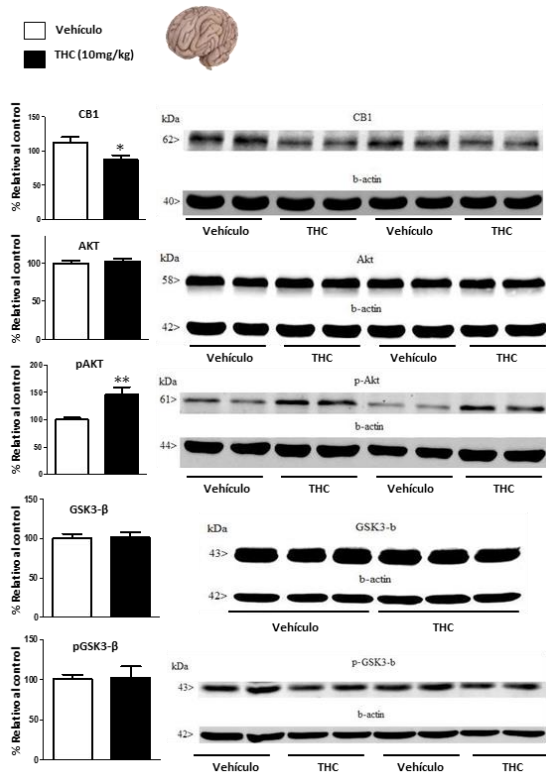


Figura 4.20 Respuesta de la vía PI3K/AKT/GSK3 β en el SNC mediante la técnica de western blot: Se muestran dos réplicas por cada análisis para ambos tratamientos THC: machos inyectados con THC con una dosis diaria de 10mg/kg, durante 30 días y Vehículo: machos inyectados con etanol:cremofor:salino 1:1:18 durante 30 días. Se observa cómo tras la activación del receptor CB1 mediante THC, se activa la vía típica de señalización en el SNC mediante la fosforilación de AKT, y como consecuencia se inhibe la fosforilación de GSK3 β . Se muestran datos representativos de 3 o 4 machos provenientes de dos réplicas independientes. La normalización de los datos se realizó en comparación al grupo control, (*) indican diferencias significativas $P < 0,05$ y (**) $P < 0,01$.

4.3.3 La diferencia de expresión de CB1 a nivel cerebral no está regulada por modificaciones en la metilación de la región promotora del receptor

A nivel de sistema digestivo, específicamente en colon, se ha descrito que la expresión del receptor CB1 está regulada por mecanismos epigenéticos, mediante la metilación de la región promotora del receptor CB1 (Wang, et al. 2008). Por lo tanto, quisimos evaluar si existía un mecanismo epigenético implicado en la disminución de la expresión de CB1 a nivel de SNC observada en nuestro tratamiento crónico. Para ello evaluamos el estado de metilación del promotor del receptor CB1 en muestras de cerebro de animales tratados y no tratados, encontrando que no existen alteraciones en la metilación en ninguno de los grupos. Igualmente extendimos el análisis a los blastocistos producidos por fecundación *in vitro* con estos mismos animales, y nuevamente observamos que el patrón de metilación se mantiene sin cambios.

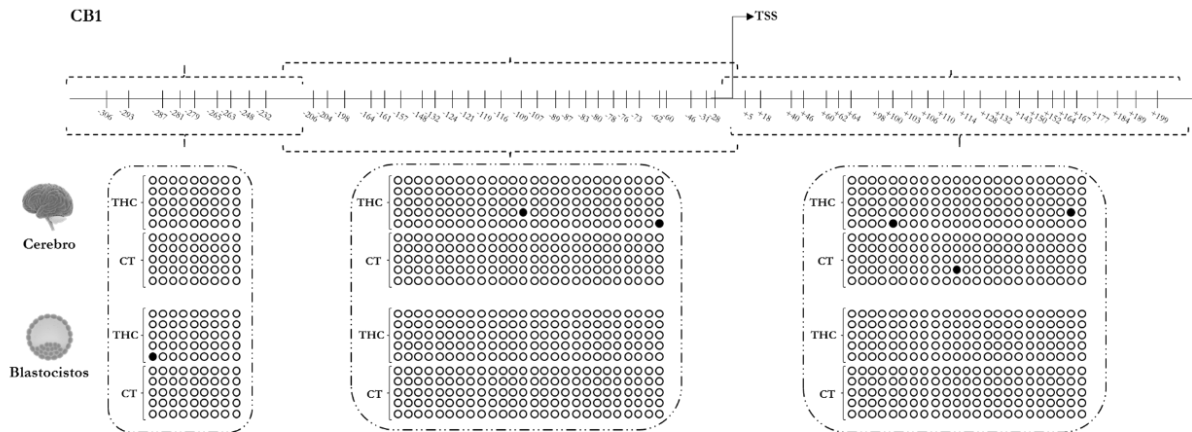


Figura 4.21: Patrones de metilación del promotor de CB1 en cerebros de animales tratados con THC (10 mg/kg de peso corporal/día) y controles tratados con vehículo. Se analizó igualmente el patrón de metilación en los blastocistos producidos mediante fecundación *in vitro* a partir de los mismos animales tratados y el grupo control. Se determinó el estado de metilación de 59 CpG mediante secuenciación por bisulfito.

4.3.4 Efecto del consumo crónico de THC en el epidídimo y el testículo

Los ratones expuestos al tratamiento crónico con THC no mostraron ninguna variación significativa en el peso corporal en comparación con el grupo control tratado solo con vehículo. Sin embargo, el peso total y peso relativo de los órganos reproductivos aumentó significativamente ($p < 0,05$), tanto testículos un 24% como en epidídimos un 16%, en aquellos animales que fueron tratados con THC (Tabla 4.2).

El siguiente paso fue comprobar si la exposición a THC afectaba a la estructura de los túbulos seminíferos, ya que se ha sido descrito que tras la activación de los receptores cannabinoides se da una aceleración de la espermatogénesis, por lo cual se ha considerado la señal cannabinoide como necesaria para la progresión correcta de la espermatogénesis (Di Giacomo, et al. 2015, Sugiura, et al. 1996). La evaluación histológica mostró una actividad espermatogénica normal en la mayoría de los túbulos seminíferos evaluados. El número de túbulos sin espermatozoides, así como la presencia de algunas anomalías como vacuolización en células de Sertoli, desprendimiento de células en el lumen y células gigantes, fue similar tanto en el grupo tratado como en el grupo control (Figura 4.22). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en el nivel de apoptosis, analizado mediante la técnica de TUNEL en secciones transversales de testículo (Figura 4.23).

Tabla 4.2 Pesos totales y pesos relativos de los órganos reproductores en ratones tratados crónicamente con THC. *

Grupo	Peso animal (gr)	Testículos (gr)	Testículo der (gr)	Testículo izq (gr)	Epidídimo (gr)	Epidídimo der (gr)	Epidídimo izq (gr)
CT	35,55±1,74	0,198±0,03 ^a	0,102±0,02 ^a	0,097±0,01 ^a	0,111±0,01 ^a	0,054±0,01 ^a	0,056±0,01
THC	35,10±1,72	0,247±0,04 ^b	0,128±0,02 ^b	0,120±0,02 ^b	0,129±0,02 ^b	0,066±0,01 ^b	0,063±0,01

Grupo	Peso animal (gr)	Testículos (%)	Testículo der (%)	Testículo izq (%)	Epidídimo (%)	Epidídimo der (%)	Epidídimo izq (%)
CT	35,55±1,74	0,558±0,09 ^a	0,287±0,05 ^a	0,271±0,04 ^a	0,312±0,03 ^a	0,153±0,03 ^a	0,158±0,02 ^a
THC	35,10±1,72	0,706±0,09 ^b	0,364±0,04 ^b	0,342±0,04 ^b	0,367±0,05 ^b	0,187±0,03 ^b	0,180±0,02 ^b

* Los pesos relativos reflejan el peso absoluto de órganos (mg) / peso corporal del animal (gr). Los datos se expresan como la media ± SD.

CT: grupo control tratado solo con vehículo. THC: grupo tratado con Δ^9 -tetrahidrocannabinol

^a ^b Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas analizadas mediante t-test (P < 0,05).

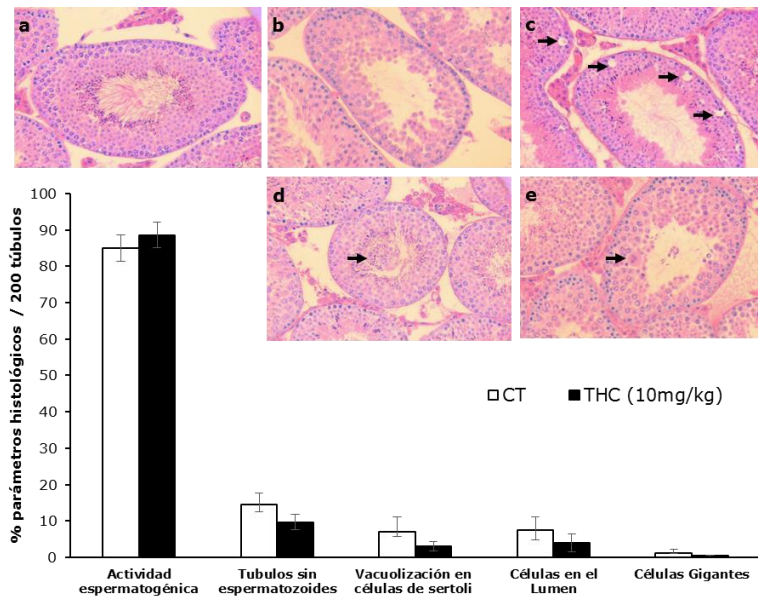
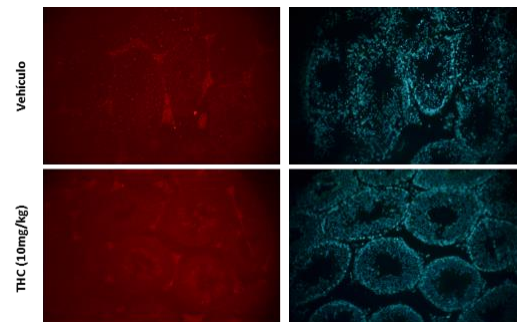


Figura 4.22: Parámetros histológicos analizados en los testículos de animales tratados durante 30 días con THC (10 mg/kg de peso corporal/día) y controles tratados con vehículo etanol:cremofor:salino 1:1:18.

Imágenes representativas de los túbulos seminíferos evaluados **a)** actividad espermatogénica normal, **b)** sin presencia de espermatozoides, **c)** vacuolización en células de Sertoli, **d)** desprendimiento de células germinales al lumen y **e)** presencia de células gigantes. (*) Indican diferencias significativas por t-test ($P < 0,05$).

Figura 4.23: Análisis de apoptosis mediante la técnica de TUNEL en testículos de animales tratados con THC (10 mg/kg de peso corporal/día) y controles tratados con vehículo. El ADN marcado con Hoechst aparece en azul, y en rojo brillante aparecen marcadas las células apoptóticas.



4.3.5 Capacidad fecundante de los espermatozoides de animales expuestos crónicamente a THC

Todos los trabajos realizados hasta la actualidad sobre el consumo de THC evalúan tanto parámetros seminales, principalmente la motilidad, como cambios en perfiles hormonales que incluyen la testosterona y hormonas gonadotrópicas. Sin embargo, en ningún trabajo se ha analizado la capacidad de fecundación de estos espermatozoides. La motilidad espermática evaluada después de la recuperación del semen en medio HTF no presentó diferencias entre el grupo control (24.6 ± 4.7) y el grupo tratado (23.2 ± 4.4). Los resultados de baja motilidad espermática se deben al vehículo utilizado para el agonista cannabinoide, que afectó por igual a ambos grupos. Sin embargo, la cantidad de espermatozoides móviles recuperada fue suficiente para alcanzar la dosis requerida en el protocolo de fecundación *in vitro*, produciendo embriones a partir de todos los machos del estudio. La producción de embriones mostró resultados similares en ambos grupos, tanto en el porcentaje de ovocitos fecundados, como en las primeras divisiones y en el desarrollo hasta blastocisto. Por tanto, en nuestro experimento observamos que la exposición a THC no afecta a la capacidad de los espermatozoides para fecundar *in vitro* y producir embriones hasta estadios preimplantacionales (**Figura 4.24**).

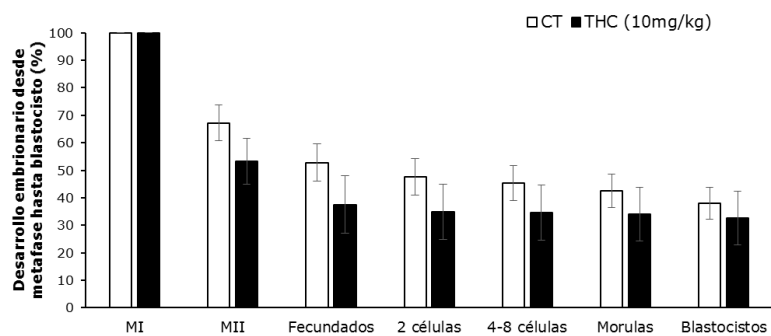


Figura 4.24: El consumo crónico de THC (10 mg/kg de peso/día) no afectó a los porcentajes de fecundación y producción de embriones hasta la etapa de blastocisto. (*) Indica diferencias significativas entre ambos grupos por t-test ($P < 0,05$).

5. Discusión general

Discusión

Papel de los cannabinoides durante la maduración de ovocitos murinos

Con el fin de analizar los mecanismos mediante los cuales los cannabinoides pueden afectar a la maduración ovocitaria y al desarrollo preimplantacional, en esta tesis hemos realizado una serie de experimentos genéticos y farmacológicos para examinar si los cannabinoides actúan a través de sus receptores CB1 y/o CB2, modulando la maduración de ovocitos y el desarrollo embrionario en un modelo murino.

Los receptores CB1 y CB2 están presentes durante el reinicio de la meiosis y el desarrollo embrionario temprano en el modelo murino

De acuerdo con la teoría clásica de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs), para realizar su función el receptor necesita alcanzar la membrana celular (Cahill, et al. 2007, Howlett, et al. 2002), donde se encuentran los mecanismos necesarios para su activación. Nuestros resultados demuestran que ambos receptores se expresan en el ovocito durante el reinicio de la meiosis. Además, la localización de CB1 varía dinámicamente durante el proceso del reinicio de la meiosis y cómo al final de la maduración alcanza una localización periférica que hace al receptor gran candidato a participar en diversas rutas de señalización. Contrariamente, la falta de cambios en la ubicación de CB2 a través de los diferentes estadios de la maduración nuclear, señala una menor participación de este receptor en el proceso de maduración.

El complejo cúmulo-ovocito integrado por el gameto femenino y las células del cúmulo que le rodean es una unidad funcional completa y dinámica que juega un papel fundamental en el metabolismo de los ovocitos durante la maduración (Prates, et al. 2014). Debido a la presencia de ambos receptores CB1 y CB2 en las células de la granulosa, es importante tener en cuenta que los efectos observados en la fosforilación de las proteínas durante la maduración, podrían estar causados por los cannabinoides que actúan directamente en los ovocitos, o bien podrían actuar indirectamente a través de las células que le rodean.

Aunque estudios previos muestran la expresión de ambos receptores durante la etapa preimplantacional (Buckley, et al. 1997, Wang, et al. 2006a), hasta la fecha no existía un estudio de caracterización en el que se describiera la dinámica de expresión de ambos receptores a medida que avanza el desarrollo embrionario. Los patrones de expresión de NAPE-PLD y FAAH, otros componentes del sistema cannabinoide, se encargan de mantener niveles bajos de la AEA en los sitios de implantación. Trabajos previos han demostrado niveles altos de AEA en el momento de la implantación están asociados con la pérdida espontánea de la preñez (Maccarrone, et al. 2002, Maccarrone, et al. 2000). Por lo tanto, existe la teoría que el SC podría estar regulando los mecanismos que señalizan al embrión el sitio adecuado de la implantación (Guo, et al. 2005, Wang, et al. 2007). Nuestros resultados muestran que principalmente el receptor CB1 puede ser el implicado en los efectos causados por los cannabinoides durante esta etapa debido a su patrón de localización. Por otra parte, el aumento en la expresión de CB1 por parte del embrión a partir

de la activación del genoma embrionario y durante las etapas previas a la implantación muestra como el embrión se prepara para la señalización cannabinoide, lo cual podría estar ubicando a este sistema dentro de la comunicación materno-embionaria para garantizar una adecuada implantación.

La presencia de los receptores tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico confirman que la señalización cannabinoide acompaña tanto a la maduración del ovocito como al desarrollo embrionario preimplantacional, lo cual nos da claros indicios de que tanto ovocito como embrión son sensibles a los compuestos endógenos o exógenos que puedan activar el sistema cannabinoide. Es importante entender cuál es la importancia de este sistema de señalización en las primeras etapas de la reproducción para así comprender los posibles efectos que puede tener el creciente consumo de cannabinoides exógenos por uso lúdico o terapéutico sobre la reproducción.

La ausencia de CB1 durante la maduración del ovocito retrasa el desarrollo embrionario y afecta el transporte oviductal

En los experimentos de desarrollo embrionario realizados *in vivo* donde hembras WT y hembras de los tres genotipos en estudio, *Cnr1*^{-/-}, *Cnr2*^{-/-} and *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-}, se aparearon con machos WT, los embriones procedentes de ovocitos *Cnr1*^{-/-} y *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-} mostraron retraso en el desarrollo, mientras que los procedentes de ovocitos WT o *Cnr2*^{-/-} mostraron un desarrollo normal, lo cual sugiere que el retraso se debe a la falta de CB1 pero no a la de CB2 en etapas previas a la fecundación. Sin embargo, la falta de ambos receptores agrava aún más los efectos perjudiciales observados, lo que sugiere que el receptor CB2, aunque no participa directamente en la maduración de los ovocitos, sería capaz de compensar en cierta medida, la falta de CB1. A pesar de la posibilidad descrita por otros autores de que el retraso fuese debido a la retención de los embriones en el oviducto (Paria, et al. 2001, Wang, et al. 2004), nuestros resultados muestran un bajo porcentaje de retención oviductal en hembras *Cnr1*^{-/-} y *Cnr2*^{-/-}, y sólo observamos una retención significativa en el genotipo *Cnr1*^{-/-}/*Cnr2*^{-/-}, lo que indica que la falta de ambos receptores si afecta el transporte oviductal mostrando que el sistema cannabinoide es necesarios para un adecuado transporte a nivel del oviducto.

Además, mediante los experimentos *in vitro*, donde la variable de transporte o retención oviductal era eliminada, observamos el mismo retraso en los embriones que provenían de ovocitos que carecían de la expresión de CB1, y al igual que en los experimentos *in vivo* se observó un fenotipo más marcado cuando carecían de ambos receptores. Previamente se ha reportado que los embriones homocigotos para CB1 sufren retraso en el desarrollo embrionario y esto ha sido atribuido a un deficiente transporte en el oviducto por la falta de CB1 en el tracto reproductivo (Wang, et al. 2004). Nuestros experimentos han demostrado que solo la falta del receptor CB1 durante el proceso de maduración afecta el desarrollo del embrión.

Las observaciones de la baja producción de embriones y el retraso en el desarrollo en ausencia de CB1 durante la maduración de ovocitos en los animales knockouts, refuerzan la idea de que la activación de la vía CB1 durante la MIV puede ser una alternativa que puede utilizarse en este procedimiento para mejorar resultados a nivel de producción embrionaria.

Los cannabinoides pueden activar a través de CB1 el reinicio de la meiosis modulando las proteínas AKT y ERK1/2

La reanudación meiótica del ovocito requiere una drástica caída en los niveles de AMPc producida por la estimulación de la LH y, al mismo tiempo, la señalización dependiente de LH induce la activación y estimulación de las vías MAPK y PI3K/AKT (Hoshino and Sato 2008). Actualmente los modelos de maduración *in vitro* utilizan la vía de señalización de EGFr para inducir el reinicio de la meiosis y se ha comprobado que a través de este receptor se activa ERK1/2 causando el cierre progresivo de las uniones comunicantes entre las células de granulosa y el ovocito, lo que conlleva a una disminución en los niveles de AMPc y un mayor grado de expansión del cúmulo asociado con el reinicio del ciclo meiótico y con una correcta maduración.

Existen evidencias de otras vías independientes al estímulo hormonal para disminuir los niveles de AMPc en el ovocito y reiniciar la meiosis. Anteriormente se ha demostrado que un receptor huérfano, el GPR3, que se localiza en el ovocito, puede mantener el arresto meiótico (Mehlmann, et al. 2004), dando un papel importante los GPCRs y al mecanismo de las proteínas G dentro del proceso de maduración (Mehlmann, et al. 2006). Según diversos trabajos, la estimulación de la subunidad G α i es un camino bien caracterizado para la inactivación de AC, lo que resulta directamente en una reducción del AMPc (Simonds 1999), y se ha descrito tanto para ratón como rata que diferentes isoformas de AC están inactivados por G α i (Hanoune and Defer 2001). Esto apoya la idea de que los GPCR (como CB1) pueden ser inductores de la maduración meiótica actuando a través de la inhibición de AC para causar la caída de los niveles de AMPc. (Mehlmann 2005). Esta vía de señalización despierta gran interés en aquellos casos en los que el uso de hormonas esta contraindicado, ya que, los estímulos para desencadenar la maduración puede provenir de otros compuestos que se acoplen a este tipo de receptores como pueden ser los cannabinoides. Otros estudios en ratones han demostrado utilizando la toxina pertussis, un conocido inhibidor de las proteínas G α i, que la reanudación meiótica no se impidió totalmente cuando los ovocitos son sometidos a estímulos como la LH, mientras que en otras especies como los equinodermos, se ha descrito que la vía a través de las G α i si es necesaria para desencadenar la maduración (Kalinowski, et al. 2003, Mehlmann, et al. 2006, Shilling, et al. 1989). Todos estos datos muestran que el reinicio meiótico de los ovocitos es un proceso multifactorial llevado a cabo por diferentes vías de señalización que pueden actuar en sinergia para obtener una buena calidad ovocitaria y que puede depender o no de estímulos hormonales, sin embargo, aún hoy en día no se conocen en su totalidad.

Como bien se ha establecido, el proceso de maduración *in vitro* se retrasa al compararse con el *in vivo* (Chian, et al. 2004), nuestras observaciones muestran que a pesar de que la localización del receptor CB1 al final del proceso de maduración en el estadio de MII es periférica tanto en los ovocitos madurados *in vivo* como en los ovocitos madurados *in vitro*, se observaron diferencias entre ambos tipos de maduración observando que la localización periférica comienza a ser evidente desde el estadio de GV en la maduración del ovocito es *in vivo* proceso que se ve retrasado en los ovocitos *in vitro*, donde comienza en MI. Estos

hallazgos nos permiten plantear la hipótesis de que la reubicación de CB1 hacia la periferia se produce desde la etapa de GV, ya que en esta etapa CB1 fue localizado periféricamente en ovocitos madurados *in vivo*, donde podría estar participando en rutas de señalización a través de la vía de proteínas G y la inactivación de la AC, para disminuir los niveles de AMPc y reanudar la meiosis.

Nuestras sospechas se confirmaron después de realizar la modulación farmacológica selectiva de CB1 y CB2 durante la maduración utilizando un modelo *in vitro*. Observamos como la presencia de los cannabinoides en el medio de maduración mejoró la competencia de los ovocitos para alcanzar el estadio de blastocisto a través de la señalización mediada por el receptor CB1. Además de esto, se pudo observar una respuesta dosis-dependiente. Cuando se probó el comportamiento de las dos quinasas esenciales en las vías PI3K/AKT y MAPK que regulan la progresión de la meiosis durante la MIV (Sanchez and Smitz 2012), tanto la AKT y ERK1/2, mostraron cambios en su fosforilación solamente cuando se dio la activación selectiva de CB1. Por lo tanto, se debe considerar que los cambios en los patrones de activación de estas dos proteínas ejercidos al estimular CB1 podrían ayudar en la maduración de los ovocitos *in vitro*. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos en ovocitos de hámster que contaban con la expresión del receptor humano CB1, donde se demostró una activación de la vía MAPK y una inhibición de la AC ante la estimulación del receptor con cannabinoides (Bouaboula, et al. 1995).

La maduración de ovocitos implica la activación de diversas vías de transducción de señales que convergen para activar el factor promotor de la maduración (MPF), un complejo que consta de la quinasa CDK1 y la Ciclina B1 (Schmitt and Nebreda 2002). En el complejo pre-MPF, se mantiene en su estado inactivo por la fosforilación de CDK1 a través de las quinasas Wee1/Myt1, que a su vez se mantienen activas por la acción de la PKA que responde a altos niveles intracelulares de AMPc. Uno de los estímulos para desencadenar el reinicio meiótico es bloquear la PKA que se puede dar por la disminución del AMPc, o inactivar directamente las quinasas que mantienen fosforilada la subunidad CDK1. En ovocitos de ratón, se ha demostrado que el bloqueo en la fosforilación de AKT se refleja en una reducción significativa en la actividad o desfosforilación de CDK1 lo que conlleva a un retraso de la reanudación de la meiosis (Kalous, et al. 2009). Además, en los ovocitos de estrellas de mar, Myt1, que es la quinasa inhibidora más importante del complejo MPF en esta especie, es fosforilada e inhibida directamente por AKT, promoviendo así la reanudación de la meiosis (Okumura, et al. 2002). Estos hallazgos ubican a la activación de AKT como un activador del ciclo meiótico. Nuestros experimentos muestran que después de 1 h de MIV, AKT no se fosforiló en presencia o ausencia de HU-210, coincidiendo con observaciones anteriores realizadas en ovocitos de ratón (Chen, et al. 2013). Sin embargo, después de 17 h de MIV, AKT permaneció desfosforilada en presencia del vehículo, mientras que la fosforilación aumentó significativamente y de una manera dosis-dependiente cuando los ovocitos se incubaron con el cannabinoide. Esta observación sugiere que la activación de AKT inducida por HU-210, a través del receptor CB1, podría mejorar la activación de MPF, demostrando que la activación de AKT es necesaria para la transición MI/MII durante la maduración meiótica del ovocito de ratón, como se ha descrito en ovocitos de otras especies como bovinos (Tomek and Smiljakovic 2005) y porcinos (Kalous, et al. 1993).

Del mismo modo, en un modelo de ovocitos de cerda se observó que AKT se desfosforila durante la maduración ineficiente en un medio libre de gonadotropinas, causando una disminución en la expansión de la capa de células del cúmulo y la persistencia de los ovocitos en GV durante 24 h (Kalous, et al. 2009). La ausencia de pAKT junto con la baja producción de blastocistos observada en nuestro grupo control después de 17 h de maduración en comparación con ovocitos madurados en presencia de cannabinoides, podría explicar por qué los ovocitos generados por MIV no son suficientemente competentes para soportar con éxito el desarrollo del embrión. Por lo que esto podría ser una diana terapéutica para estrategias dirigidas a mejorar la eficiencia de la MIV a través de la adición de este tipo de compuestos a los medios de maduración para activar vías de señalización como PI3K/AKT que favorezcan el reinicio de la meiosis.

También es conocido que el aumento de actividad de ERK1/2 producida después de la reanudación de la meiosis es mayor en ovocitos detenidos en MII y disminuye lentamente después de la salida de MII (Schindler 2011). Curiosamente, en la mayoría de los ovocitos que se incubaron durante 17 h en presencia de HU-210, el estado de fosforilación de ERK1/2 era mucho más débil que en los controles, lo que indica que la presencia del cannabinoide, a través de CB1, altera la vía de las MAPK; específicamente a la proteína ERK1/2. Esta disminución de la fosforilación podría explicar en parte el aumento de la producción de embriones observado en nuestros experimentos, ya que se sabe que la desfosforilación de ERK1/2 es una señal necesaria en los ovocitos que salen del segundo arresto meiótico en MII (Moos, et al. 1996, Phillips, et al. 2002). Por lo tanto, creemos que los cannabinoides podrían ayudar a la salida de MII mediante la desfosforilación de ERK1/2, lo que resultaría en el aumento del número de embriones observados después de la maduración de los ovocitos en presencia de HU-210.

En conclusión, en el capítulo 4.1 se demuestra la relevancia de la activación del receptor CB1 en el control de las vías moleculares de PI3K/AKT y MAPK, que juegan un papel importante en la maduración de ovocitos (**Figura 5.1**). Por tanto, proponemos que la activación farmacológica de los receptores CB1 durante la MIV podría suponer una alternativa para obtener ovocitos viable para un proceso de FIV en pacientes que no toleran la estimulación hormonal.

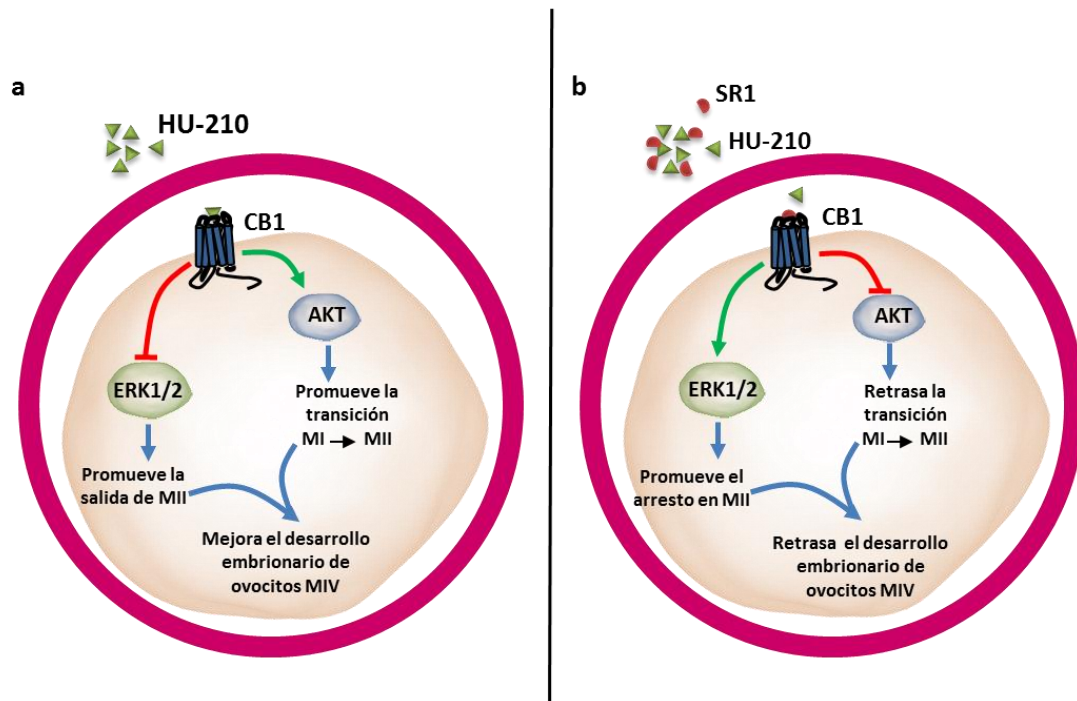


Figura 5.1: Diagrama propuesto del mecanismo de maduración de ovocitos inducida por HU-210. (a) HU-210 se une a los receptores CB1 y estimula la activación de AKT y la inhibición de ERK1/2. Esto conlleva a un aumento en el número ovocitos que adquiere la competencia para completar el desarrollo durante la maduración *in vitro*. (b) Inhibición del receptor CB1 por el antagonista específico SR1 revierte el efecto de HU-210.

El efecto de los cannabinoides en el modelo bovino de maduración ovocitaria

Recientemente se ha demostrado que el sistema cannabinoide está presente durante el proceso de maduración en ovocitos humanos (Agirregoitia, et al. 2016, Peralta, et al. 2011), y lo que es aún más interesante, la dinámica de distribución de los receptores CB1 y CB2 sigue patrones similares al modelo murino que se ha expuesto anteriormente. Sin embargo, antes de poder ser utilizados en cualquier ensayo a nivel de clínica humana es importante evaluar los efectos de los compuestos cannabinoides en otros modelos animales que se asemejen más la especie humana en la fisiología de la maduración y el desarrollo embrionario para verificar sus posibles implicaciones en la calidad y viabilidad de los embriones producidos.

Por esta razón, para este capítulo 4.2 hemos elegido el modelo bovino del cual podríamos decir que es uno en los que más se ha desarrollado la producción *in vitro* de embriones partiendo de la obtención de ovocitos recogidos de ovarios de matadero y sin estimulación hormonal (Lonergan 2006, Moussa, et al. 2015). Nuestra selección del modelo de ovocitos bovinos se basó en el hecho de ser un modelo donde está ampliamente estandarizada la maduración *in vitro* alcanzando un alto porcentaje de ovocitos que completan el reinicio de la meiosis después del tiempo de maduración bajo condiciones *in vitro* (Moussa, et al. 2015, Sirard, et al. 2006), además guardan similitudes con ovocitos humanos en términos de las necesidades metabólicas, la activación del genoma, las interacciones con el medio de cultivo y el desarrollo temprano del embrión (Menezos, et al. 2000, Van Hoeck, et al. 2011).

Con miras a utilizar la señalización cannabinoide como una posible diana terapéutica en clínicas de fertilidad humana, es importante tener en cuenta el tipo de compuesto a utilizar, por esta razón en este nuevo capítulo quisimos probar tanto el agonista sintético HU-210, del cual ya conocemos previamente su modo de actuación en ratones, como la del fitocannabinoide THC, debido a que es un compuesto natural y es el compuesto cannabinoide de mayor relevancia en estudios clínicos (Baker, et al. 2003, Kowal, et al. 2016), por lo que en una hipotética creación de medios de MIV suplementados con cannabinoides, su uso podría tener más probabilidades de aceptación.

Los receptores CB1 y CB2 están presentes durante el reinicio de la meiosis y el desarrollo embrionario temprano en el modelo bovino

Nuestros resultados en este modelo muestran la presencia de ARNm para CB1 en ovocitos, como ocurre en el modelo de ratón. Este resultado podría estar señalando un papel fundamental de la necesidad del receptor CB1 en la adquisición de la competencia del ovocito para soportar la fecundación y el desarrollo embrionario posterior. A nivel de la ubicación de proteínas, hemos observado cambios sólo en la localización de los receptores CB1, el cual se mueve del núcleo hacia la periferia del ovocito a medida que se da el progreso a través de la meiosis, mientras que la localización de los receptores CB2 no varía, de forma muy similar a lo que se describe en el anterior capítulo para el modelo murino y a lo reportado en ovocitos humanos (Peralta, et al. 2011). Dado que este tipo de receptores necesitan alcanzar la superficie celular con el fin de activar la señalización a través de proteínas G (Cahill, et al. 2007), señala a CB1 como un receptor activo durante la maduración de ovocitos, como se reportó previamente en ovocitos humanos (Peralta, et al. 2011). Nuestros resultados también demuestran la funcionalidad de CB1 durante la maduración debido a que modula vías de señalización cuando se usan compuestos que tienen afinidad por dicho receptor. Las observaciones de una dinámica de funcionamiento similar para el receptor CB1 en diferentes especies podrían estar mostrando un mecanismo conservado en la maduración de ovocitos de mamíferos.

A nivel de proteína y al igual que en ratón, en el modelo bovino destaca la localización periférica que encontramos para CB1 tanto durante el reinicio de la meiosis como durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario preimplantacional, mientras que para el CB2 nuevamente no se observan cambios. Esta observación también fue reportada por Paria y colaboradores en ensayos de detección de unión a receptores donde se utilizó marcaje con [3H] anandamida, donde las autorradiografías mostraron la mayoría de los sitios de unión en las células más externas en los estadios de ocho células, mórula y blastocisto (Paria, et al. 1998, Paria, et al. 1995). Sin embargo la anandamida puede tener afinidad por ambos receptores, por lo que nuestros resultados demuestran que la señalización que está afectando al embrión durante su desarrollo preimplantacional es mediada por la vía CB1.

Por otro lado la posibilidad de evaluar durante el desarrollo preimplantacional la expresión de CB1 en dos modelos animales en los que difiere el momento de la activación del genoma embrionario, pero que coinciden el aumento de la expresión para este receptor cuando en ambos se activa el genoma embrionario, nos permite pensar que la señalización mediada por CB1, que previamente se ha demostrado que está

implicada en los procesos de implantación en el modelo murino (Paria, et al. 2001), podría ser también una vía que regule de alguna forma la implantación en otras especies como la bovina o inclusive la humana donde ya se ha demostrado que la alteración de otros componentes del sistema cannabinoide en el momento de la implantación, como los niveles altos de AEA, están asociados con la pérdida espontánea de la preñez (Maccarrone, et al. 2002, Maccarrone, et al. 2000).

La exposición a cannabinoides durante la maduración del ovocito bovino modifica la fosforilación de AKT y ERK1/2

Al igual que en el ovocito de ratón la maduración en ovocitos bovinos implica la activación de diversas vías de transducción de señales, incluyendo las vías PI3K/AKT o MAPK (Cecconi, et al. 2012, Conti, et al. 2012, Schmitt and Nebreda 2002), que terminan desencadenando la activación del factor promotor de la maduración (MPF), un complejo que consta de una quinasa CDK1 y una ciclina B (Schmitt y Nebreda 2002). MYT1 es la quinasa inhibidora más importante del complejo MPF, y ésta es a su vez inhibida por la actividad de pAKT, permitiendo que el bloqueo sobre el MPF cese, promoviendo así la reanudación de la meiosis (Okumura, et al. 2002). Estudios previos en ovocitos de ratón y rata han demostrado que el bloqueo en la actividad AKT conduce a una reducción significativa en la actividad CDK1, retrasando en la reanudación de la meiosis (Kalous, et al. 2009) lo que implica a esta proteína directamente con la reanudación meiótica. Nuestros resultados indican que la exposición de estos ovocitos de HU-210 o THC durante su maduración *in vitro* aumentó la fosforilación de AKT tanto en células de la granulosa como en el ovocito, teniendo respuestas similares a otros tratamientos utilizados para mejorar los índices de maduración, en la fosforilación de las proteínas analizadas, como el tratamiento con LH que induce altos niveles de fosforilación de AKT (Carvalho, et al. 2003). Otros autores han demostrado que los ovocitos de vaca dependen de la activación de AKT para el éxito de la transición MI/MII (Tomek and Smiljakovic 2005).

La vía MAPK es universalmente activa en ovocitos durante la maduración en todos los vertebrados estudiados hasta ahora, sin embargo la cinética de la activación varía en diferentes especies. (Liang, et al. 2007). En especies de granja como bovino y porcino está bien documentado el uso de hormonas con el fin de mejorar los porcentajes de maduración, como la FSH o EGF, compuestos que activan la fosforilación de ERK1/2 (Gonzalez-Robayna, et al. 2000, Wayne, et al. 2007) tempranamente en las células de granulosa y posteriormente en el ovocito coincidiendo con el GVBD (Ebeling, et al. 2007, Gordo, et al. 2001), demostrando que la fosforilación de ERK1/2 es necesaria para la reanudación meiótica (Levesque and Sirard 1995, Su, et al. 2003a). En el capítulo 4.2 se muestra como los cannabinoides tienen un efecto similar a otros promotores de la maduración (Conti, et al. 2012) tanto en la activación de ERK1/2 a nivel de las células de la granulosa y como internamente en el citoplasma del ovocito. Nuestros experimentos también muestran cambios en la velocidad de la progresión meiótica en ovocitos expuestos a los cannabinoides, los cuales comenzaron antes la reanudación meiótica que los ovocitos del grupo de control. Esto apoya lo anteriormente descrito por otros autores donde se le da un papel importante a la vía MAPK en las primeras

etapas de la reanudación de la meiosis en ovocitos bovinos a través de una considerable aceleración del ruptura de la vesícula germinal (GVBD) (Fissore, et al. 1996, Kalous, et al. 1993). Finalmente, hemos observado que después de 24 hr de maduración, ERK1/2 alcanzó su actividad máxima en ovocitos bovinos detenidos en MII.

Previamente se han reportado diferencias entre roedores y animales de granja a nivel de la maduración nuclear de ovocitos (Bilodeau-Goeseels and Magyara 2012). Estas diferencias se evidencian en nuestros resultados a nivel de la vía de las MAPK. En el modelo de ratón observamos que los cannabinoides no parecen afectar el estado de fosforilación de ERK1/2 en las primeras etapas de la maduración y además ejercen un efecto inverso a lo observado en este capítulo, disminuyendo la fosforilación de ERK1/2 en el estadio de MII del ovocito de ratón, este comportamiento de la ERK1/2 en ratones coincide con resultados previos para esta especie, donde se ha detectado la activación de la vía MAPK 2 hr después que se da el GVBD, proponiendo que la MAPK no es requerida para la reanudación de la meiosis (Liang, et al. 2007, Verlhac, et al. 1994). Contrariamente, en ovocitos bovinos, se ha reportado que la vía MAPK se activó en aproximadamente el mismo tiempo que GVBD (8-9 hr de incubación) (Gordo, et al. 2001) considerando que la señalización que ejercen los cannabinoides exógenos al activar ERK1/2 podría estar afectando el tiempo en el que se da el GVBD, lo cual coincide con trabajos previos que muestran que la activación artificial de MAPK puede inducir o promover GVBD (Fissore, et al. 1996). En esta misma línea, nuestros experimentos demostraron como una señal exógena como los cannabinoides son capaces de acelerar el reinicio de la meiosis mostrando una mayor tasa de GVBD solo 2hr después de iniciar la maduración.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que a pesar que la vía MAPK está activa durante la maduración dependiendo de la especie puede estar implicada o no en el reinicio meiótico y en la presentación del GVBD.

El uso de cannabinoides durante la maduración de ovocitos bovinos no altera los porcentajes de desarrollo a blastocisto, pero si su expresión génica

En el capítulo 4.1 observamos una mayor producción de embriones en la etapa de blastocito de los grupos tratados con cannabinoides durante la maduración. Sin embargo en el modelo bovino observamos como la tasa de desarrollo del embrión hasta la etapa de blastocisto no se vio afectada por la exposición a cannabinoides durante MIV. Las diferencias en producción entre ambos modelos ponen nuevamente de manifiesto las diferencias entre roedores y bovino (Bilodeau-Goeseels and Magyara 2012), donde a pesar que se estén modulando las mismas vías de señalización, muestra que al reinicio de la meiosis como un proceso multifactorial y la sinergia entre diversos factores está aún por esclarecer. Sin embargo con este tipo de estudios nos acercamos más a la comprensión de los mecanismos moleculares que se dan durante la reanudación meiótica, lo que ayudará a mejorar técnicas como la maduración de los ovocitos y a encontrar una aplicación óptima de las diferentes combinaciones de compuestos necesarios para obtener una adecuada maduración *in vitro* en el tratamiento de la infertilidad humana.

A pesar que en el modelo bovino no aumentó el porcentaje de embriones obtenido, el tratamiento con HU-210 y THC tuvo un efecto beneficioso sobre la expresión de dos genes relacionados con la calidad del embrión, *Ifnt* y *Gja1*. El interferón tau (*Ifnt*) es la molécula responsable del reconocimiento temprano de la preñez en bovinos. En consecuencia, los blastocistos bovinos producidos *in vivo*, *in vitro* o mediante ICSI muestran una expresión diferencial de *Ifnt* (Arias, et al. 2015, Gutierrez-Adan, et al. 2004), siendo menor la expresión en los blastocistos producidos *in vitro* que en los *in vivo* (Lonergan, et al. 2003). Por otra parte la Connexin43 (*Gja1*) se asocia con la formación de uniones celulares y varios artículos sugieren que su expresión es más baja en los blastocistos producidos *in vitro* frente a sus contrapartes *in vivo* (Gutierrez-Adan, et al. 2004, Rizos, et al. 2002, Tesfaye, et al. 2007). Teniendo en cuenta los resultados de sobreexpresión observada para *Ifnt* y para *Gja1* en los embriones que fueron suplementados con cannabinoides durante la maduración, los resultados sugieren que los cannabinoides pueden mejorar la calidad de los ovocitos y en consecuencia mejorar la calidad de los embriones derivados de dichos ovocitos.

Con los resultados obtenidos en el capítulo 4.2 se pone de manifiesto por primera vez la presencia de los receptores CB1 y CB2 durante la maduración *in vitro* de ovocitos en la especie bovina. Sin embargo, sólo el receptor CB1 muestra cambios en sus dinámicas de expresión y localización, presentando similitud con el modelo de ratón, lo que podría estar mostrando que la señalización cannabinoide principalmente a través de CB1 podría ser un mecanismo conservado en mamíferos durante las primeras etapas del reinicio de la meiosis. Nuestros resultados indican que la exposición a los cannabinoides exógenos como HU-210 y THC durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovino activa vías implicadas en la maduración modulando la fosforilación de AKT y ERK1/2 probablemente a través de la activación de CB1 de forma similar al modelo murino aunque con diferencias claras entre especies. Al adicionar cannabinoides durante la maduración se vieron efectos positivos en la expresión de genes relacionados con la calidad del embrión (*Ifnt* y *Gja1*) y ninguna repercusión sobre el porcentaje de desarrollo a blastocisto. Estos resultados tienen implicaciones importantes no sólo para los procesos de producción de embriones en el ganado sino también como un modelo y una herramienta útil para el cribado preclínico de cómo podrían actuar los cannabinoides dirigidas a la mejora de la maduración y la calidad de los embriones humanos producidos a través de técnicas de reproducción asistida.

Papel de los cannabinoides en la fertilidad del macho

Existen varios trabajos donde se ha descrito la presencia del sistema cannabinoide en espermatozoides de ratones, humanos, cerdos y toros (Agirregoitia, et al. 2010, Aquila, et al. 2010, Gervasi, et al. 2009, Maccarrone, et al. 2005). En el modelo murino también se han cuantificado los receptores, los ligandos AEA y 2-AG, y las enzimas que los metabolizan y a nivel de testículo y conducto deferente (Grimaldi, et al. 2009, Pertwee, et al. 2002), sugiriendo que la señal cannabinoide es un modulador de la espermatogénesis (Grimaldi, et al. 2009). El uso de cannabinoides exógenos *in vivo* ha permitido demostrar que tras la activación de los receptores cannabinoides se da una aceleración de la espermatogénesis, por lo que se les ha considerado como necesarios para la progresión correcta de la espermatogénesis (Di Giacomo,

et al. 2015, Sugiura, et al. 1996); inclusive la señal cannabinoide se compara con la producida por el ácido retinoico como inductores para activar el ciclo meiótico (Di Giacomo, et al. 2015).

Así pues, como hemos comentado previamente, en este capítulo quisimos usar el espermatozoide de ratón para evaluar en primer lugar cuál era la respuesta del espermatozoide frente a un tratamiento agudo con concentraciones crecientes de THC y, en segundo lugar, si el semen tenía capacidad de fecundar después de ser sometido el ratón a un tratamiento sistémico y crónico de THC durante 30 días.

El uso de un tratamiento agudo de THC no altera la movilidad de los espermatozoides

Teniendo en cuenta los trabajos que indican que el espermatozoide puede responder a cannabinoides, nos preguntamos si los cannabinoides podrían afectar a la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides, como han señalado varios autores (Agirregoitia, et al. 2010, Morgan, et al. 2012, Rossato, et al. 2005, Whan, et al. 2006). Por lo tanto, quisimos evaluar a nivel *in vitro* cuál era la respuesta de los espermatozoides al ser sometidos de manera aguda a un cannabinoide exógeno como THC.

Inicialmente evaluamos la respuesta de los espermatozoides, que nunca habían tenido contacto con cannabinoides exógenos, frente a un tratamiento agudo con THC para corroborar cuál era la respuesta en los parámetros de motilidad de los espermatozoides al entrar en contacto con diferentes concentraciones de THC. A pesar de aumentar la concentración de THC, los espermatozoides no respondieron ni disminuyendo ni aumentando su motilidad, contrario a lo reportado por otros autores en ensayos *in vitro* utilizando THC (Morgan, et al. 2012) o ensayos *in vivo* utilizando THC y HU-210 (Banerjee, et al. 2011, M Lewis, et al. 2012). Ciertamente es que en este experimento no se hicieron tiempos largos de incubación como se ha reportado en otras publicaciones de exposición a cannabinoides que superan los 15 min de exposición (Morgan, et al. 2012), debido a que el análisis de la motilidad puede verse afectado por muchos parámetros y, en efecto, un tiempo prolongado aumenta la variabilidad de los resultados (Mortimer 1997).

Las comprobaciones iniciales de la respuesta de los espermatozoides al THC, en las cuales no se vieron diferencias entre los espermatozoides expuestos o no expuestos, nos llevaron a analizar si el consumo crónico de THC sería capaz de afectar la motilidad del espermatozoide, hasta ahora reportada por diversos trabajos, y si afecta la capacidad de los espermatozoides para fecundar, lo cual, hasta el momento, no ha sido evaluado.

El consumo crónico de THC: implicaciones en SNC y sistema reproductivo

En la literatura existen diversos estudios clínicos realizados en la década de los 70 y los 80 que asociaban el consumo del cannabis con una disminución significativa en el recuento y la motilidad espermática y un aumento de las anomalías de espermatozoides provenientes de muestras seminales de pacientes fumadores de marihuana (Hembree III, et al. 1999, Hembree III, et al. 1976, Issidorides 1978, Kolodny, et al. 1974). Posteriormente, los estudios que se han realizado a nivel *in vitro* utilizando el THC, el principal compuesto de la planta, asocian su consumo a la infertilidad en machos, basados sólo en la evaluación de parámetros seminales e histológicos. Principalmente los hallazgos relacionan al THC con

oligospermia, lesiones testiculares que afectan la espermatogénesis y cambios en la morfología y motilidad espermática (Banerjee, et al. 2011, Whan, et al. 2006). Sin embargo, ni los estudios en las décadas pasadas ni los más actuales han llegado a probar si estos espermatozoides tienen potencial para fecundar. Es importante tener en cuenta que los consumidores de cannabis normalmente consumen, además, bebidas alcohólicas en un 97%, tabaco en un 70%, cocaína en un 21% y éxtasis en un 17% (Calafat 2000). Algunos de estos consumos como el tabaquismo están asociados igualmente con un deterioro de la calidad del semen incluyendo la motilidad, concentración y la morfología de las células espermáticas, que son los parámetros más usados en entornos clínicos para evaluar la fertilidad (Sharma, et al. 2016). Sin embargo, se hace difícil separar qué porcentaje del daño es causado por un consumo u otro. Así mismo, no hemos encontrado en la literatura ninguna reseña sobre la incapacidad de los consumidores crónicos de cannabis para tener descendencia.

El hecho de que los cannabinoides puedan afectar la capacidad fecundante de los espermatozoides es de gran importancia, ya que el consumo de cannabinoides a día de hoy va en aumento considerablemente debido a su uso en el tratamiento de ciertas enfermedades, además del consumo recreativo (Cressey 2015, Gerich, et al. 2015, Kowal, et al. 2016). Diversos estudios han realizado análisis del consumo crónico en diferentes especies que incluyen ratón, rata, perros, monos y humanos, donde se utilizan diversos cannabinoides que varían en la concentración desde 2 a 10 mg/kg, en la duración del tratamiento que puede ir de 1 a 28 días y la vía de administración que puede ser intra-peritoneal, oral o inhalatoria, lo cual hace que todos los estudios no sean comparables entre sí. A pesar de la variabilidad, hasta la fecha gran parte de los estudios reportan daños a nivel estructural del testículo y anormalidades del cuadro espermático incluyendo parámetros de concentración y motilidad (Banerjee, et al. 2011, Dalterio 1980, Dixit, et al. 1976, Hirvonen, et al. 2012, Nahas, et al. 2002, Patra and Wadsworth 1991). En este trabajo quisimos hacer un análisis de la capacidad que tenían para fecundar animales expuestos a la dosis más alta de THC de 10mg/kg/día vía intra-peritoneal y con una extensión de 30 días consecutivos de tratamiento.

Está ampliamente demostrado que el THC tiene un efecto claro sobre el SNC. Estos efectos son mediados principalmente por los receptores CB1 (Sim-Selley 2003). Se ha demostrado previamente en el ratón, rata y humano que la exposición crónica a THC y otros agonistas cannabinoides provocan una reducción en cerebro del número de receptores CB1 y una disminución de la señalización como respuesta homeostática (Breivogel, et al. 1999, Hirvonen, et al. 2012, Sim-Selley 2003). En los cerebros de nuestros animales tratados crónicamente con THC encontramos el comportamiento típico para el receptor CB1 observando una disminución de la expresión del ARNm y de la proteína. Además, comprobamos que una de las vías de señalización, que ha sido caracterizada en la activación de este receptor, se modula tras el uso de THC, ya que se genera la fosforilación de AKT y la inhibición en la activación de GSK3 β . Posteriormente, corroboramos que esta regulación en la señalización no se ve controlada por mecanismos epigenéticos. Otros mecanismos como la internalización del receptor pueden ser la causa de la regulación de CB1. Después de comprobar que el modelo de administración ejercía efectos a nivel del SNC, evaluamos en estos

mismos animales las características del aparato reproductor y principalmente nos enfocamos en la viabilidad de los espermatozoides para producir embriones.

Tras el tratamiento crónico con THC, no se vieron diferencias en cuanto al peso corporal, entre el grupo tratado crónicamente con THC y el grupo control, sin embargo, sí que aumentó el tamaño de los testículos y de los epidídimos en los animales tratados. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos donde también se observó un aumento testicular en animales tratados crónicamente con THC durante tres semanas. Además en dichos estudios observaron que no había ninguna alteración en el perfil de hormonas reproductivas como testosterona, LH y FSH, pero sí existía una significativa disminución del comportamiento copulatorio disminuyendo el número de montas (Dalterio 1980, Morgan, et al. 2012). Sin embargo, en el mismo estudio, al utilizar otro cannabinoide el CBD, cuyo mecanismo de acción aún no está esclarecido (Linge, et al. 2016), reflejó, bajo un tratamiento crónico, un resultado contrario disminuyendo el tamaño testicular y los niveles de testosterona y LH (Dalterio 1980). Por otra parte, recientemente se ha reportado un aumento en la concentración de testosterona en respuesta a las altas dosis de THC acumuladas (Marusich, et al. 2015). Sin embargo otros estudios reportan que el THC causa un bloqueo de la GnRH, lo cual disminuye la liberación de FSH y LH y, por consiguiente, afecta a la producción de testosterona a nivel testicular (Harclerode 1984).

También es importante esclarecer cuáles son las vías de actuación para determinar cuál es el efecto de los cannabinoides y si va en contra o a favor de la fisiología espermática. En un estudio de Grimaldi y colaboradores, después de un tratamiento crónico de 21 días con un agonista específico CB2 se demostró un aumento de la frecuencia de la espermatogénesis, mientras tanto, el grupo tratado con un inhibidor para el mismo receptor CB2 mostró una tasa de producción de espermatozoides más lenta, lo que sugiere que se requiere un equilibrio ajustado de la activación cannabinoide para la progresión adecuada de la espermatogénesis (Di Giacomo, et al. 2015, Grimaldi, et al. 2009). Este tipo de estudios ha producido en la comunidad médico-científica declaraciones de que la señal cannabinoide podría ser usada como una estrategia terapéutica para el tratamiento de la infertilidad masculina.

Lo que queda claro hasta el momento es que en los estudios donde se asocian los cannabinoides y la infertilidad del macho, la diversidad en las respuestas generadas por diferentes cannabinoides e incluso el mismo compuesto a diferentes concentraciones pueden generar diferentes tipos de respuesta (Banerjee, et al. 2011, Dalterio 1980, Dixit, et al. 1976, Hirvonen, et al. 2012, Nahas, et al. 2002, Patra and Wadsworth 1991). Sin embargo, con todos los resultados que hasta ahora hay publicados sobre la gameto-toxicidad de los compuestos cannabinoides, sorprende observar cómo cantidades que generan efectos a nivel del SNC, no se hayan visto reflejadas a nivel reproductivo en nuestro trabajo. Por tanto, aún se deben realizar estudios que permitan aclarar cuáles son los efectos, a nivel de la fisiología espermática, que produce cada compuesto cannabinoide individualmente y a través de qué vía puede estar actuando, si es por la activación de CB1, CB2 o ambos, (Patra and Wadsworth 1991).

La evaluación histológica a nivel estructural de los túbulos seminíferos no reveló daños aparentes ya que, en nuestro caso se observó una gametogénesis completa, con anormalidades menores y sin presencia de apoptosis en ambos grupos experimentales, descartando el posible efecto gameto-toxico del THC reportado en otros estudios (Banerjee, et al. 2011, Dalterio 1980, Patra and Wadsworth 1991). También cabe aclarar que en nuestro modelo hemos confirmado el efecto del THC a nivel sistémico, tomando como base el efecto generado en el SNC, lo cual no se comprobó en los estudios previos.

El consumo crónico de THC no afecta la capacidad de los espermatozoides para fecundar *in vitro*

Un informe previo donde se utilizaba THC marcado radiactivamente para estudiar la farmacocinética de este compuesto mostró que la grasa del epidídimo es el tejido que acumula la mayor cantidad de THC representando 5 veces más que la encontrada a nivel cerebral después de 4 h de su administración y aumenta a 8 veces la diferencia entre ambos tejidos después de 24 h (Nahas, et al. 2002). El mismo estudio reveló que después de múltiples inyecciones de THC la acumulación incrementaba en la grasa del epidídimo 80 veces más que en cerebro y testículo (Nahas, et al. 2002). La acumulación de cannabinoides en tejidos grasos está ampliamente descrita para este tipo de compuestos (Rawitch, et al. 1979, Willinsky, et al. 1974). Sin embargo aún no está claro si los cannabinoides acumulados en la grasa que acompaña al epidídimo, afecta los procesos que allí se están desarrollando como las últimas fases de maduración de los espermatozoides, pudiendo afectar la fisiología espermática o la capacidad para fecundar de los espermatozoides. Por esta razón, y más allá de evaluar el tamaño testicular y la composición estructural de los túbulos seminíferos, nuestro objetivo fue evaluar la capacidad para fecundar de los espermatozoides de animales tratados crónicamente con THC en comparación con aquellos que sólo fueron tratados con vehículo.

Por cuestiones experimentales del origen de la muestra, la motilidad de los espermatozoides de los animales utilizados para la experimentación no se pudo evaluar inicialmente debido a que se priorizó el transporte para realizar la FIV (tal y como se explicó anteriormente en el apartado de materiales y métodos). Sin embargo, se evaluó la motilidad en el momento que se utilizaron los espermatozoides para la fecundación *in vitro*, donde se observó una población disminuida de espermatozoides móviles, pero similar entre los grupos, indicando que el THC no generó diferencias en la motilidad espermática tras un consumo crónico.

Los estudios que hasta ahora concluyen que el consumo de cannabinoides causa infertilidad del macho, (Dalterio 1980, M Lewis, et al. 2012, Morgan, et al. 2012) basándose en los efectos en la motilidad y el comportamiento, deberían revisar el concepto de infertilidad debido a que en ninguno de ellos se ha probado la capacidad para fecundar de dichos espermatozoides. Si bien es cierto que la disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles es considerado no favorable dentro de los parámetros seminales, es necesario aclarar que la población restante de espermatozoides móviles puede llegar a fecundar sin problemas. En el caso del comportamiento sexual, la disminución de la libido o el comportamiento copulatorio está netamente ligado al fuerte efecto causado por los cannabinoides a nivel del SNC (Frischknecht, et al. 1982). Nuestros resultados demuestran que después de la fecundación utilizando

muestras seminales de ratones tratados con o sin THC, la producción de embriones fue la misma para ambos grupos. Lo interesante de este resultado es que a pesar de ser semen expuesto a THC y tener una baja población móvil en ambos grupos, la población espermática fue capaz de generar embriones y no se vio un efecto negativo del consumo crónico en la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Los resultados que ha arrojado este estudio muestran la necesidad de plantear nuevas preguntas para entender cómo está afectando el consumo crónico de THC a la fertilidad masculina, donde todavía hay muchos puntos que necesitan ser esclarecidos. Por otra parte, también es necesario plantear cómo afectaría el consumo crónico a las hembras a nivel de la fisiología ovárica, donde hasta ahora se centran los estudios principalmente en el efecto de los cannabinoides a nivel gestacional y no se tienen en cuenta como podrían afectar estos compuestos en etapas previas a la formación del embrión como la maduración del ovocito. Futuros estudios que impliquen la respuesta que se da frente al consumo de cannabinoides en cuanto a perfiles hormonales, acumulación de cannabinoides directamente en las membranas de los gametos y la regulación en la expresión de los receptores y enzimas que componen el sistema tanto en ovocitos como espermatozoides, nos ayudarán a entender los efectos del THC sobre la fertilidad tanto masculina como femenina. Teniendo en cuenta que tanto el consumo terapéutico de cannabinoides como la legalización de los mismos se han visto incrementados en los últimos años, es necesario proporcionar respuestas adecuadas sobre los posibles efectos que puedan tener a nivel reproductivo, sobre todo si la fertilidad se ve comprometida.

6. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en esta tesis son las siguientes:

1. Los cambios de localización del receptor cannabinoide CB1 durante la maduración de ovocitos murinos y bovinos, pasando de una ubicación nuclear en la fase GV a una ubicación periférica en las fases posteriores, sugieren una función relacionada con la activación de proteínas de membrana durante la etapa de maduración.
2. El patrón de transcripción preimplantacional de CB1 indica que el CB1 de origen embrionario puede tener una función en el blastocisto, sin embargo todas las funciones de CB1 en fases anteriores a la activación del genoma embrionario, se deben al transcrito de CB1 de origen maternal.
3. La ausencia del receptor CB1, pero no CB2 durante la etapa de maduración ovocitaria retrasa el desarrollo embrionario en el modelo murino, sin embargo la falta de ambos receptores durante la maduración aumenta el número de ovocitos sin fecundar y afecta tanto el desarrollo embrionario como el transporte a través del oviducto, indicando que el sistema endocannabinoide es especialmente crítico durante la maduración y determinante para procesos posteriores de desarrollo.
4. La señalización provocada por cannabinoides exógenos a través de la activación del receptor CB1, afecta el proceso de maduración a través de la regulación de proteínas AKT y ERK1/2, implicadas en las vías PI3K/AKT y MAPK en ovocitos mamíferos.
5. La adición de cannabinoides a medios de maduración acelera el reinicio de la meiosis, lo cual indica que los receptores cannabinoides pueden ser una diana terapéutica para activar la maduración en pacientes donde el uso de hormonas está contraindicado.
6. Los cannabinoides exógenos adicionados durante la maduración de ovocitos bovinos afectan la calidad embrionaria.
7. El tratamiento agudo o crónico con THC en ratones no altera la histología testicular, la motilidad espermática, ni la capacidad fecundante de los espermatozoides, indicando que se debe reanalizar el efecto específico de los cannabinoides en la infertilidad masculina.

7. Bibliografía

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aban, C, G Leguizamón, M Cella, A Damiano, A Franchi, and M Farina** 2013 Differential expression of endocannabinoid system in normal and preeclamptic placentas: effects on nitric oxide synthesis. *Placenta* **34** 67-74.
- Abou-Haila, A, and DR Tulsiani** 2000 Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **379** 173-182.
- Adhikari, D, and K Liu** 2014 The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol* **382** 480-487.
- Agirregoitia, E, A Carracedo, N Subirán, A Valdivia, N Agirregoitia, L Peralta, G Velasco, and J Irazusta** 2010 The CB 2 cannabinoid receptor regulates human sperm cell motility. *Fertil Steril* **93** 1378-1387.
- Agirregoitia, E, I Ibarra-Lecue, L Totorikaguena, R Mendoza, A Exposito, R Matorras, L Uriguen, and N Agirregoitia** 2015a Dynamics of expression and localization of the cannabinoid system in granulosa cells during oocyte nuclear maturation. *Fertil Steril*.
- Agirregoitia, E, I Ibarra-Lecue, L Totorikaguena, R Mendoza, A Expósito, R Matorras, L Urigüen, and N Agirregoitia** 2015b Dynamics of expression and localization of the cannabinoid system in granulosa cells during oocyte nuclear maturation. *Fertil Steril* **104** 753-760.
- Agirregoitia, E, L Totorikaguena, A Exposito, R Mendoza, R Matorras, and N Agirregoitia** 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*.
- Albertini, DF, C Combelles, E Benecchi, and MJ Carabatsos** 2001 Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* **121** 647-653.
- Alves, MG, L Rato, RA Carvalho, PI Moreira, S Socorro, and PF Oliveira** 2013 Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70** 777-793.
- Amoako, A, T Marczylo, E Marczylo, J Elson, J Willets, A Taylor, and J Konje** 2013 Anandamide modulates human sperm motility: implications for men with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod* **28** 2058-2066.
- Aquila, S, C Guido, A Santoro, I Perrotta, C Laezza, M Bifulco, and A Sebastiano** 2010 Human sperm anatomy: ultrastructural localization of the cannabinoid1 receptor and a potential role of anandamide in sperm survival and acrosome reaction. *The Anatomical Record* **293** 298-309.
- Arellano, RO, A Martínez-Torres, and E Garay** 2002 Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol Reprod* **67** 837-846.
- Arias, ME, J Risopatron, R Sanchez, and R Felmer** 2015 Intracytoplasmic sperm injection affects embryo developmental potential and gene expression in cattle. *Reprod Biol* **15** 34-41.
- Ascoli, M, F Fanelli, and DL Segaloff** 2002 The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine reviews* **23** 141-174.
- Ashton, JC, D Friberg, CL Darlington, and PF Smith** 2006 Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neuroscience letters* **396** 113-116.
- Badawy, ZS, KR Chohan, DA Whyte, HS Penefsky, OM Brown, and A-K Souid** 2009 Cannabinoids inhibit the respiration of human sperm. *Fertil Steril* **91** 2471-2476.
- Baerwald, AR, GP Adams, and RA Pierson** 2012 Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum Reprod Update* **18** 73-91.
- Bagavandoss, P, and S Grimshaw** 2010 Temporal and spatial distribution of the cannabinoid receptors (CB1, CB2) and fatty acid amide hydroxylase in the rat ovary. *Anat Rec (Hoboken)* **293** 1425-1432.
- Baker, D, G Pryce, G Giovannoni, and AJ Thompson** 2003 The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* **2** 291-298.

- Banerjee, A, A Singh, P Srivastava, H Turner, and A Krishna** 2011 Effects of chronic bhang (cannabis) administration on the reproductive system of male mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* **92** 195-205.
- Barbonetti, A, M Vassallo, D Fortunato, S Francavilla, M Maccarrone, and F Francavilla** 2010 Energetic metabolism and human sperm motility: impact of CB1 receptor activation. *Endocrinology* **151** 5882-5892.
- Barnes, F, and W Eyestone** 1990 Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* **33** 141-152.
- Bashirullah, A, RL Cooperstock, and HD Lipshitz** 2001 Spatial and temporal control of RNA stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98** 7025-7028.
- Battista, N, C Rapino, M Di Tommaso, M Bari, N Pasquariello, and M Maccarrone** 2008 Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Mol Cell Endocrinol* **286** S17-S23.
- Bedzhov, I, SJ Graham, CY Leung, and M Zernicka-Goetz** 2014 Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **369** 20130538.
- Bermejo-Alvarez, P, D Rizos, D Rath, P Lonergan, and A Gutierrez-Adan** 2010 Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** 3394-3399.
- Besenfelder, U, V Havlicek, and G Brem** 2012 Role of the oviduct in early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* **47** 156-163.
- Bilodeau-Goeseels, S, and N Magyara** 2012 The control of meiotic arrest and resumption in mammalian oocytes: INTECH Open Access Publisher.
- Blázquez, C, ML Casanova, A Planas, TG del Pulgar, C Villanueva, MJ Fernández-Aceñero, J Aragonés, JW Huffman, JL Jorcano, and M Guzmán** 2003 Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *The FASEB Journal* **17** 529-531.
- Block, E** 1953 A quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants. *Cells Tissues Organs* **17** 201-206.
- Bornslaeger, EA, and RM Schultz** 1985 Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol Reprod* **33** 698-704.
- Bouaboula, M, C Poinot-Chazel, B Bourrie, X Canat, B Calandra, M Rinaldi-Carmona, G Le Fur, and P Casellas** 1995 Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* **312 (Pt 2)** 637-641.
- Breivogel, CS, SR Childers, SA Deadwyler, RE Hampson, LJ Vogt, and LJ Sim-Selley** 1999 Chronic Δ 9-Tetrahydrocannabinol Treatment Produces a Time-Dependent Loss of Cannabinoid Receptors and Cannabinoid Receptor-Activated G Proteins in Rat Brain. *Journal of neurochemistry* **73** 2447-2459.
- Broekmans, FJ, EA Knauff, ER te Velde, NS Macklon, and BC Fauser** 2007 Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **18** 58-65.
- Brown, C, J LaRocca, J Pietruska, M Ota, L Anderson, SD Smith, P Weston, T Rasoulpour, and ML Hixon** 2010 Subfertility caused by altered follicular development and oocyte growth in female mice lacking PKBalpha/Akt1. *Biol Reprod* **82** 246-256.
- Buckley, N, S Hansson, G Harta, and E Mezey** 1997 Expression of the CB 1 and CB 2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* **82** 1131-1149.
- Cabral, GA, KN Harmon, and SJ Carlisle** 2002 Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB1 receptor participation, Neuroimmune Circuits, Drugs of Abuse, and Infectious Diseases, pp. 207-214. Springer.
- Cacciola, G, T Chioccarelli, S Fasano, R Pierantoni, and G Cobellis** 2013 Estrogens and spermiogenesis: new insights from type 1 cannabinoid receptor knockout mice. *International journal of endocrinology* **2013**.
- Cacciola, G, T Chioccarelli, K Mackie, R Meccariello, C Ledent, S Fasano, R Pierantoni, and G Cobellis** 2008 Expression of type-1 cannabinoid receptor during rat postnatal testicular development: possible involvement in adult leydig cell differentiation. *Biol Reprod* **79** 758-765.

- Cahill, CM, SV Holdridge, and A Morinville** 2007 Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends Pharmacol Sci* **28** 23-31.
- Calafat, A** 2000 Consumo y consumidores de cannabis en la vida recreativa. *Adicciones* **12** 197-230.
- Carlo, GD, and AA Izzo** 2003 Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert opinion on investigational drugs* **12** 39-49.
- Carvalho, CR, JB Carvalheira, MH Lima, SF Zimmerman, LC Caperuto, A Amanso, AL Gasparetti, V Meneghetti, LF Zimmerman, LA Velloso, and MJ Saad** 2003 Novel signal transduction pathway for luteinizing hormone and its interaction with insulin: activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and phosphoinositol 3-kinase/Akt pathways. *Endocrinology* **144** 638-647.
- Cecconi, S, A Mauro, V Cellini, and F Patacchiola** 2012 The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int J Dev Biol* **56** 809-817.
- Cecconi, S, G Rossi, A Santilli, L Di Stefano, Y Hoshino, E Sato, MG Palmerini, and G Macchiarelli** 2010 Akt expression in mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Reprod Biomed Online* **20** 35-41.
- Clermont, Y** 1972 Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews* **52** 198-236.
- Conti, M, M Hsieh, AM Zamah, and JS Oh** 2012 Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* **356** 65-73.
- Cota, D, G Marsicano, M Tschöp, Y Grübler, C Flachskamm, M Schubert, D Auer, A Yassouridis, C Thöne-Reineke, and S Ortman** 2003 The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *The Journal of clinical investigation* **112** 423-431.
- Coticchio, G, M Dal Canto, M Mignini Renzini, MC Guglielmo, F Brambillasca, D Turchi, PV Novara, and R Fadini** 2015 Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update* **21** 427-454.
- Cousineau, TM, and AD Domar** 2007 Psychological impact of infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **21** 293-308.
- Cressey, D** 2015 The cannabis experiment. *Nature* **524** 280-283.
- Croxford, JL, and T Yamamura** 2005 Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *Journal of neuroimmunology* **166** 3-18.
- Cummins, J** 2004 The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **115** S23-S29.
- Cha, KY, JJ Koo, JJ Ko, DH Choi, SY Han, and TK Yoon** 1991 Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* **55** 109-113.
- Chang, M** 1955 The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *Journal of Experimental Zoology* **128** 379-405.
- Chen, J, S Torcia, F Xie, CJ Lin, H Cakmak, F Franciosi, K Horner, C Onodera, JS Song, MI Cedars, M Ramalho-Santos, and M Conti** 2013 Somatic cells regulate maternal mRNA translation and developmental competence of mouse oocytes. *Nat Cell Biol* **15** 1415-1423.
- Chen, L, PT Russell, and WJ Larsen** 1994 Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. *Biol Reprod* **51** 290-295.
- Chian, RC, WM Buckett, and SL Tan** 2004 In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* **8** 148-166.
- Chioccarelli, T, G Cacciola, L Altucci, SE Lewis, L Simon, G Ricci, C Ledent, R Meccariello, S Fasano, and R Pierantoni** 2010 Cannabinoid receptor 1 influences chromatin remodeling in mouse spermatids by affecting content of transition protein 2 mRNA and histone displacement. *Endocrinology* **151** 5017-5029.
- Christians, E, M Boiani, S Garagna, C Dessy, CA Redi, JP Renard, and M Zuccotti** 1999 Gene expression and chromatin organization during mouse oocyte growth. *Dev Biol* **207** 76-85.

- Dalterio, SL** 1980 Perinatal or adult exposure to cannabinoids alters male reproductive functions in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **12** 143-153.
- Daponte, A, E Deligeoroglou, A Garas, S Pournaras, C Hadjichristodoulou, and IE Messinis** 2013 Activin A and follistatin as biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion. *Disease markers* **35** 497-503.
- Delvigne, A, and S Rozenberg** 2002 Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update* **8** 559-577.
- Devane, WA, Fr Dysarz, MR Johnson, LS Melvin, and AC Howlett** 1988 Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* **34** 605-613.
- Devane, WA, L Hanus, A Breuer, RG Pertwee, LA Stevenson, G Griffin, D Gibson, A Mandelbaum, A Etinger, and R Mechoulam** 1992 Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258** 1946-1949.
- Di Blasio, AM, M Vignali, and D Gentilini** 2013 The endocannabinoid pathway and the female reproductive organs. *Journal of molecular endocrinology* **50** R1-R9.
- Di Giacomo, D, E De Domenico, C Sette, R Geremia, and P Grimaldi** 2015 Type 2 cannabinoid receptor contributes to the physiological regulation of spermatogenesis. *The FASEB Journal* fj. 15-279034.
- Di Marzo, V, A Fontana, H Cadas, S Schinelli, G Cimino, J-C Schwartz, and D Piomelli** 1994 Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.
- Dixit, V, CL Gupta, and M Agrawal** 1976 Testicular degeneration and necrosis induced by chronic administration of cannabis extract in dogs. *Endokrinologie* **69** 299-305.
- Duranthon, V, and J Renard** 2001 The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* **55** 1277-1289.
- Ebeling, S, C Schuon, and B Meinecke** 2007 Mitogen-activated protein kinase phosphorylation patterns in pig oocytes and cumulus cells during gonadotrophin-induced resumption of meiosis in vitro. *Zygote* **15** 139-147.
- Edwards, RG** 1962 Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals.
- Edwards, RG** 1965 Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* **208** 349-351.
- El-Talatini, MR, AH Taylor, JC Elson, L Brown, AC Davidson, and JC Konje** 2009a Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS One* **4** e4579.
- El-Talatini, MR, AH Taylor, and JC Konje** 2009b Fluctuation in anandamide levels from ovulation to early pregnancy in in-vitro fertilization-embryo transfer women, and its hormonal regulation. *Hum Reprod* **24** 1989-1998.
- EISohly, MA** 2002 Chemical constituents of cannabis: Haworth Press, New York.
- Eppig, JJ** 1991 Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* **13** 569-574.
- Eppig, JJ** 2001 Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* **122** 829-838.
- Eppig, JJ, K Wigglesworth, and FL Pendola** 2002 The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99** 2890-2894.
- F Pizarro, and JG Velasco** 2007 Epidemiología de la esterilidad. *Tratado de Reproducción Humana para Enfermería* 13-22.
- Fair, T** 2003 Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* **78** 203-216.
- Fan, H-Y, Z Liu, M Shimada, E Sterneck, PF Johnson, SM Hedrick, and JS Richards** 2009 MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* **324** 938-941.
- Fattore, L, and W Fratta** 2011 Beyond THC: the new generation of cannabinoid designer drugs. *Frontiers in behavioral neuroscience* **5**.

- Feliú, A, M Moreno-Martet, M Mecha, F Carrillo-Salinas, E Lago, J Fernández-Ruiz, and C Guaza** 2015 A Sativex®-like combination of phytocannabinoids as a disease-modifying therapy in a viral model of multiple sclerosis. *British journal of pharmacology* **172** 3579-3595.
- Ferguson, SS, WE Downey, A-M Colapietro, LS Barak, L Ménard, and MG Caron** 1996 Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271** 363-366.
- Ferreira, E, A Vireque, P Adona, F Meirelles, R Ferriani, and P Navarro** 2009 Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71** 836-848.
- Fissore, RA, CL He, and GF Vande Woude** 1996 Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* **55** 1261-1270.
- Forabosco, A, C Sforza, A De Pol, L Vizzotto, L Marzona, and VF Ferrario** 1991 Morphometric study of the human neonatal ovary. *The Anatomical Record* **231** 201-208.
- Fortune, J, R Cushman, C Wahl, and S Kito** 2000 The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* **163** 53-60.
- Francis, S, C Poteet-Smith, J Busch, R Richie-Jannetta, and J Corbin** 2002 Mechanisms of autoinhibition in cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **7** d580-592.
- Frankhauser, M** 2002 History of cannabis in Western medicine: New York: The Haworth Integrative Healing Press.
- Fraser, L, S Adeoya-Osiguwa, R Baxendale, and R Gibbons** 2005 Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **11** 1636-1645.
- Frischknecht, H, B Sieber, and P Waser** 1982 Effects of multiple, chronic and early hashish exposure on mating behavior, nest-building and gestation in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **72** 363-368.
- Fulka, J, N First, and R Moor** 1998 Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* **4** 41-49.
- Gadella, BM, and JP Evans** 2011 Membrane fusions during mammalian fertilization, Cell Fusion in Health and Disease, pp. 65-80. Springer.
- Galiegue, S, S Mary, J Marchand, D Dussossoy, D Carriere, P Carayon, M Bouaboula, D Shire, G Le Fur, and P Casellas** 1995 Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* **232** 54-61.
- Galve-Roperh, I, D Rueda, TG del Pulgar, G Velasco, and M Guzmán** 2002 Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* **62** 1385-1392.
- Galloway, SM, KP McNatty, LM Cambridge, MP Laitinen, JL Juengel, TS Jokiranta, RJ McLaren, K Luuro, KG Dodds, and GW Montgomery** 2000 Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature genetics* **25** 279-283.
- Gaoni, Y, and R Mechoulam** 1964 Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* **86** 1646-1647.
- Gebeh, AK, JM Willets, EL Marczyklo, AH Taylor, and JC Konje** 2012 Ectopic pregnancy is associated with high anandamide levels and aberrant expression of FAAH and CB1 in fallopian tubes. *J Clin Endocrinol Metab* **97** 2827-2835.
- Gerich, ME, RW Isfort, B Brimhall, and CA Siegel** 2015 Medical Marijuana for Digestive Disorders: High Time to Prescribe&quest. *The American journal of gastroenterology* **110** 208-214.
- Gervasi, MG, TH Marczyklo, PM Lam, S Rana, AM Franchi, JC Konje, and S Perez-Martinez** 2013 Anandamide levels fluctuate in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *PLoS One* **8** e72521.

- Gervasi, MG, C Osycka-Salut, J Caballero, M Vazquez-Levin, E Pereyra, S Billi, A Franchi, and S Perez-Martinez** 2011 Anandamide capacitates bull spermatozoa through CB1 and TRPV1 activation. *PLoS One* **6** e16993.
- Gervasi, MG, M Rapanelli, ML Ribeiro, M Farina, S Billi, AM Franchi, and S Perez Martinez** 2009 The endocannabinoid system in bull sperm and bovine oviductal epithelium: role of anandamide in sperm-oviduct interaction. *Reproduction* **137** 403-414.
- Gilchrist, R, L Ritter, and D Armstrong** 2004 Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* **82** 431-446.
- Gilchrist, RB, M Lane, and JG Thompson** 2008 Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* **14** 159-177.
- Gilchrist, RB, and JG Thompson** 2007 Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* **67** 6-15.
- Gilula, NB, ML Epstein, and WH Beers** 1978 Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* **78** 58-75.
- Glass, M, and CC Felder** 1997 Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *The Journal of neuroscience* **17** 5327-5333.
- Glass, M, and JK Northup** 1999 Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* **56** 1362-1369.
- Gnoth, C, E Godehardt, P Frank-Herrmann, K Friol, J Tigges, and G Freundl** 2005 Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod* **20** 1144-1147.
- Golech, SA, RM McCarron, Y Chen, J Bembry, F Lenz, R Mechoulam, E Shohami, and M Spatz** 2004 Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Molecular Brain Research* **132** 87-92.
- Gonzalez-Robayna, IJ, AE Falender, S Ochsner, GL Firestone, and JS Richards** 2000 Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* **14** 1283-1300.
- Gordo, AC, CL He, S Smith, and RA Fissore** 2001 Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* **59** 106-114.
- Griesinger, G, K Diedrich, B Tarlatzis, and E Kolibianakis** 2006 GnRH-antagonists in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* **13** 628-638.
- Grimaldi, P, P Orlando, S Di Siena, F Lolicato, S Petrosino, T Bisogno, R Geremia, L De Petrocellis, and V Di Marzo** 2009 The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** 11131-11136.
- Griswold, MD** 2016 Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological reviews* **96** 1-17.
- Griswold, MD, and JM Oatley** 2013 Concise review: defining characteristics of mammalian spermatogenic stem cells. *Stem cells* **31** 8-11.
- Gualtieri, R, R Boni, E Tosti, M Zagami, and R Talevi** 2005 Intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation during the release of bovine sperm adhering to the fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction* **129** 51-60.
- Guo, Y, H Wang, Y Okamoto, N Ueda, PJ Kingsley, LJ Marnett, HH Schmid, SK Das, and SK Dey** 2005 N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D is an important determinant of uterine anandamide levels during implantation. *Journal of Biological Chemistry* **280** 23429-23432.
- Guraya, SS** 2012 *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*: Springer Science & Business Media.
- Gutierrez-Adan, A, D Rizos, T Fair, PN Moreira, B Pintado, J de la Fuente, MP Boland, and P Lonergan** 2004 Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* **68** 441-448.

- Gutierrez-Adan, A, CR White, A Van Soom, and MR Mann** 2015 Why we should not select the faster embryo: lessons from mice and cattle. *Reproduction, Fertility and Development* **27** 765-775.
- Guzick, DS, JW Overstreet, P Factor-Litvak, CK Brazil, ST Nakajima, C Coutifaris, SA Carson, P Cisneros, MP Steinkampf, and JA Hill** 2001 Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine* **345** 1388-1393.
- Guzmán, M, and C Sánchez** 1999 Effects of cannabinoids on energy metabolism. *Life sciences* **65** 657-664.
- Gye, M, H Kang, and H Kang** 2005 Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes. *Archives of andrology* **51** 247-255.
- Habayeb, OM, AH Taylor, MD Evans, MS Cooke, DJ Taylor, SC Bell, and JC Konje** 2004 Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women--a potential role in pregnancy maintenance and labor? *J Clin Endocrinol Metab* **89** 5482-5487.
- Halupczok, J, A Kluba-Szyska, B Bidzińska-Speichert, and B Knychalski** 2015 Ovarian Hyperstimulation Caused by Gonadotroph Pituitary Adenoma--Review. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University* **24** 695.
- Hamatani, T, MG Carter, AA Sharov, and MS Ko** 2004 Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental cell* **6** 117-131.
- Hanoune, J, and N Defer** 2001 Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41** 145-174.
- Hansen, KR, NS Knowlton, AC Thyer, JS Charleston, MR Soules, and NA Klein** 2008 A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod* **23** 699-708.
- Harclerode, J** 1984 Endocrine effects of marijuana in the male: preclinical studies. *NIDA Res. Monogr* **44** 46-64.
- Hardy, K** 2002 The oocyte as a machine. *Assisted reproductive technology. Accomplishments and new horizons. Cambridge University Press, Cambridge* 70-80.
- Healy, DL, AO Trounson, and AN Andersen** 1994 Female infertility: causes and treatment. *The Lancet* **343** 1539-1544.
- Hembree III, WC, GG Nahas, P Zeidenberg, and HF Huang** 1999 Changes in human spermatozoa associated with high-dose marijuana smoking, Marijuana and medicine, pp. 367-378. Springer.
- Hembree III, WC, P Zeidenberg, and GG Nahas** 1976 Marijuana's effects on human gonadal function, Marijuana, pp. 521-532. Springer.
- Herkenham, M, AB Lynn, MR Johnson, LS Melvin, BR de Costa, and KC Rice** 1991 Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of neuroscience* **11** 563-583.
- Herkenham, M, AB Lynn, MD Little, MR Johnson, LS Melvin, BR De Costa, and KC Rice** 1990 Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87** 1932-1936.
- Herrera, B, A Carracedo, M Diez-Zaera, TG del Pulgar, M Guzmán, and G Velasco** 2006 The CB 2 cannabinoid receptor signals apoptosis via ceramide-dependent activation of the mitochondrial intrinsic pathway. *Exp Cell Res* **312** 2121-2131.
- Hinckley, M, S Vaccari, K Horner, R Chen, and M Conti** 2005 The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev Biol* **287** 249-261.
- Hirvonen, J, R Goodwin, C-T Li, G Terry, S Zoghbi, C Morse, V Pike, N Volkow, M Huestis, and R Innis** 2012 Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Molecular psychiatry* **17** 642-649.
- Holm, P, PJ Booth, MH Schmidt, T Greve, and H Callesen** 1999 High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52** 683-700.

- Horne, AW, JA Phillips III, N Kane, PC Lourenco, SE McDonald, AR Williams, C Simon, SK Dey, and HO Critchley 2008 CB1 expression is attenuated in Fallopian tube and decidua of women with ectopic pregnancy. *PLoS One* **3** e3969.
- Horner, K, G Livera, M Hinckley, K Trinh, D Storm, and M Conti 2003 Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental biology* **258** 385-396.
- Hoshino, Y, and E Sato 2008 Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes. *Dev Biol* **314** 215-223.
- Howlett, A, F Barth, T Bonner, G Cabral, P Casellas, W Devane, C Felder, M Herkenham, K Mackie, and B Martin 2002 International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews* **54** 161-202.
- Howlett, AC 2004 Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *Br J Pharmacol* **142** 1209-1218.
- Howlett, AC, and RM Fleming 1984 Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* **26** 532-538.
- Hsueh, AJ, K Kawamura, Y Cheng, and BC Fauser 2014 Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine reviews* **36** 1-24.
- Hunter, M 2000 Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction* **5** 122-130.
- Hunter, R 2008 Sperm release from oviduct epithelial binding is controlled hormonally by periovulatory graafian follicles. *Mol Reprod Dev* **75** 167-174.
- Hunter, R, and H Rodriguez-Martinez 2004 Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Mol Reprod Dev* **67** 243-250.
- Hutt, K, E McLaughlin, and M Holland 2006 Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Mol Hum Reprod* **12** 61-69.
- Ibarra-Lecue, I, R Díez-Alarcia, ÁP López-Cardona, LF Callado, E Agirregoitia, and L Urigüen 2015 Evaluation of the functional selectivity of cannabinoid receptors signaling in mouse brain cortex 7th European Workshop on Cannabinoid Research and IACM 8th Conference on Cannabinoids in Medicine, pp. 54. Sestri Levante, Italy 17-19 September 2015.
- Issidorides, MR 1978 Observations in chronic hashish users: nuclear aberrations in blood and sperm and abnormal acrosomes in spermatozoa. *Advances in the biosciences* **22** 377.
- Jakobs, KH, K Aktories, and G Schultz 1984 Mechanism of pertussis toxin action on the adenylate cyclase system. *European journal of biochemistry* **140** 177-181.
- Jequier, AM 2010 Semen analysis: a new manual and its application to the understanding of semen and its pathology. *Asian J Androl* **12** 11-13.
- Jie, L, G Bin, F MIRSHAHI, AJ SANYAL, AD KHANOLKAR, A MAKRIYANNIS, and G KUNOS 2000 Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochemical Journal* **346** 835-840.
- Johnson, GD, C Lalancette, AK Linnemann, F Leduc, G Boissonneault, and SA Krawetz 2011 The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* **141** 21-36.
- Kalinowski, RR, CH Berlot, TL Jones, LF Ross, LA Jaffe, and LM Mehlmann 2004 Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a G s protein-mediated pathway. *Dev Biol* **267** 1-13.
- Kalinowski, RR, LA Jaffe, KR Foltz, and AF Giusti 2003 A receptor linked to a Gi-family G-protein functions in initiating oocyte maturation in starfish but not frogs. *Dev Biol* **253** 139-149.
- Kalous, J, M Kubelka, Z Rimkevics, P Guerrier, and J Motlik 1993 Okadaic acid accelerates germinal vesicle breakdown and overcomes cycloheximide- and 6-dimethylaminopurine block in cattle and pig oocytes. *Dev Biol* **157** 448-454.
- Kalous, J, M Kubelka, P Solc, A Susor, and J Motlik 2009 AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction* **138** 645-654.
- Kidder, GM, and BC Vanderhyden 2010 Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **88** 399-413.

- Kobayashi, Y, S Arai, K Waku, and T Sugiura** 2001 Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *Journal of biochemistry* **129** 665-669.
- Kolodny, RC, WH Masters, RM Kolodner, and G Toro** 1974 Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marijuana use. *New England Journal of Medicine* **290** 872-874.
- Kowal, MA, A Hazekamp, and F Grotenhermen** 2016 Review on clinical studies with cannabis and cannabinoids 2010-2014. *Cannabinoids* **11** 1515.
- Kupka, M, T D'Hooghe, A Ferraretti, J de Mouzon, K Erb, J Castilla, C Calhaz-Jorge, C De Geyter, V Goossens, and EI-M Consortium** 2016 Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* **31** 233-248.
- Lam, PM, TH Marczylo, M El-Talatini, M Finney, V Nallendran, AH Taylor, and JC Konje** 2008 Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the measurement of anandamide in human plasma. *Anal Biochem* **380** 195-201.
- Latham, KE** 1999 Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *International review of cytology* **193** 71-124.
- Lawrence, D, and E Gill** 1975 The effects of Δ^1 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol Pharmacol* **11** 595-602.
- Lee, H-J, DH Barad, VA Kushnir, A Shohat-Tal, E Lazzaroni-Tealdi, Y-G Wu, and N Gleicher** 2015 Rescue in vitro maturation (IVM) of immature oocytes in stimulated cycles in women with low functional ovarian reserve (LFOR). *Endocrine* 1-7.
- Levesque, JT, and MA Sirard** 1995 Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* **42** 114-121.
- Li, H-L** 1973 An archaeological and historical account of cannabis in China. *Economic Botany* **28** 437-448.
- Li, H-L** 1978 Hallucinogenic plants in Chinese herbals. *Journal of Psychoactive Drugs* **10** 17-26.
- Liang, CG, YQ Su, HY Fan, H Schatten, and QY Sun** 2007 Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* **21** 2037-2055.
- Linge, R, L Jiménez-Sánchez, L Campa, F Pilar-Cuéllar, R Vidal, A Pazos, A Adell, and Á Díaz** 2016 Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT 1A receptors. *Neuropharmacology* **103** 16-26.
- Liu, K, S Rajareddy, L Liu, K Jagarlamudi, K Boman, G Selstam, and P Reddy** 2006 Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Dev Biol* **299** 1-11.
- Liu, L, S Rajareddy, P Reddy, K Jagarlamudi, C Du, Y Shen, Y Guo, K Boman, E Lundin, and U Ottander** 2007 Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase-3 by soluble kit ligand in mouse oocytes during early follicular development. *Journal of molecular endocrinology* **38** 137-146.
- Liu, M** 2011 The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology* **9** 149.
- Lonergan, P** 2006 State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **64** 315-325.
- Lonergan, P, C Carolan, A Van Langendonck, I Donnay, H Khatir, and P Mermillod** 1996 Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* **54** 1420-1429.
- Lonergan, P, T Fair, N Forde, and D Rizos** 2016 Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*.
- Lonergan, P, D Rizos, A Gutierrez-Adan, PM Moreira, B Pintado, J de la Fuente, and MP Boland** 2003 Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol Reprod* **69** 1424-1431.
- Lopera-Vasquez, R, M Hamdi, V Maillo, V Lloreda, P Coy, A Gutierrez-Adan, P Bermejo-Alvarez, and D Rizos** 2015 Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*.

- Lowther, KM, VO Nikolaev, and LM Mehlmann** 2011 Endocytosis in the mouse oocyte and its contribution to cAMP signaling during meiotic arrest. *Reproduction* **141** 737-747.
- Luciano, AA, A Lanzone, and AJ Goverde** 2013 Management of female infertility from hormonal causes. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* **123** S9-S17.
- M Lewis, S, R Paro, L Borriello, L Simon, L Robinson, Z Dincer, G Riedel, N Battista, and M Maccarrone** 2012 Long-term use of HU210 adversely affects spermatogenesis in rats by modulating the endocannabinoid system. *International journal of andrology* **35** 731-740.
- Maccarrone, M** 2009 Endocannabinoids: friends and foes of reproduction. *Progress in lipid research* **48** 344-354.
- Maccarrone, M, I Bab, T Bíró, GA Cabral, SK Dey, V Di Marzo, JC Konje, G Kunos, R Mechoulam, and P Pacher** 2015 Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci* **36** 277-296.
- Maccarrone, M, B Barboni, A Paradisi, N Bernabò, V Gasperi, MG Pistilli, F Fezza, P Lucidi, and M Mattioli** 2005 Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci* **118** 4393-4404.
- Maccarrone, M, T Bisogno, H Valensise, N Lazzarin, F Fezza, C Manna, V Di Marzo, and A Finazzi-Agrò** 2002 Low fatty acid amide hydrolase and high anandamide levels are associated with failure to achieve an ongoing pregnancy after IVF and embryo transfer. *Mol Hum Reprod* **8** 188-195.
- Maccarrone, M, S Cecconi, G Rossi, N Battista, R Pauselli, and A Finazzi-Agro** 2003 Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology* **144** 20-28.
- Maccarrone, M, H Valensise, M Bari, N Lazzarin, C Romanini, and A Finazzi-Agrò** 2000 Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage. *The Lancet* **355** 1326-1329.
- Maillo, V, R Lopera-Vasquez, M Hamdi, A Gutierrez-Adan, P Lonergan, and D Rizos** 2016 Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*.
- Makriyannis, A, X Tian, and J Guo** 2005 How lipophilic cannabinergic ligands reach their receptor sites. *Prostaglandins & other lipid mediators* **77** 210-218.
- Manning, BD, and LC Cantley** 2007 AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129** 1261-1274.
- Martin-Coello, J, R Gonzalez, C Crespo, M Gomendio, and E Roldan** 2008 Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology* **70** 1004-1013.
- Marusich, JA, RM Craft, TW Lefever, and JL Wiley** 2015 The impact of gonadal hormones on cannabinoid dependence. *Experimental and clinical psychopharmacology* **23** 206.
- Marzo, VD, and LD Petrocellis** 2006 Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu. Rev. Med.* **57** 553-574.
- Matsuda, LA, SJ Lolait, MJ Brownstein, AC Young, and TI Bonner** 1990 Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346** 561-564.
- McGee, EA, and AJ Hsueh** 2000 Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles 1. *Endocrine reviews* **21** 200-214.
- McPartland, JM, I Matias, V Di Marzo, and M Glass** 2006 Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene* **370** 64-74.
- Mechoulam, R** 1986 The pharmacohistory of *Cannabis sativa*. *Cannabinoids as therapeutic agents*. ed Mechoulam R (CRC Press, Boca Raton).
- 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.
- Mechoulam, R, and Y Gaoni** 1965 A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* **86** 1646-1647.
- Mehlmann, LM** 2005 Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* **130** 791-799.

- Mehlmann, LM, RR Kalinowski, LF Ross, AF Parlow, EL Hewlett, and LA Jaffe** 2006 Meiotic resumption in response to luteinizing hormone is independent of a Gi family G protein or calcium in the mouse oocyte. *Dev Biol* **299** 345-355.
- Mehlmann, LM, Y Saeki, S Tanaka, TJ Brennan, AV Evsikov, FL Pendola, BB Knowles, JJ Eppig, and LA Jaffe** 2004 The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* **306** 1947-1950.
- Mehlmann, LM, M Terasaki, LA Jaffe, and D Kline** 1995 Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* **170** 607-615.
- Menezo, YJ, A Veiga, and JL Pouly** 2000 Assisted reproductive technology (ART) in humans: facts and uncertainties. *Theriogenology* **53** 599-610.
- Merton, J, A De Roos, E Mullaart, L De Ruigh, L Kaal, P Vos, and S Dieleman** 2003 Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* **59** 651-674.
- Mikuriya, TH** 1969 Marijuana in medicine: past, present and future. *California medicine* **110** 34.
- Molina-Holgado, E, JM Vela, A Arévalo-Martín, G Almazán, F Molina-Holgado, J Borrell, and C Guaza** 2002 Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *The Journal of neuroscience* **22** 9742-9753.
- Molina-Holgado, F, E Pinteaux, L Heenan, JD Moore, NJ Rothwell, and RM Gibson** 2005 Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience* **28** 189-194.
- Moos, J, GS Kopf, and RM Schultz** 1996 Cycloheximide-induced activation of mouse eggs: effects on cdc2/cyclin B and MAP kinase activities. *J Cell Sci* **109 (Pt 4)** 739-748.
- Moreau, JJ** 1845 Du hachisch et de l'aliénation mentale: études psychologiques: Librairie de Fortin, Masson et C.
- Morgan, DJ, CH Muller, NA Murataeva, BJ Davis, and K Mackie** 2012 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) attenuates mouse sperm motility and male fecundity. *Br J Pharmacol* **165** 2575-2583.
- Mortimer, ST** 1997 A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* **3** 403-439.
- Moussa, M, J Shu, XH Zhang, and F Zeng** 2015 Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". *Anim Reprod Sci* **155** 11-27.
- Munro, S, KL Thomas, and M Abu-Shaar** 1993 Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365** 61-65.
- Muro, Y, H Hasuwa, A Isotani, H Miyata, K Yamagata, M Ikawa, R Yanagimachi, and M Okabe** 2016 Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of fertilization. *Biol Reprod* **115**.135368.
- Murray, RM, PD Morrison, C Henquet, and M Di Forti** 2007 Cannabis, the mind and society: the hash realities. *Nature Reviews Neuroscience* **8** 885-895.
- Murray, SC, and TT Smith** 1997 Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil Steril* **68** 351-357.
- Nader, S** 2010 Infertility and pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Minerva Endocrinol* **35** 211-225.
- Nahas, GG, HC Frick, JK Lattimer, C Latour, and D Harvey** 2002 Pharmacokinetics of THC in brain and testis, male gametotoxicity and premature apoptosis of spermatozoa. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* **17** 103-113.
- Niakan, KK, J Han, RA Pedersen, C Simon, and RAR Pera** 2012 Human pre-implantation embryo development. *Development* **139** 829-841.
- Nicolaidis, K, A Syngelaki, L Poon, M Gil, and D Wright** 2014 First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Fetal diagnosis and therapy* **35** 185-192.

- Nikseresht, M, MA Toori, T Rasti, IR Kashani, and R Mahmoudi** 2015 The Nuclear Maturation and Embryo Development of Mice Germinal Vesicle Oocytes with and without Cumulus Cell after Vitrification. *J Clin Diagn Res* **9** AF01-04.
- Nilsson, E, and MK Skinner** 2001 Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **8** S17-S20.
- Norwitz, ER, DJ Schust, and SJ Fisher** 2001 Implantation and the survival of early pregnancy. *New England Journal of Medicine* **345** 1400-1408.
- O'Shaughnessy, WB** 1843 On the preparations of the Indian Hemp, or Gunjah: Cannabis Indica their effects on the animal system in health, and their utility in the treatment of tetanus and other convulsive diseases. *Provincial Medical Journal and Retrospect of the Medical Sciences* **5** 363.
- Okumura, E, T Fukuhara, H Yoshida, S Hanada Si, R Kozutsumi, M Mori, K Tachibana, and T Kishimoto** 2002 Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol* **4** 111-116.
- Ombelet, W, I Cooke, S Dyer, G Serour, and P Devroey** 2008 Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update* **14** 605-621.
- Onaivi, ES, F Barth, G Le Fur, B Calandra, M Rinaldi-Carmona, P Casellas, P Gouldson, M Bouaboula, M Portier, and P Ferrara** 2002 The cannabinoid receptors and their interactions with synthetic cannabinoid agonists and antagonists, *The Biology of Marijuana: From Gene to Behavior*. CRC Press.
- Oró, DPM** 2015 Clubs sociales de cannabis: normalización, neoliberalismo, oportunidades políticas y prohibicionismo.
- Osei-Hyiaman, D, M DePettrillo, P Pacher, J Liu, S Radaeva, S Bátakai, J Harvey-White, K Mackie, L Offertáler, and L Wang** 2005 Endocannabinoid activation at hepatic CB 1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation* **115** 1298-1305.
- Ozaita, A, E Puighermanal, and R Maldonado** 2007 Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *Journal of neurochemistry* **102** 1105-1114.
- Pacher, P, S Bátakai, and G Kunos** 2006 The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* **58** 389-462.
- Paria, B, Y Huet-Hudson, and S Dey** 1993 Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90** 10159-10162.
- Paria, B, W Ma, D Andrenyak, P Schmid, H Schmid, DE Moody, H Deng, A Makriyannis, and S Dey** 1998 Effects of cannabinoids on preimplantation mouse embryo development and implantation are mediated by brain-type cannabinoid receptors. *Biol Reprod* **58** 1490-1495.
- Paria, B, X Zhao, J Wang, S Das, and S Dey** 1999 Fatty-acid amide hydrolase is expressed in the mouse uterus and embryo during the periimplantation period. *Biol Reprod* **60** 1151-1157.
- Paria, BC, SK Das, and SK Dey** 1995 The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 9460-9464.
- Paria, BC, H Song, X Wang, PC Schmid, RJ Krebsbach, HH Schmid, TI Bonner, A Zimmer, and SK Dey** 2001 Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation. *J Biol Chem* **276** 20523-20528.
- Park, J-Y, Y-Q Su, M Ariga, E Law, S-LC Jin, and M Conti** 2004 EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* **303** 682-684.
- Parker, LL, S Atherton-Fessler, MS Lee, S Ogg, JL Falk, K Swenson, and H Piwnica-Worms** 1991 Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner. *The EMBO Journal* **10** 1255.
- Parrish, JJ** 2014 Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* **81** 67-73.
- Patra, P, and R Wadsworth** 1991 Quantitative evaluation of spermatogenesis in mice following chronic exposure to cannabinoids. *Andrologia* **23** 151-156.

- Payne, C, and G Schatten** 2003 Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. *Dev Biol* **264** 50-63.
- Peralta, L, E Agirregoitia, R Mendoza, A Exposito, L Casis, R Matorras, and N Agirregoitia** 2011 Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes. *Reprod Biomed Online* **23** 372-379.
- Pertwee, R** 2008 The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* **153** 199-215.
- Pertwee, R, A Howlett, ME Abood, S Alexander, V Di Marzo, M Elphick, P Greasley, HS Hansen, G Kunos, and K Mackie** 2010 International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacological reviews* **62** 588-631.
- Pertwee, RG** 1997 Pharmacology of cannabinoid CB 1 and CB 2 receptors. *Pharmacology & therapeutics* **74** 129-180.
- Pertwee, RG** 2005 Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology.: Springer Berlin Heidelberg.
- Pertwee, RG** 2006 The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)* **30 Suppl 1** S13-18.
- Pertwee, RG, RA Ross, SJ Craib, and A Thomas** 2002 (-)-Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse vas deferens. *European journal of pharmacology* **456** 99-106.
- Phillips, KP, MA Petrunewich, JL Collins, RA Booth, XJ Liu, and JM Baltz** 2002 Inhibition of MEK or cdc2 kinase parthenogenetically activates mouse eggs and yields the same phenotypes as Mos(-/-) parthenogenotes. *Dev Biol* **247** 210-223.
- Picton, H, D Briggs, and R Gosden** 1998 The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* **145** 27-37.
- Pincus, G, and EV Enzmann** 1934 Can Mammalian Eggs Undergo Normal Development in Vitro? *Proc Natl Acad Sci U S A* **20** 121-122.
- Piotrowska, K, and M Zernicka-Goetz** 2001 Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* **409** 517-521.
- Prates, E, J Nunes, and R Pereira** 2014 A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: impact of lipid modulators to improve embryo production. *Mediators of inflammation* **2014**.
- Procházka, R, E Nagyov, G Brem, K Schellander, and J Motlik** 1998 Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. *Mol Reprod Dev* **49** 141-149.
- Quinn, P, JF Kerin, and GM Warnes** 1985 Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* **44** 493-498.
- Rahman, A, R Abdullah, and W Wan-Khadajah** 2008 Gametogenesis, fertilization and early embryogenesis in mammals with special reference to goat: A review. *J. Biol. Sci* **8** 1115-1128.
- Rapino, C, N Battista, M Bari, and M Maccarrone** 2014 Endocannabinoids as biomarkers of human reproduction. *Hum Reprod Update* **20** 501-516.
- Rawitch, AB, R Rohrer, and RM Vardaris** 1979 delta-9-Tetrahydrocannabinol uptake by adipose tissue: preferential accumulation in gonadal fat organs. *General Pharmacology: The Vascular System* **10** 525-529.
- Reddy, P, L Shen, C Ren, K Boman, E Lundin, U Ottander, P Lindgren, Y-x Liu, Q-y Sun, and K Liu** 2005 Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev Biol* **281** 160-170.
- Reynolds, LP, AT Grazul-Bilska, and DA Redmer** 2002 Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *International journal of experimental pathology* **83** 151-164.
- Ricci, G, G Cacciola, L Altucci, R Meccariello, R Pierantoni, S Fasano, and G Cobellis** 2007 Endocannabinoid control of sperm motility: the role of epididymus. *General and comparative endocrinology* **153** 320-322.

- Richard, FJ, A Tsafirri, and M Conti** 2001 Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biol Reprod* **65** 1444-1451.
- Riley, JK, MO Carayannopoulos, AH Wyman, M Chi, CK Ratajczak, and KH Moley** 2005 The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* **284** 377-386.
- Rinaldi-Carmona, M, F Barth, M Héaulme, D Shire, B Calandra, C Congy, S Martinez, J Maruani, G Néliat, and D Caput** 1994 SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS letters* **350** 240-244.
- Rinaldi-Carmona, M, F Barth, J Millan, J-M Derocq, P Casellas, C Congy, D Oustric, M Sarran, M Bouaboula, and B Calandra** 1998 SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **284** 644-650.
- Rizos, D, P Lonergan, MP Boland, R Arroyo-Garcia, B Pintado, J de la Fuente, and A Gutierrez-Adan** 2002 Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* **66** 589-595.
- Rodriguez, KF, and CE Farin** 2003 Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction, Fertility and Development* **16** 55-67.
- Room, R** 2014 Legalizing a market for cannabis for pleasure: Colorado, Washington, Uruguay and beyond. *Addiction* **109** 345-351.
- Rosenkrans, C, and N First** 1994 Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *Journal of animal science* **72** 434-437.
- Ross, RA** 2009 The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci* **30** 156-163.
- Rossato, M, F Ion Popa, M Ferigo, G Clari, and C Foresta** 2005 Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90** 984-991.
- Roux, PP, and J Blenis** 2004 ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews* **68** 320-344.
- Rueda, D, I Galve-Roperh, A Haro, and M Guzmán** 2000 The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* **58** 814-820.
- Sagata, N** 1998. Introduction: meiotic maturation and arrest in animal oocytes. pp. 535-537: Elsevier.
- Salustri, A, M Yanagishita, and VC Hascall** 1990 Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev Biol* **138** 26-32.
- Sánchez, C, I Galve-Roperh, C Canova, P Brachet, and M Guzmán** 1998 Δ 9-Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS letters* **436** 6-10.
- Sanchez, F, and J Smitz** 2012 Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1822** 1896-1912.
- Sánchez, G, L Ruiz-Llorente, and AM Sánchez** 2003 Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB 1 and CB 2 cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cellular signalling* **15** 851-859.
- Santos, F, and W Dean** 2004 Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* **127** 643-651.
- Sasseville, M, LJ Ritter, TM Nguyen, F Liu, DG Mottershead, DL Russell, and RB Gilchrist** 2010 Growth differentiation factor 9 signaling requires ERK1/2 activity in mouse granulosa and cumulus cells. *J Cell Sci* **123** 3166-3176.
- Sathananthan, AH, K Selvaraj, ML Girijashankar, V Ganesh, P Selvaraj, and AO Trounson** 2006 From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy research and technique* **69** 396-407.
- Schatz, AR, M Lee, RB Condie, JT Pulaski, and NE Kaminski** 1997 Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicology and applied pharmacology* **142** 278-287.
- Schier, AF** 2007 The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* **316** 406-407.
- Schindler, K** 2011 Protein kinases and protein phosphatases that regulate meiotic maturation in mouse oocytes. *Results Probl Cell Differ* **53** 309-341.

- Schmid, PC, B Paria, RJ Krebsbach, HH Schmid, and S Dey 1997 Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94** 4188-4192.
- Schmitt, A, and AR Nebreda 2002 Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J Cell Sci* **115** 2457-2459.
- Schuel, H 2006 Tuning the oviduct to the anandamide tone. *The Journal of clinical investigation* **116** 2087-2090.
- Schuel, H, LJ Burkman, J Lippes, K Crickard, E Forester, D Piomelli, and A Giuffrida 2002a N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem Phys Lipids* **121** 211-227.
- Schuel, H, LJ Burkman, J Lippes, K Crickard, MC Mahony, A Giuffrida, RP Picone, and A Makriyannis 2002b Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol Reprod Dev* **63** 376-387.
- Schultz, RM 2002 The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* **8** 323-331.
- Seeger, R, T Hanoach, R Rosenberg, A Dantes, WE Merz, JF Strauss, and A Amsterdam 2001 The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **276** 13957-13964.
- Sela-Abramovich, S, E Chorev, D Galiani, and N Dekel 2005 Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology* **146** 1236-1244.
- Shang, P, WM Baarends, J Hoogerbrugge, MP Ooms, WA van Cappellen, AA de Jong, GR Dohle, H van Eenennaam, JA Gossen, and JA Grootegoed 2010 Functional transformation of the chromatoid body in mouse spermatids requires testis-specific serine/threonine kinases. *J Cell Sci* **123** 331-339.
- Sharma, R, A Harlev, A Agarwal, and SC Esteves 2016 Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *European urology*.
- Shilling, F, K Chiba, M Hoshi, T Kishimoto, and LA Jaffe 1989 Pertussis toxin inhibits 1-methyladenine-induced maturation in starfish oocytes. *Dev Biol* **133** 605-608.
- Shire, D, B Calandra, M Rinaldi-Carmona, D Oustric, B Pessègue, O Bonnin-Cabanne, G Le Fur, D Caput, and P Ferrara 1996 Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* **1307** 132-136.
- Shitsukawa, K, C Andersen, F Richard, A Horner, A Wiersma, M Van Duin, and M Conti 2001 Cloning and characterization of the cyclic guanosine monophosphate-inhibited phosphodiesterase PDE3A expressed in mouse oocyte. *Biol Reprod* **65** 188-196.
- Sim-Selley, LJ 2003 Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Critical Reviews™ in Neurobiology* **15**.
- Simonds, WF 1999 G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* **20** 66-73.
- Sirard, M-A, F Richard, and M Mayes 1998 Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* **49** 483-497.
- Sirard, M, J Parrish, C Ware, M Leibfried-Rutledge, and N First 1988 The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod* **39** 546-552.
- Sirard, MA, F Richard, P Blondin, and C Robert 2006 Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **65** 126-136.
- Skaper, S, A Buriani, R Dal Toso, L Petrelli, S Romanello, L Facci, and A Leon 1996 The ALIamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93** 3984-3989.
- Smith, GD 2001 In vitro maturation of oocytes. *Current women's health reports* **1** 143-151.
- Smith, TT 1998 The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol Reprod* **58** 1102-1104.

- 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.
- Stojkovic, M, SA Machado, P Stojkovic, V Zakhartchenko, P Hutzler, PB Gonçalves, and E Wolf** 2001 Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* **64** 904-909.
- Su, Y-Q, JM Denegre, K Wigglesworth, FL Pendola, MJ O'Brien, and JJ Eppig** 2003a Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte–cumulus cell complex. *Dev Biol* **263** 126-138.
- Su, Y-Q, K Sugiura, Q Li, K Wigglesworth, MM Matzuk, and JJ Eppig** 2010 Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the cumulus-oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signaling. *Mol Endocrinol* **24** 1230-1239.
- Su, Y-Q, K Sugiura, Y Woo, K Wigglesworth, S Kamdar, J Affourtit, and JJ Eppig** 2007 Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* **302** 104-117.
- Su, YQ, JM Denegre, K Wigglesworth, FL Pendola, MJ O'Brien, and JJ Eppig** 2003b Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Dev Biol* **263** 126-138.
- Sugiura, T, S Kondo, A Sukagawa, T Tonegawa, S Nakane, A Yamashita, and K Waku** 1996 Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca²⁺-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochemical and biophysical research communications* **218** 113-117.
- Sun, Q-Y, and T Nagai** 2003 Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development* **49** 347-359.
- Sun, X, and SK Dey** 2008 Aspects of endocannabinoid signaling in periimplantation biology. *Mol Cell Endocrinol* **286** S3-S11.
- Sun, X, H Wang, M Okabe, K Mackie, PJ Kingsley, LJ Marnett, BF Cravatt, and SK Dey** 2009 Genetic loss of Faah compromises male fertility in mice. *Biol Reprod* **80** 235-242.
- Suzuki, F** 1990. Morphological aspects of sperm maturation: modification of the sperm plasma membrane during epididymal transport. pp. 65-76.
- Szabo, B, and E Schlicker** 2005 Effects of cannabinoids on neurotransmission, Cannabinoids, pp. 327-365. Springer.
- Talevi, R, V Barbato, S De Iorio, V Mollo, T Capriglione, L Ricchiari, A Samo, and R Gualtieri** 2010 Is there a role for endocannabinoids in sperm–oviduct interaction? *Reproduction* **140** 247-257.
- Tamassia, M, F Nuttinck, P May-Panloup, P Reynier, Y Heyman, G Charpigny, M Stojkovic, S Hiendleder, J-P Renard, and S Chastant-Maillard** 2004 In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol Reprod* **71** 697-704.
- Tarazona, A, J Rodriguez, L Restrepo, and M Olivera-Angel** 2006 Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* **41** 5-11.
- Teilmann, SC** 2005 Differential expression and localisation of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. *Mol Cell Endocrinol* **234** 27-35.
- Telford, NA, AJ Watson, and GA Schultz** 1990 Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* **26** 90-100.
- Terasaki, M, LL Runft, and AR Hand** 2001 Changes in organization of the endoplasmic reticulum during xenopus oocyte maturation and activation. *Molecular Biology of the Cell* **12** 1103-1116.
- Tesfaye, D, P Lonergan, M Hoelker, F Rings, K Nganvongpanit, V Havlicek, U Besenfelder, D Jennen, E Tholen, and K Schellander** 2007 Suppression of connexin 43 and E-cadherin transcripts in in vitro derived bovine embryos following culture in vitro or in vivo in the homologous bovine oviduct. *Mol Reprod Dev* **74** 978-988.

- Themmen, AP, and IT Huhtaniemi** 2000 Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine reviews* **21** 551-583.
- Thompson, JG** 1996 Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* **45** 27-40.
- Tomek, W, and T Smiljakovic** 2005 Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction* **130** 423-430.
- Töpfer-Petersen, E, AM Petrounina, and M Ekhlesi-Hundrieser** 2000 Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* **60** 653-662.
- Touw, M** 1981 The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *Journal of Psychoactive Drugs* **13** 23-34.
- Trounson, A, C Anderiesz, and G Jones** 2001 Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* **121** 51-75.
- Turco, M, K Matsukawa, M Czernik, V Gasperi, N Battista, L Della Salda, P Scapolo, P Loi, M Maccarrone, and G Ptak** 2008 High levels of anandamide, an endogenous cannabinoid, block the growth of sheep preimplantation embryos by inducing apoptosis and reversible arrest of cell proliferation. *Hum Reprod* **23** 2331-2338.
- Van Hoeck, V, RG Sturmeijer, P Bermejo-Alvarez, D Rizos, A Gutierrez-Adan, HJ Leese, PE Bols, and JL Leroy** 2011 Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PLoS One* **6** e23183.
- Vanderhyden, BC, and EA Macdonald** 1998 Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. *Biol Reprod* **59** 1296-1301.
- Vanhaesebroeck, B, J Guillermet-Guibert, M Graupera, and B Bilanges** 2010 The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11** 329-341.
- Vasan, S** 2011 Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India* **27** 41.
- Veitch, GI, JE Gittens, Q Shao, DW Laird, and GM Kidder** 2004 Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface. *J Cell Sci* **117** 2699-2707.
- Verlhac, MH, JZ Kubiak, HJ Clarke, and B Maro** 1994 Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* **120** 1017-1025.
- Wakai, T, N Zhang, P Vangheluwe, and RA Fissore** 2013 Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ oscillations in mammalian eggs. *J Cell Sci* **126** 5714-5724.
- Wang, D, H Wang, W Ning, MG Backlund, SK Dey, and RN DuBois** 2008 Loss of cannabinoid receptor 1 accelerates intestinal tumor growth. *Cancer Res* **68** 6468-6476.
- Wang, H, Y Guo, D Wang, PJ Kingsley, LJ Marnett, SK Das, RN DuBois, and SK Dey** 2004 Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nat Med* **10** 1074-1080.
- Wang, H, H Matsumoto, Y Guo, BC Paria, RL Roberts, and SK Dey** 2003 Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide directs blastocyst activation for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** 14914-14919.
- Wang, H, H Xie, and SK Dey** 2006a Endocannabinoid signaling directs periimplantation events. *The AAPS journal* **8** E425-E432.
- Wang, H, H Xie, Y Guo, H Zhang, T Takahashi, PJ Kingsley, LJ Marnett, SK Das, BF Cravatt, and SK Dey** 2006b Fatty acid amide hydrolase deficiency limits early pregnancy events. *The Journal of clinical investigation* **116** 2122-2131.
- Wang, H, H Xie, X Sun, PJ Kingsley, LJ Marnett, BF Cravatt, and SK Dey** 2007 Differential regulation of endocannabinoid synthesis and degradation in the uterus during embryo implantation. *Prostaglandins & other lipid mediators* **83** 62-74.
- Wang, J, BC Paria, SK Dey, and DR Armant** 1999 Stage-specific excitation of cannabinoid receptor exhibits differential effects on mouse embryonic development. *Biol Reprod* **60** 839-844.

- Wang, S, Z Kou, Z Jing, Y Zhang, X Guo, M Dong, I Wilmut, and S Gao** 2010 Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** 17639-17644.
- Wayne, CM, HY Fan, X Cheng, and JS Richards** 2007 Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol* **21** 1940-1957.
- Webb, RJ, F Marshall, K Swann, and J Carroll** 2002 Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol* **246** 441-454.
- Whan, LB, MC West, N McClure, and SE Lewis** 2006 Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. *Fertil Steril* **85** 653-660.
- Wilding, M, B Dale, M Marino, L di Matteo, C Alviggi, ML Pisaturo, L Lombardi, and G De Placido** 2001 Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* **16** 909-917.
- Willinsky, MD, H Kalant, O Meresz, L Endrenyi, and N Woo** 1974 Distribution and metabolism in vivo of 14C-tetrahydrocannabinol in the rat. *European journal of pharmacology* **27** 106-119.
- Wolf, DE, AC Lipscomb, and VM Maynard** 1988 Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry* **27** 860-865.
- Wright, RW, and KR Bondioli** 1981 Aspects of Fertilization and Embryo Culture in Domestic Animals. *Journal of animal science* **53** 702-729.
- Yamashita, Y, M Hishinuma, and M Shimada** 2009 Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. *Journal of ovarian research* **2** 1.
- Yanagimachi, R** 1994 Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* **2** 371-372.
- Yang, Z-M, B Paria, and S Dey** 1996 Activation of brain-type cannabinoid receptors interferes with preimplantation mouse embryo development. *Biol Reprod* **55** 756-761.
- Zernicka-Goetz, M, SA Morris, and AW Bruce** 2009 Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nature Reviews Genetics* **10** 467-477.
- Zhang, W, and HT Liu** 2002 MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research* **12** 9-18.
- Zheng, W, G Nagaraju, Z Liu, and K Liu** 2012 Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Mol Cell Endocrinol* **356** 24-30.

Curriculum vitae

Ángela Patricia López Cardona

E-mail	angeladir7@gmail.com
Nacionalidad	Colombiana
Researchgate	https://www.researchgate.net/profile/Angela_Lopez-Cardona
Linkedin	https://es.linkedin.com/in/angela-patricia-lópez-cardona-b2a45a64

Educación

- Estudiante Predoctoral “Investigación en Ciencias Veterinarias”, Universidad Complutense de Madrid. Madrid-España. 2013
- Máster Oficial Universitario en “Investigación en Ciencias Veterinarias”, Universidad Complutense de Madrid. Madrid-España. 2012
- Licenciatura en Zootecnista Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Antioquia. Medellín Colombia 2009.
- Idiomas: Español (lengua maternal), Inglés (medio).

Experiencia Laboral

- 2012-Actual **Departamento de Reproducción Animal, INIA**, Madrid (España).
Ayudante de actividades Técnicas y Profesionales preparación de medios de cultivo, producción de embriones en el modelo bovino y murino, fecundación *in vitro*, técnicas de micromanipulación, extracción de DNA, RNA y análisis molecular.
- Julio 2009- Octubre 2011 **Grupo de Investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia**. Investigadora Asociada (Colombia)
Actividades Técnicas y Profesionales preparación de medios de cultivo, producción de embriones bovinos fecundación *in vitro* y análisis seminal.
- Enero 2009 a septiembre 2009 **Empresa Comercial Genética Ganadera**, Medellín-Bajo Cauca (Colombia)
Técnico en laboratorio en búsqueda y clasificación de embriones bovinos para transferencia *in vivo*, congelación de embriones, programas de reproducción asistida en bovinos
- Junio 2005- Abril 2007 **Grupo de Investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia**. Joven investigadora (Colombia)

Asistencia a Cursos y Seminarios

- **Introducción a la microscopía confocal.** Universidad del país Vasco. Leioa 13 y 14 de febrero de 2014. (10hr)
- **I Curso Epigenetics in Reproductive Biology** Vicerrectorado de Desarrollo Estratégico y Formación, Universidad de Murcia , España. 3 al 11 de Junio de 2013 (36hr).
- **XXXIV Curso Internacional de Reproducción Animal.** INIA, Madrid, España. Noviembre 2011.
- **Seminario regional sobre conservación de recursos genéticos animales,** Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MEGAP), La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) Guayaquil Ecuador 2010.
- **1º Curso de Colecta Congelación y Transferencia de Embriones Bovinos,** PROGEX - GENÉTICA GANDERA G&G S.A, Colombia 2009
- **Seminario Producción Reproducción y Biotecnologías Asociadas Universidad de Antioquia.** Medellín, Colombia. 23 y 24 Marzo 2007
- **Seminario Biotecnología Politécnico Jaime Isaza Cadavid.** Medellín, Colombia 2004

Asistencia a Congresos

- **16ª Reunión Anual de la Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides** Granada Spain 22 y 23 de septiembre de 2015
- **7th European Workshop on Cannabinoid Research and IACM 8th Conference on cannabinoids in Medicine** 17-19 de September 2015 en Sestri Levante, Italia.
- **15ª Reunión Anual de la Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides** Cuenca Spain 27 y 29 de noviembre de 2014
- **12º Congreso de la Asociación Española de Reproducción Animal.** Alicante España 16-18 de octubre 2014.
- **Epigenetics and Periconception Environment** 01-03 2014, Vilamoura, Portugal
- **Workshop 2014 Epigenomic Toolbox: from Methods to Models.** Las Palmas Spain., 07-09 May 2014.
- **1st Cost-Action FA1201 EPICONCEPT, General Conference “Epigenetics and Periconception environment”.** Antalya, Turquía. 24-25 Abril 2013.
- **VI Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias y el II Seminario Internacional de Salud Animal** la Habana, Cuba. 10 al 13 Abril 2007

- **VIII ENCUESTO NACIONAL Y 1 INTERNACIONAL DE. INVESTIGADORES DE LAS CIENCIAS PECUARIAS (ENICIP).** Medellín Colombia. 10-11 y 12 Noviembre 2005.

Premios

- Beca predoctoral Francisco José de Caldas de Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS, desde Octubre de 2011 a Julio de 2016.(Colombia)
- Beca Programa Jóvenes Investigadores “Virginia Gutiérrez de Pineda” COLCIENCIAS. de Marzo de 2010 a Marzo de 2011. (Colombia)
- Ganadores concurso “Bienestar Animal en animales de producción” Organizado por la WSPA Universidad de Oxford en Londres y Acoovez, , Abril 2009 Londres (Reino Unido)

Publicaciones en Revistas

2016

- **Angela Patricia López-Cardona**, Serafín Pérez-Cerezales, Raúl Fernández-González, Ricardo Laguna-Barraza, Eva Pericuesta, Naiara Agirregoitia, Alfonso Gutierrez-Adan and Ekaitz Agirregoitia. The CB1 cannabinoid receptor drives oocyte maturation and embryo development via PI3K/Akt and MAPK pathways. *Scientific Reports* (Submitted February 2015).
- **López-Cardona A. P.**, Sánchez-Calabuig M. J., Beltran-Breña P., Agirregoitia N., Rizos D., Agirregoitia E., and Alfonso Gutiérrez-Adán. Exocannabinoid's effect on in vitro bovine oocyte maturation via activation of AKT and ERK1/2. *Reproduction* (Accepted May 2015).

2015

- Serafín Pérez-Cerezales, Priscila Ramos-Ibeas, **Lopez-Cardona AP**, Eva Pericuesta, Raúl Fernandez Gonzalez, Belen Pintado and Alfonso Gutiérrez-Adán. Selective elimination of methylation marks in H3K4 and H3K9 of the spermatozoa alter the phenotype of the offspring. *Reprod Fertil Dev.* 2015 Dec 18.
- Pérez-Cerezales S, **López-Cardona, AP**, Gutiérrez-Adán A. Mouse sperm kinetics in response to progesterone under viscous conditions. *Reproduction.* 2016 May;151(5):501-7.
- C. de Frutos, **A.P. López-Cardona**, N. Fonseca Balvís, R. Laguna-Barraza, D. Rizos, A. Gutierrez-Adán and P Bermejo-Álvarez. Spermatozoa telomeres determine telomere length in early embryos and offspring. *Reproduction.* 2016 Jan;151(1):1-7.
- **López-Cardona, A. P.**, Fernández-González, R., Pérez-Crespo, M., Alén, F., de Fonseca, F. R., Orio, L., & Gutiérrez-Adán, A. (2015). Effects of Synchronous and Asynchronous Embryo Transfer on Postnatal Development, Adult Health, and Behavior in Mice. *Biology of reproduction, biolreprod-115.*

2014

- Sanchez Calabuig, M. J., **Lopez-Cardona, A. P.**, Serres-Dalmau, C., Perez-Gutierrez, J. F., Fernandez-Gonzalez, R., & Gutierrez-Adan, A. (2014, October). Equine Piezo-assisted intracytoplasmic sperm injection. In *Reproduction in Domestic Animals* Vol. 49, pp. 99-99
- Sánchez-Calabuig MJ, **López-Cardona AP**, Fernández-González R, Ramos-Ibeas P, Fonseca Balvís N, Laguna-Barraza R, Pericuesta E, Gutiérrez-Adán A, Bermejo-Álvarez P. Potential Health Risks Associated to ICSI: Insights from Animal Models and Strategies for a Safe Procedure. *Front Public Health*. 2014; 2: 241. Published online Nov 17, 2014. doi: 10.3389/fpubh.2014.00241
- Antonia Serrano, Juan M.Decara, Raul Fernandez-Gonzalez, **Angela P. Lopez-Cardona**, Francisco Javier Pavon, Laura Orio, Francisco Alen, Alfonso Gutierrez-Adan, and Fernando Rodriguez de Fonseca. Hyperplastic Obesity and Liver Steatosis as Long-Term Consequences of Suboptimal In Vitro Culture of Mouse Embryos. *Biology Reproduction* /2014/117879 (aceptado)
- Alberto Miranda, **Angela P López-Cardona**, Ricardo Laguna-Barraza, Alexandra Calle, Irene López-Vidriero, Belén Pintado and Alfonso Gutiérrez-Adán. Transcriptome profiling of liver of non-genetic low birth weight and long term health consequences. *BMC Genomics* 2014, 15:327.
- Valckx SDM, Van Hoeck V, Arias-Alvarez M, Maillo V, **Lopez-Cardona AP**, Gutierrez-Adan A, Berth Mc, Cortvrindt Rd, Bols PEJ, Leroy JLMR. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during in vitro murine follicle growth alter follicular physiology and reduce oocyte developmental competence. *Fertility Sterily*. 2014 Sep 23. pii: S0015-0282(14)02077-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.08.018.

2013

- NA Gómez, **AP López**, LF Ortiza, ZT Ruiza, M Olivera, A Tarazona. Effect of conjugated linoleic acid on sex ratio and quality of in vitro produced bovine embryos. *Arch Med Vet* 45, 17-24 (2013).

2012

- R. Laguna-Barraza A, P. Bermejo-Álvarez B C, P. Ramos-Ibeas A, C. de Frutos A, **A. P. López-Cardona A**, A. Calle A, R. Fernandez-Gonzalez A, E. Pericuesta A, M. A. Ramírez A and A. Gutierrez-Adan A D. Sex-specific embryonic origin of postnatal phenotypic variability. *Reproduction, Fertility and Development* 25(1) 38-47

2010

- Ariel Tarazona, **Angela López**, Martha Olivera-Angel (2010) “La competencia del oocito: qué, cómo y cuándo. *Acta Biologica Universidad Nacional*. V15n3 del 31 de Dic del 2010.

2007

- **López C Angela**, Olivera A Martha, Ruiz C Tatiana, Tarazona M Ariel. (2007). Efecto del cocultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista Mvz Córdoba v.12 fasc.2 p.1061 – 1067.*
- **López AP**, Gómez LF, Ruiz Cortés ZT, Olivera M, Giraldo CA (2007). Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino. Argentina Buenos Aires *Revista Analecta Veterinaria ed: v.28 fasc.1 p.42 – 47.*

Otras Publicaciones

- **Angela López**, Catalina Arias, Juan C Duque, Carolina Mesa, James Betancur, Tatiana Mira, Rodrigo Urrego, Camilo Rodríguez, Carlos A Giraldo y Jorge Ossa (2006), "Biotecnologías: historia pasada, situación presente y perspectivas futuras" En: Colombia.. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias fasc. 3. v.19.* Idioma original Inglés.:Idioma traducción: Español Autor: Nombre original: Joseph H Hulse.

Capítulos de libro

- El coste de la inmortalidad alteraciones genéticas y epigénicas de las ESCs e iPSCs. P Ramos-Ibeas, E Pericuesta, **López-Cardona AP**, Laguna-Barraza R, N. Fonseca Balvís, Fernández-González R y Gutiérrez-Adán A. *Animales de Laboratorio.* 2014; 61: 44-48
- Medios y reactivos para cultivo y evaluación celular de tejidos reproductivos y embriones in vitro. Natalia Andrea Gómez Morales · **Ángela Patricia López Cardona** · Luisa Fernanda Ortiz Román · Juliana Victoria Bedoya Jaramillo · Felipe Penagos Tabares. Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos: Libro de procedimientos. Fondo Editorial Biogénesis.
- Procedimientos para la evaluación de semen utilizado en la producción de embriones bovinos. Andrey Cadavid-Betancur · Ariel Marcel Tarazona Morales · Martha Olivera Angel · **Angela Patricia López Cardona.** Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos: Libro de procedimientos. Fondo Editorial Biogénesis.
- Cultivo de células del tracto reproductivo de la hembra bovina. Yasser Lenis · **Ángela Patricia López Cardona** · Ariel Marcel Tarazona Morales · Carlos Andrés Giraldo Echeverri · Carolina Mesa Pineda · Martha Olivera Ángel. Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos: Libro de procedimientos. Fondo Editorial Biogénesis.

Comunicaciones Orales en Conferencias Científicas

- **A.P. Lopez-Cardona** , N. Agirregoitia A. Gutierrez-Adán, E. Agirregoitia. Involvement of cannabinoids during oocyte maturation in bovine model: importance on fertilization and embryo

development. 16^a Reunión Anual de la Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides Granada Spain 22 y 24 de septiembre de 2015.

- **A.P. Lopez-Cardona**, N. Agirregoitia A. Gutierrez-Adán, E. Agirregoitia. seic Cannabinoid system during oocyte in vivo and in vitro maturation: importance on fertilization and embryo development in mouse. 15^a Reunión Anual de la Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides Cuenca Spain 27 y 29 de noviembre de 2014
- **López A**, A. Tarazona, M Olivera-Angel. (2005) Efecto del cocultivo de células oviductales sobre el clivaje de embriones bovinos producidos in vitro. *VIII ENCUENTRO NACIONAL Y I INTERNACIONAL DE INVESTIGADORES DE LAS CIENCIAS PECUARIA (ENICIP)*. Medellín Colombia 10-11 y 12 Noviembre

Presentaciones de Posters en Conferencias Científicas

- **A.P. Lopez-Cardona**, N. Agirregoitia A. Gutierrez-Adán, E. Agirregoitia. Involvement of CB1 and CB2 during oocyte maturation in mouse model: importance on fertilization, embryo development and transport of embryo. *7 th European Workshop on Cannabinoid Research and LACM 8th Conference on cannabinoids in Medicine* 17-19 de September 2015 en Sestri Levante, Italia.
- **López-Cardona AP**, Ramos-Ibeas P, Pericuesta E, Calle A, and Gutiérrez-Adán. Altered mouse sperm histone methylation affect offspring development and health. *Epigenetics and Periconception Environment* 01-03 October 2014, Vilamoura, Portugal.
- **López-Cardona AP**, Fernández-González R, Laguna-Barraza R, P. Clemente-Abad and Gutiérrez-Adán A Effect of second cleavage speed of mice embryo on implantation potential.. *Workshop 2014 Epigenomic Toolbox: from Methods to Models. Las Palmas, 07-09 May 2014, Spain.*
- E. Agirregoitia, **AP López-Cardona**, N Agirregoitia and A Gutiérrez-Adán. Effect of cannabinoid during oocyte in vitro maturation on in vitro fertilization and embryo development in mouse. *14^a Reunión Anual Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides. Barcelona (España) 28-30 Noviembre 2013.*
- **López-Cardona AP**, Ramos-Ibeas P, de Frutos C, Pericuesta E, Calle A, Pintado B, Fernández-González R, Ramirez de Paz MA, Chitwood JL, Ross PJ, Gutierrez-Adan A. (2013). Zrsr1 splicing factor controls spermatogenesis. *Proceedings of the EPICONCEPT Workshop 2013 Epigenetics for Improved Food Production: from Model to Practice. "Epigenetics and Periconception Environment" 13-16 October.*
- **López-Cardona AP**, Fernández- González R., Ramos-Ibeas P, Alén F., Fonseca FR., Orio L. and Gutierrez-Adan A. (2013) Effect of embryo transfer on postnatal development and behavior of mouse embryos. *1st Cost-Action FA1201 EPICONCEPT, General Conference "Epigenetics and Periconception environment". Antalya, Turkey. 24-25 April 2013.*
- Calle. A. ; **López-Cardona AP**. ; Ramos.Ibeas P, Pericuesta, E.; Gutierrez-Adan. A. (2012). Oxidative process and sperm epigenome. *Fertility & Antioxidants Paris Francia 6 y 7 December.*

- Bedoya J.V, Cadavid D.A., Gómez N.A., **López A.P.**, Olivera M. Comparación de dos protocolos de vitrificación para embriones bovinos producidos in-vitro. *I Simposio Latinoamericano de Reproduccion Animal. 7 y 8 de Noviembre 2011 Chile.*
- **Angela Lopez**, Natalia Gomez, Ariel Tarazona, Zulma Tatiana Ruiz-Cortes, and Martha Olivera. Conjugated Linoleic Acid: Role on Morphological Quality of Embryo Bovine In Vitro. *44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, to be held 31 July–4 August 2011*
- Natalia Gomez, **Angela Lopez**, Ariel Tarazona, Zulma Tatiana Ruiz-Cortes, and Martha Olivera. Conjugated Linoleic Acid Effects on Sex Ratio of In Vitro-Produced Embryos. In Vitro. *44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, to be held 31 July–4 August 2011*
- **López A**, A. Tarazona, M Olivera-Angel 2007 Efecto del cocultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos in vitro. *VI Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias y el II Seminario Internacional de Salud Animal realizado del 10 al 13 de abril de 2007 en el Palacio de Convenciones de la Habana, Cuba.*
- **López A**, A. Tarazona , M Olivera-Angel (2005). Efecto del cocultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos in vitro” *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias modalidad Memorias VIII ENICIP Medellín Colombia Noviembre 2005.*

Otras actividades profesionales:

- Participante como docente Curso actualización en transferencia de embriones UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA. Medellín Colombia 22,23,24 de octubre y 4, 5,6 de Noviembre 2010
- Participante como docente Curso actualización de andrología UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA. Medellín Colombia Diciembre 6 al 10 de 2010
- Participante como docente con el seminario “MECANISMO DE IMPLANTACIÓN” Reproducción Animal INIA- Universidad Complutense de Madrid -UCM. 2013
- Participante como docente con el seminario “COMO EVALUAR LA CALIDAD DEL EMBRIÓN PARA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA”. Reproducción Animal INIA- Universidad Complutense de Madrid -UCM. 2014
- Participante como docente con el seminario “IMPORTANCIA DE LA CALIDAD DEL OVOCITO EN TECNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA” Reproducción Animal INIA- Universidad Complutense de Madrid -UCM. 2015