

Gradu Amaierako Lana

Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Opioide-hartzaileen deskribapena saguen gametoetan: morfinak obozitoen in vitro heltzean duen eragina

Egilea:

Ainhoa Lapitz Dambolenea

Zuzendaria:

Ekaitz Agirregoitia Marcos

cc by-nc-sa

Aurkibidea

SARRERA	1
HELBURUAK	3
MATERIAL ETA METODOAK	4
1) Animaliak	4
2) Sagu emeen super-obulazioa.....	4
3) Laginen lorpena.....	4
3.1) Sagu emeen obozitoen erauzketa.....	4
3.2) Sagu arren espermatozoideen erauzketa	4
4) mRNA-ren erauzketa.....	5
5) RT-PCR	5
6) Immunozitokimika	6
7) <i>In vitro</i> heltzea (IVM).....	6
8) <i>In vitro</i> ernalketa (IVF).....	7
9) Enbrioien kultiboa	7
10) Datuen analisisa.....	7
EMAITZAK	7
1) Opioide-hartzaileen mRNA-ren espresioa saguen espermatozoideetan eta obozitoetan.....	7
2) Opioide-hartzaileen kokapen zelularra saguen espermatozoideetan eta obozitoetan	8
3) Morfinaren eragina obozitoen <i>in vitro</i> heltzean eta pERKren dinamikan	9
4) Morfinaren eragina <i>in vitro</i> ernalkuntzan	10
EZTABAIDA	11
ONDORIOAK	14
BIBLIOGRAFIA	15

SARRERA

Gaur egun, ugarkotasun ezaren arazoa dela eta, geroz eta gehiago dira haurdunaldia lortzearen lagunduriko ugalketa tekniketara (ART, *assisted reproductive technology*) jo behar duten pertsonak; baina, oraindik, teknika horien arrakasta ez da oso handia eta batez beste, % 50eko arrakasta duela esan ohi da (SEF erregistroa 2013). ART guztien artean, obozitoen *in vitro* heltzea (IVM, *in vitro maturation*) oso teknika berria da baina duen arrakasta txikiagatik, gutxien erabiliena da. Hala ere, *in vitro* ernalketaren (IVF, *in vitro fertilization*) hasieran eragingo litekeenez, ARTen arrakasta asko igoko litzateke.

Obozitoen *in vitro* heltzea honetan datza: pazienteari estimulazio hormonalik gabe obozito heldugabeak erauzi egiten zaizkio eta hazkuntza-medio egokian sartuta, kanpo-ingurunean heltzen dira (Pincus & Enzmann, 1934). Beraz, heltze prozesu horretan parte hartzen duten seinaleztapen bidezidorrak ezagutuz gero, hainbat molekula gehitu litezke *in vitro* heltze hori efizienteagoa izateko. Izan ere, IVMari esker, ohiko IVFen egin behar den hormonazioa ekidin liteke eta, besteak beste, hiper-estimulazio sindromedun (Halupczok et al., 2015) edota obulutegi polikistikodun emakumeentzat (Nader 2010) haurdun geratzeko aukera berri bat suposatuko luke.

Ugaztunetan ernalketa gertatu dadin gameto emearen (obuluaren) eta gameto arraren (espermatozoidearen) arteko fusioa eman behar da. Obuluak obulutegiko folikuluetan eraten dira, granulosa zelulen geruza batez edo gehiagoz estalita. Enbrioi emeak 4-5 aste dituenean, zelula germinal primordialak meiosian sartzen dira eta lehenengo meiosiaren I. profasean etenda mantentzen dira obulazioa gertatu behar den arte. I. profasean etenda dauden obozitoak besikula germinal (GV, *germinal vesicle*) bezala ezagutzen dira. Guruin pituitarioak jariatutako hormona folikulu-estimulatzaileraren (FSH, *follicle-stimulating hormone*) eraginez folikuluaren handipena emango da, obozitoaren tamainaren handipenarekin batera, neurri egokia eskuratu arte (Mehmann, 2005). Obulazioa gertatzera doan unean, guruin pituitarioak askaturiko hormona luteinizatzaileak (LH, *luteinizing hormone*) granulosa zeluletan eragingo du eta oraindik ezezaguna den seinaleztapenaren bidez obozitoaren meiosiaren berraktibazioa gertatuko da. Une horretan, obozitoa folikulutik irten eta meiosiarekin jarraituko du lehenengo meiosia bukatuz II. metafasera (MII) heldu arte; izan ere, obozitoa MII-an etenda geratuko da espermatozoide batek ernaldu arte. Hori gertatuz gero, II. meiosia bukatu eta zigotoaren zatiketa mitotikoen ondorioz lortuko da indibiduo berria (Adhikari & Liu, 2014).

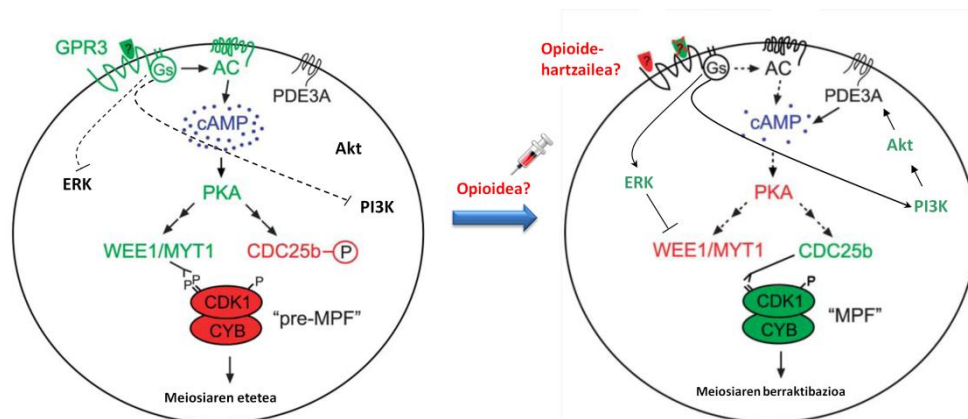
Jakina da obozitoa meiosiaren I. profasean etenda mantentzearen arduradun nagusia cAMP-aren kontzentrazio handia egotea dela hein handi batean (Picton et al., 1998). cAMP-aren ondorioz 1. irudian azaltzen den seinaleztapena jarraituta, obozitoen heltzea sustatzen duen faktorearen (MPF, *Maturation Promoting Factor*) inhibizioa gertatuko da, obozitoa meiosian etenda mantenduz (Adhikari & Liu, 2014). Badirudi, obozitoetan cAMP kontzentrazio altua mantentzea konstitutiboki aktiboa den GPCR baten (GPR3) ondoriozkoa dela (Mehmann, 2005).

Bestalde, obozitoen heltze prozesuan inplikatur dauden zenbait proteina eta seinaleztapen bidezidor deskribatu egin dira, horien artean MAPK bidezidorra. Ikusi da LH estimulazioaren ondorioz obozitoetan aipaturako bidezidorra aktibatu egiten dela eta aktibazio horren bidez induzitu egiten dela obozito-granulosa konplexuaren heltzea (Su et al., 2003). Gainera, ikusi da MAPK bidezidorrean dagoen ERK proteinaren aktibazioa obozitoaren heltze nuklearrerako ezinbestekoa dela (Sun & Nagai, 2003) eta baita MII fasean aktiboen dagoen bidezidorra dela ere (Wang et al., 2010).

80. hamarkadan hasi ziren opioide sistemak ugalkortasunean izan zezakeen inplikazioaren inguruan gogoeta egiten hainbat ebidentzia ikusi ostean (Jin et al., 1988). β -endorfina eta met-entzefalina opioideak detektatu ziren behiaren ugaltze-aparatuan eta kontzentrazio handiena likido folikularrean topatu zen (Petraglia et al., 1986). Era berean, obulazioa gertatzerakoan β -endorfinaren kontzentrazioaren emendioa gertatzen zela antzeman zen (Petraglia et al., 1985). Geroztik, gai honen inguruan aurkikuntza gehiago egin dira. Opioide-hartzaileak deskribatu dira gizakien espermatozoide eta obuluetan (Agirregoitia et al., 2006; 2012), mu opioide-hartzailea detektatu da behien, zaldien eta txakurren obozito-granulosa konplexuan (Dell'Aquila et al., 2002; 2008; Iorga et al., 2009), saguen enbrioian opioide-hartzaileak deskribatu dira; sagu enbrioia morfinarekin *in vitro* inkubatzean kalteak sortzen direla ikusi da (Chen et al., 2014), eta morfinak saguen umetokian enbrioia ezartzea kaltetu egiten duela ikusi da (Tang et al., 2015).

Opioideak izaera peptidikoa duten ligandoak dira eta okorrean Gi proteinetara lotutako hartzaileak aktibatu egiten dituzte (Madishetti et al., 2014). Estekatzaileekiko duten afinitatearen arabera, hiru motatako opioide hartzaileak daude nagusiki: mu opioide-hartzailea (MOR, *mu opioid receptor*), delta opioide-hartzailea (DOR, *delta opioid receptor*) eta kappa opioide-hartzailea (KOR, *kappa opioid receptor*). Hartzaile guzti horiek mintz plasmatikoa zeharkatzen duten 7 α -helizez eratuta dauden hartzaile metabotropiko monomerikoak dira. Horiek aktibatzerakoan, besteak beste $G_{i\alpha}$ proteinaren bidez adenilato ziklasa inhibitu eta $\beta\gamma$ azpiunitateen bitartez MAPK zein PI3K/AKT bidezidorrak aktibatu egiten dira; orokorrean cAMP-aren kontzentrazioa murriztea eraginez.

Opioideek zeluletan aktibatzen dituzten seinaleztapen bideak obozitoen heltze-prozesua gertatzeko aktibatzen direnen antzekoak direnez eta β -endorfina eta met-entzefalina bezalako peptido opioideek ugaltze-aparatuan zehar kontzentrazio handiena likido folikularrean dutenez, interesgarria izango litzateke aztertzea hozi-zeluletan opioide-hartzaileak presente ote dauden eta opioide sistemak obozitoen heltze prozesuan parte hartzen baduen. Izan ere, hori egia balitz, metabolismo opioidea ito farmakologiko egokia litzateke *in vitro* heltzeko medioan opiazeoak gehitzeko eta obozitoa meiosian berriro sartzera bultzatzeko (1. irudia).



1.irudia: Obozitoen meiosiaren etetean eta meiosiaren berrekitean inplikaturako dagoen seinaleztapen zelularren eskema (Mehlmann, 2005etik moldatua). Hipotesi opioidea. Konstitutiboki aktibatuta dagoen GPR3ak Gs proteina aktibatzen du, zeinak adenilato ziklasa (AC) estimulatuta cAMP-aren igoera eragiten duen. cAMP-ak PKA aktibatzearen ondorioz ziklo zelularra erregulatzen duen konplexua (MPF) fosforilazioz inhibitu egingo du, PKA proteinak eragindako fosforilazioen bitartez MPF fosforilatzen duen kinaasa (WEE1/MYT1) aktibatuz eta MPF defosforilatzen duen fosfatasa (CDC25b) inhibituz. Horrela, MPF konplexua inhibituta egotearen ondorioz oozitoak meiosian etenda daude. Gainera, GPR3 hartzailearen ondorioz ERK eta PI3K inhibituta daude. Meiosiari berrekiteko, ezezaguna den seinaleztapenaren bitartez cAMP kontzentrazioa gutxitu, PKA inhibitu eta CDC25b-k bideratutako MPFaren defosforilazioa gertatuko da. Meiosiaren berrekite horretan ere ERK eta Akt-k parte hartuko dute, ERKren aktibazioaren ondorioz WEE1/MYT1 inhibituz eta Akt-ren aktibazioaren ondorioz cAMP kontzentrazioa txikiagoa izatea baimenduz.

HELBURUAK

Sarreran aztertu ditugun aurrekari guztiak kontuan hartuta, gure helburu orokorra izango da opioide sistemak ugaltze-sisteman duen eragina sakonago aztertzea jarraian azaltzen diren azpi-helburuak gauzatzuz.

Lehenik, opioide sisteman parte hartzen duten hartzaileen (MOR, DOR eta KOR) mRNA-ren detekzioa eta proteinen immunolokalizazioa egingo da obozitoen heltze-fase ezberdinetan (GV, MI, MII) zein espermatozoide helduetan. Jarraian, obozitoak *in vitro* heltzerakoan opioideek duten eragina aztertuko da: alde batetik, heltze-medioan opioideoak gehituz fosforilazioz aktibatzen den ERK aztertuz eta bestetik, opioideoekin heldu diren obozitoek *in vitro* ernalkuntzan eta enbrioiaren *in vitro* garapen goiztiarrean izan dezaketen portaera behatuta.

Ikerketa hau egiteko sagua erabiliko da animalia eredu bezala behar adina obozito zein espermatozoide osasuntsu kantitate egokian lortzeko. Dena den, kontuan hartu behar dugu saguak erabiltzea era berean muga bat suposatzen dezakeela eskuraturiko datuak gizakietara estrapolatzea ahaleginduz gero. Izan ere, sagu eta gizakien ugaltze-aparatua, hozi-zelulen heltze prozesua, ernalketa eta enbrioiaren garapena ez dira guztiz berdinak (Gosden & Lee, 2010).

MATERIAL ETA METODOAK

1) Animaliak

Erabilitako animalia guztiak C57BL/6NxDBA2 sagu helduak izan dira, animaliategian baldintza kontrolatuetan mantenduta: 23-24 °C-ko tenperaturan, 14 h argi / 10 h iluntasuneko fotoperiodoetan eta behar adinako ur eta elikagaiekin. Animaliekin burututako prozedura esperimental guztiek UPV/EHU-ko Animalien Ongizaterako Etika Batzordearen (AOEB) onspena dute, CEEA M20/2015/016-173 zenbakidun baimenarekin.

2) Sagu emeen super-obulazioa

8-10 asteko sagu emeak *in vivo* super-obulatzeko, injekzio intraperitonealak eman zitzaizkien: PMSGren 7,5 UI (*pregnantmare's serum gonadotropin*, behor haurdunen gonadotropina serikoa) (Folligon, Intervet, Castle Hill, Australia) injekzio bakarrean folikuluen estimulaziorako eta, obulazioa behar izanez gero, 48 ordura hCG hormonaren 7,5 UI (*human chorionic gonadotropin*, giza gonadotropina korionikoa) (Veterin Corion, Equinvest), biak gatz-serum fisiologikoan disolbatuta. Azkeneko hormona injektatu eta 12 ordura gertatuko da sagu emeen super-obulazioa.

3) Laginen lorpena

3.1) Sagu emeen obozitoen erauzketa

Sagu emeen obozitoak lau helburu nagusitarako erauzi ziren: hainbat heltze-fasetan dauden obozitoek espresatzen duten mRNA aztertzeko, immunozitokimika bidez opioide hartzaileen kokapen zelularra behatzeko, obozitoak morfinarekin *in vitro* heltzerakoan ERKren fosforilazioa aztertzeko eta azkenik, obozitoak *in vitro* heldu ostean FIV burutzeko.

Sagu emea dislokazio zerbikalez hil ostean, sabelaldea zabaldu eta obulutegia edota obiduktua ebaki eta M2 medioarekin 37 °C-an zegoen plaka batera pasatu ziren. Esaterako, *in vitro* heltze-prozesua egiteko obozitoak obulutegitik erauzi ziren eta *in vivo* heltze-prozesua egiteko, ordea, obiduktuaren anpulutik. Behin intereseko ehuna edukita, obulutegia edo anpuluia 30 G-ko orratz batekin urratu zen eta, hurrenez hurren, heldu gabeko eta *in vivo* heldutako obozito-granulosa konplexuak eskuratu ziren. Obozitoak soilik eskuratu nahi zirenean, obozitoen RNA purifikatzeko kasu, 300 µg/mL hialuronidasarekin kontaktuan jarri ziren granulosa zelulak obozitoetatik baztertzeko. Jarraian, pipeta baten laguntzaz obuluak heltze-fasearen arabera *eppendorf*-etan hogeinaka banatu eta -80 °C-an gorde ziren.

3.2) Sagu arren espermatozoiden erauzketa

Esperimentua hasi baino aurreko egunean, plaka batean HTF (*Human Tubal Fluid*) medioaren 500 µl-ko tanta eratu, olio estali eta inkubagailuan sartu zen pHa egonkortu zedin (37 °C eta % 5 CO₂). Esperimentuarekin hasteko, sagu arra hil eta sabelaldea zabaltzerakoan isats-epididimoa hodi deferente zati batekin isolatu eta M2 medioa 37 °C zuen plaka batean ipini zen. Jarraian, isats-epididimoa HTF tantara pasa eta gainean presioa eraginez sagu arraren espermatozoidak hodi

deferentetik aterarazi ziren. Orduan, espermatozoideak zuzenean immunozitokimika zein *in vitro* ernalketa esperimentuak egiteko erabili ziren edota 600 g-an 10 minutuz zentrifugatu eta eskuratutako hauspeakina -80 °C-an izoztu, bestelako prozesuetan erabili arte.

4) mRNA-ren erauzketa

Saguen zeluletan dagoen RNA mezularia erauzteko bi protokolo jarraitu ziren; hozi-zelulen mRNA erauzteko *Dynabeads® mRNA Direct™ Micro Kit*-a (Life Technologies, Oslo, Norvegia) erabili zen eta sagu kortexean dagoena erauzteko, ordea, TRIzol®-kloroformo metodologia. *Dynabeads® Kit*-aren bidezko RNA erauzketa produktuaren argibideak jarraituta egin zen. TRIzol®-kloroformo bidezko RNA erauzketan aldiz, eppendorf batean zegoen saguaren kortex zatiari 1 mL TRIzol® gehitu zitzaion eta enbolo baten laguntzaz homogenizatu. Jarraian, kloroformoa gaineratu zen kloroformo:TRIzol® 0,2:1 proportzioan eta 10.000 g-an zentrifugatuta 10 minutuz faseen banaketa lortu zen. RNA dagoen goikaldeko fase urtsua eskuratu, isopropanola (1:1) gehitu eta baldintza berdinekin zentrifugatuta, RNA hauspeatzea lortu zen. Segidan, hauspeakinari % 70ean dagoen etanola gaineratu ostean, zentrifugatu eta azken hauspeakin horri ura gehitu zitzaion, jada isolatutako RNA eskuratu zelarik. Lortutako RNA-ren kontzentrazioa NanoDrop (ThermoScientific) gailua erabilita kuantifikatu zen.

5) RT-PCR

Isolatutako mRNA-ren alderantzizko transkripzioa (RT) burutu zen cDNA sortzeko; obozitoen kasuan, aldez aurretik hogeinaka elkartutako zelula guztiekin eta, garun kortex eta espermatozoideen kasuan, ostera, erauzitako RNAREN 1 µg-rekin. Oligo(dT)-ak erabilita RNAREN cDNA osagarria lortu zen, oligoak RNARA lotzeko lehenik 10 minutuz 65 °C-an berotuta. Segidan, RNAsa inhibitzailea, dNTPak, alderantzizko transkriptasa (Promega, USA), MgCl₂ eta erreakzio-indargetzailea zituen nahasketa gehitu zen eta jarraian azaltzen diren baldintzen bitartez cDNA sortu zen: 25 °C-an 10 minutuz, 42 °C-an 60 minutuz cDNA eratzeko eta azkenik, 65 °C-an 10 minutuz alderantzizko transkriptasa entzima inhibitzeko.

Lortutako cDNAREN integritatea PCR bidezko saguen histonaren (H2azf) eta aktinaren (ACTB) amplifikazioaz baieztatu zen; aldez aurretik egindako tenperatura-gradienteko PCRan hautatutako hasleen hibridazio tenperaturatan (**1. taula**). Behin hori eginda, opioide hartzaileen presentzia karakterizatu zen lortutako obozito eta espermatozoideen cDNA erabiliz, kortexeko cDNA kontrol positibotzat hartuta eta 1. taulan azaltzen diren hasleak erabilita. PCRak baldintza hauetan burutu ziren: lehenik 95 °C-an 2 minutuz; jarraian 35 ziklo, ziklo bakoitza 95 °C-an 15 segunduz, 30 segunduz hasleen hibridazio tenperaturatan (**1. taula**) eta 72 °C-an 35 segunduz izan zen; eta azkenik 72 °C-an 5 minutuz egindako amaierako luzapena.

Genea	Sekuentzia (5' - 3')	Anplikoia (bp)	hibridazio-tenperatura (°C)	Erreferentzia
H2azf	(f) AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG (r) CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG	209	50,7	de Frutos et al., 2016
ACTB	(f) GGAAATCGTGC GTGACATTAAGG (r) GATGGAGGGGCCGACTC	490	58	Guk egina
mMOR	(f1) ATCCTCTCTTCTGCCATTGGT (r1) TGAAGGCGAAGATGAAGACA	290	50	Fu et al., 2014
mDOR	(f2) TGTTTGGCATCGTCCGGTAC (r2) TGAAGCCAAGACCCAGATGC	320	55	Wang et al., 2010
mKOR	(f) CCGATACACGAAGATGAAGAC (r) GTGCCTCCAAGGACTATCGC	342	53,8	Fu et al., 2014

1.taula: PCR bidez azertuak izan ziren saguen hasleak, duten sekuentzia, lortzen den anplikoia tamaina, hibridazio-tenperatura eta haslea hautatzeko erabilitako artikulua.

Lortutako anplikoia % 1,5eko agarosa-gel elektroforesiaren bidez banandu eta argi ultramoreko gailuan (ChemiDoc, Bio-Rad) azertuak izan ziren.

6) Immunoizotokimika

MOR, DOR eta KOR opioide-hartzaileek heltze-fase ezberdinetan dauden obozito zein espermatozoideetan duten kokapen zelularra aztertzeko eta pERK aztertzeko immunoizotokimika egin zen. Laburki, laginetan PBS garbiketa bat egin ostean, % 4ean dagoen paraformaldehidoa (PFA) (Panreac, Barcelona, Spain) gehituta zelulak finkatu ziren. Laginak iragazkortzeko X-100 Tritoiak % 1ean eta blokeorako FCS (*Fetal Calf Serum*) % 10ean (v/v) PBS soluzioan sartu ziren 45 minutuz. Jarraian, opioide-hartzaileekiko afinitatea duten antigorputz primarioak gehitu egin ziren 1:200 diluzioan edo pERK-rentzako antigorputza (1:400). Untxiaren antigorputz poliklonal primarioak izan ziren erabilitakoak: anti-MOR, anti-DOR, anti-KOR (Millipore, UK) eta anti-pERK (Cell Signalling; Danvers, MA, USA). Antigorputz sekundario berdina erabili zen lagin guztietarako: IgG-en aurkako ahuntzaren Alexa Fluor® 488 antigorputza (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), 1:500 diluzioan. Zelulen DNA Hoechst 33342 (0.01 mg/mL)-rekin tindatu zen. Amaitzeko, espermatozoide zein obozitoak Fluoromount G (EMS, Hatfield, UK) tantetan muntatu ziren kristalezko portetan eta Zeiss Axio Observe ApoTome 2 mikroskopio konfokalean aztertu UPV/EHU-ko SGiker mikroskopiako zerbitzu orokorrean. Antigorputz sekundarioaren kontrol negatiboa berdin egin zen baina antigorputz primarioa gehitu gabe.

7) *In vitro* heltzea (IVM)

In vitro heltzea TCM-199 (Sigma, St. Louis) medioari % 0,5 (v/v) gentamizina, 10 ng/mL EGF (*epidermal growth factor*) eta % 10 (v/v) FCS gehituta egin zen. Medio hau inkubagailuan sartu egin zen 4 orduz 37 °C, % 5 CO₂ eta % 95eko hezetasunean pHa egonkortzeko. Ondoren, 48 ordu lehenagotik PMSG hormona zizatuta zuten sagu emeatatik hasieran azaldutako prozedura jarraituz obozitoak erauzi eta *in vitro* heltze-medioan sartu ziren, hainbat baldintzatan: PBSan disolbatutako morfinaren 3 kontzentrazio (1 nM, 10 nM eta 100 nM) eta PBSan soilik, *in vitro* heltzearen kontrol bezala.

8) *In vitro* ernalketa (IVF)

Ernalketarako, 6-24 asteko sagu arren espermatozoideak pH egonkortua zuten HTF mediora erauziak izan ziren, Makler kamera kontagailua erabilia espermatozoide kantitatea kuantifikatu eta ordubete itxaron egin zen espermatozoideen gaitzea gertatu arte. Ondoren, obozitoak 500 µl-ko HTF medioa eta olioko estalkia zuten 4 putzuko NUNC plaketara pasarazi ziren eta beharrezko espermatozoide kantitatea gehitu, espermatozoide kontzentrazioa 1×10^6 espermatozoide/mL izan zedin. 5-6 orduko inkubazioaren ondoren, ernalketa gertatua izango zen.

9) Enbrioien kultiboa

IVFaren ondoren, ustezko zigotoak HTF medioan garbitu egin ziren inguruko espermatozoideak baztertzeko eta olioaz gaineztatuta zeuden 20 µl-ko KSOM tantetara igaro, enbrioia garatu ahal izateko. Enbrioiak 5 egunez kultibatu ziren eta egun horietako bakoitzean enbrio bakoitzaren zatitze-tasaren kuantifikazioa egin zen, 2 zelulatik hasita blastozistoa eskuratu arte, morfinak obozitoen heltze-prozesuan izan dezakeen eragina aztertzeko.

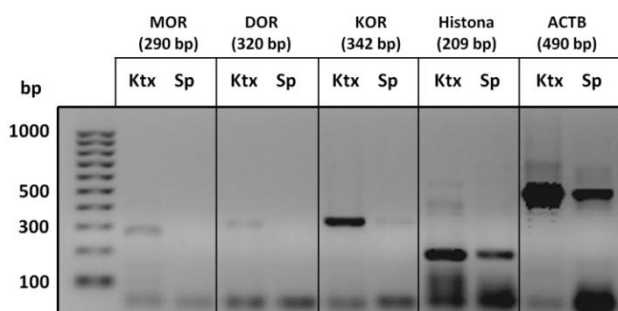
10) Datuen analisia

In vitro heltze-fase eta enbrioien garapen fasearen kuantifikazioak estatistikoki analizatuak izan ziren. Taldeen arteko emaitzen analisi estatistikoak eskatzen zuen aldagai anitzeko analisia bi faktorezko bariantza-analisia (ANOVA, *analysis of variance*) eta jarraian *post-hoc* Bonferroni testa erabilia egin zen, taldeen arteko batez bestekoak konparatuta, errore estandarra kontuan hartuta (\pm SEM, *standard error of the mean*). Adierazgarritasunaren muga minimoa $p < 0,05$ -ean ezarri zen, analisi estatistikorako GraphPad Prism 5 softwarea erabilia.

EMAITZAK

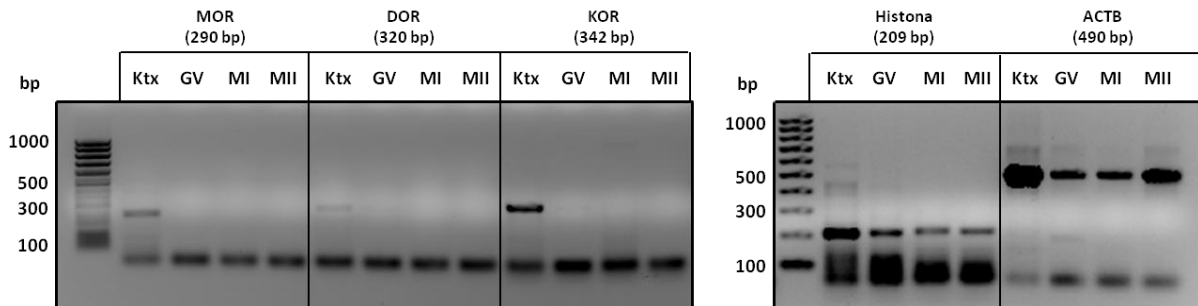
1) Opioido-hartzaileen mRNA-ren espresioa saguen espermatozoideetan eta obozitoetan

Saguen espermatozoideetatik erauzitako RNArekin egindako PCR bidez kappa opioido-hartzailea detektatu da, espermatozoideetan zein kontrol positibo moduan erabilitako saguen garunaren kortexean, espero zen bezala, 342 bp-ko banda lortuta. Mu eta delta hartzaileentzat, espero genituen 290 eta 320 base pareako aplikoiak saguaren kortexean aurkitu genituen baina ez ordea espermatozoideetan. Hala ere, barne-kontrol moduan erabilitako histona eta aktina (ACTB) lagin guztietan aplikatu ziren (2. irudia).



2. irudia: MOR, DOR, KOR, Histona eta ACTB-ren PCR produktuen % 1,5 agarosa-gelaren elektroforesia, SYBR bidez tindatuta, saguen espermatozoide (Sp) eta garun-kortexarentzat (Ktx). Ezkerrean, pisu molekularreko markatzailea (bp=base pare) agertzen da. n = 5

Saguen GV, MI eta MII faseetan dauden obozitoetatik erauzitako RNArekin egindako PCR bidez ez da opioide-hartzaileen RNAririk detektatu, kontrol positibo bezala erabilitako saguen garun-kortexean opioide-hartzaile guztiak detektatu arren dagokien tamainarekin. Dena den, barne-kontrol moduan erabilitako bi RNAk (Histona eta ACTB) lagin guztietan detektatu dira (**3.irudia**).



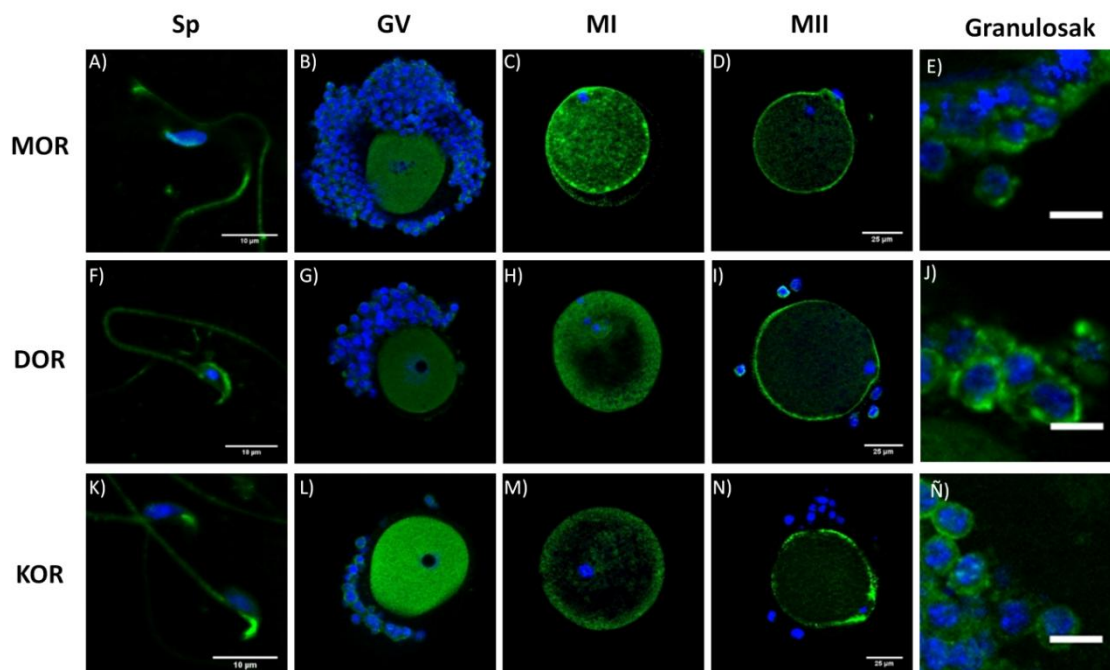
3. irudia: MOR, DOR, KOR, Histona eta ACTB-ren PCR produktuen % 1,5 agarosa-gelaren elektroforesia, saguen besikula germinalean (GV), I. metafasean (MI) eta II. metafasean (MII) dauden obozito eta garun-kortexarentzat (Ktx). Ezkerrean, pisu molekularreko markatzailea (bp=base pare) agertzen da. n = 5

2) Opioide-hartzaileen kokapen zelularra saguen espermatozoideetan eta obozitoetan

Azterketa immunozitokimikoen bidez, hiru opioide-hartzaileen (MOR, DOR eta KOR) presentzia baieztatu da bai espermatozoide eta baita obozitoen heltze-fase guztietan (GV, MI eta MII) (**4 irudia**).

Espermatozoideei dagokionez, MOR espermatozoideen buruan zein isatsean azaltzen da, buruaren eskualde ganbilean mu hartzaileen dentsitate zein intentsitatea nabarmenki handiagoa izanik (**3.A irudia**). DORen distribuzioa espermatozoide heldu guztian zehar ematen da, buruaren zonalde ganbilean ere dentsitatea handiagoa delarik (**4.F irudia**). KOR, ordea, batez ere espermatozoidearen buruaren kako apikalean dago nabarmenki lokalizatuta, espermatozoide osoan zehar kappa hartzaileak azaltzen diren arren (**4.K irudia**).

Obozitoetan opioide-hartzaileek duten kokapena ezberdina da obozitoa GV, MI edo MII heltze-fasean dagoenaren arabera, baina opioide-hartzaile ezberdinek fase bakoitzean lokalizatzeko duten joera antzekoa dela ikusten da. MOR, DOR zein KOR hartzaileak GV fasean zitosolean zehar era nahiko homogeneoan banatuta daude (**4.B, G eta L irudia**); MI fasean kokapen periferikoago bat aurkezten dute (**4.C, H eta M irudia**) eta MII fasean mintz plasmatikokoan kokatuta daude nabarmenki (**4.D, I eta N irudia**). Obozitoak inguratzen dituzten granulosa zelulei dagokionez, zelula hauek inguratzen ari diren obozitoaren fasea ezberdina izanda ere, hiru opioide-hartzaileak nagusiki mintzean kokatuta dituzte (**4.E, J, eta Ñ irudia**).



4. irudia: Opioido-hartzaileen azterketa immunozitokimikoa saguen espermatozoideetan, **A**, MOR; **F**, DOR; eta **K**, KOR. Eskala-barra, 10 μ m. Opioido-hartzaileen azterketa immunozitokimikoa saguen obozitoen heltze-fase ezberdinetan, besikula germinala (GV), I. metafasea (MI) eta II. metafasea (MII). **B**, **C**, **D**, MOR; **G**, **H**, **I**, DOR; eta **L**, **M**, **N**, KOR. Eskala barra, 25 μ m. Opioido-hartzaileen azterketa immunozitokimikoa saguen granuloseetan, **E**, MOR; **J**, DOR; eta **Ñ**, KOR. Eskala-barra 10 μ m. Egoera bakoitzaren irudi adierazgarri bat ikusgai. Opioido-hartzaileak berdez (Alexa 488) eta nukleoak urdinez (DAPI). n = 3

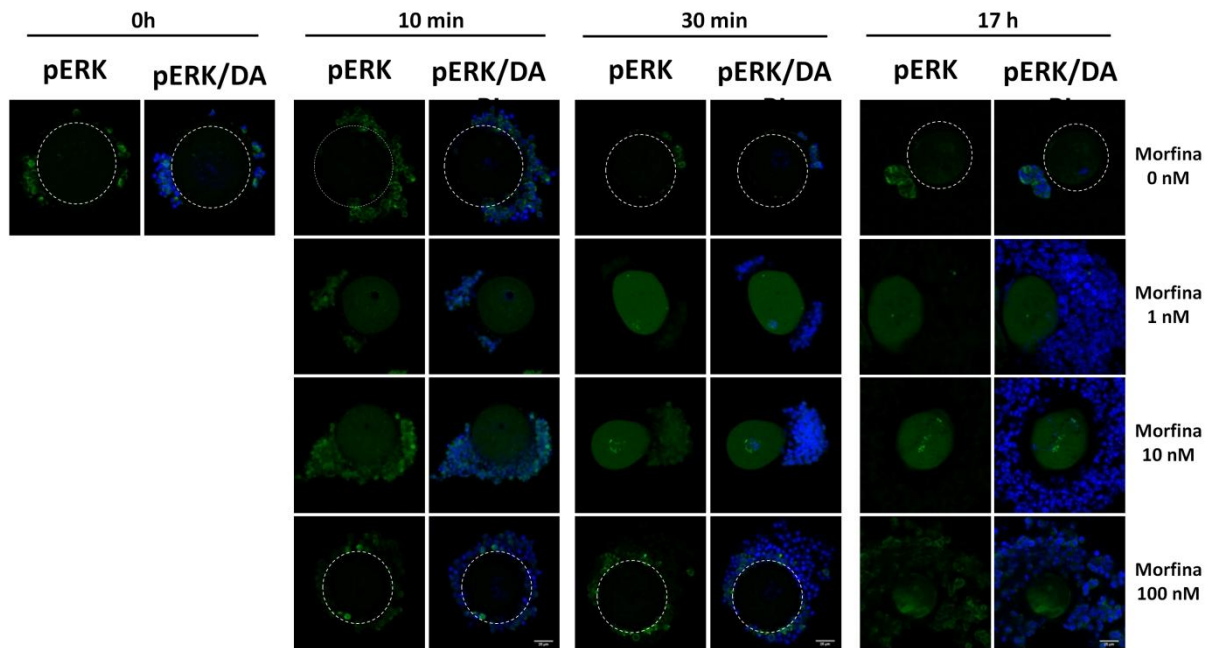
3) Morfinaren eragina obozitoen *in vitro* heltzean eta pERKren dinamikan

Morfinarik gabe *in vitro* heltze medioan egon diren obozitoen nukleoak aztertuta ikusten da 30 minutura GV fasean jarraitzen dutela eta 17 ordu igaro ostean hasi direla MI faseko morfologia eskuratzeko. Morfinarik gabe kultibatu diren zelula horien ERKren fosforilazioa aztertuta esan dezakegu obozitoaren ERK fosforilatzeko 17 ordu pasa behar direla, eta detektatzen den pERKren seinalea gainontzeko baldintzekin alderatuta ahulagoa dela. Granulosa zelulen kasuan, ordea, hasiera batetik pERK agertzen da, eta aztertutako heltze-denbora osoan zehar seinalea konstante mantentzen da. (**5. irudia**)

Obozitoak heltzeko medioan 1 nM morfina eta 10 nM morfina gehitu diren kasuetan, antzeko efektua ikusi da. Nukleoak aztertuta ikusten da 30 minututan obozitoak GV faseatik MI fasera igaro direla, morfinarik gabeko egoera baina madurazio-nuklear azkarrago baten ondorioz (10 nM-ekin 17 ordu MIIan sartzen ari da). pERKren presentzia handia hautematen da zelula osoan zehar, 10 minututatik 17 ordu arte mantendu egiten delarik. Granulosa zelulen kasuan ordea, 30 minutuz *in vitro* heltze-medioan mantentzen direnean, granulosa zelulen ERKren fosforilazioa galtzen hasi dira, eta 17 ordu igaro ostean ez dute pERK seinalerik aurkeztu. (**5. irudia**)

Obozitoak 100 nM morfinarekin kontaktuan egon direnean, obozitoetan ez da ERK fosforilatuta azaltzen 17 ordu igaro arte, granulosa zeluletan denbora guztian zehar agertzen diren bitartean.

Beraz, morfinarik gabeko baldintzek zein morfina 100 nM-ean dituztenek oboztito zein granulosen ERKren fosforilazio-patroiean berdin eragiten dute. (5. irudia)

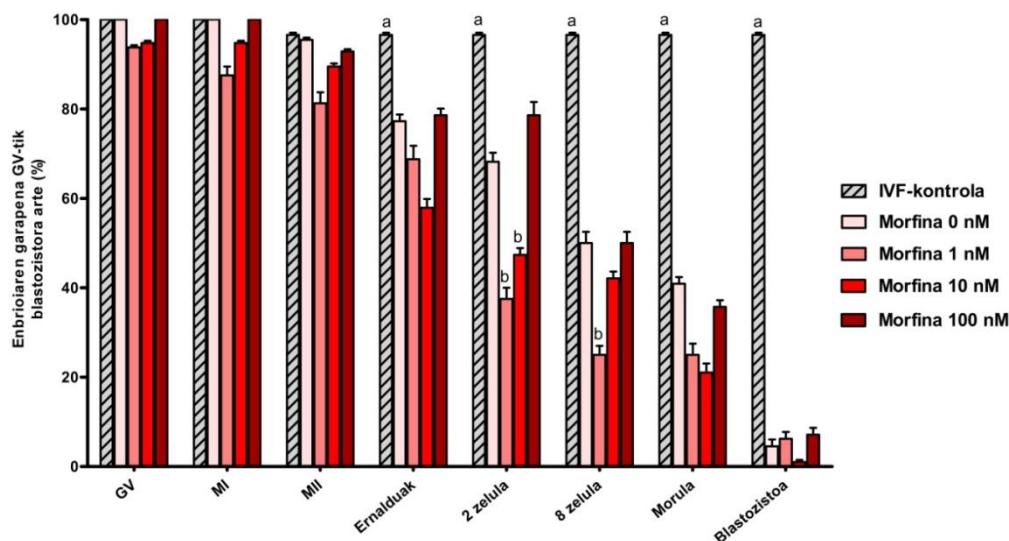


5. irudia: pERKren azterketa immunozitokimikoa saguen obozitoen heltze-prozesuan: 0, 1 nM, 10 nM eta 100 nM morfina baldintzatan. pERK berdez (Alexa 488) eta nukleoak urdinez (DAPI). 0 ordutan (0 h), 10 minututan (10 min), 30 minututan (30 min) eta 17 ordutan inkubatutako obozitoen egoera bakoitzeko irudi adierazgarri bat. Eskala-barra, 25µm. n=3

4) Morfinaren eragina *in vitro* ernalkuntzan

Morfinarekin kontaktuan egon diren obozitoen heltze-tasa aztertu da. Obozito horiekin *in vitro* ernalkuntza egiterakoan, heltze-fase bakoitzera heldu diren obozitoak eta enbrioiaren garapen goiztiarreko fase ezberdinera heldu direnak kuantifikatu dira (6. irudia).

Saguetan *in vivo* heldu diren obozitoak heltze- zein enbrioi-fase guztietan % 90etik gora mantendu dira (% $96,55 \pm 0,5$ blastozistorarte iritsita), *in vitro* ernalkuntza era egoki batean eman denaren seinale. Gainera, argi ikusten da obozitoak *in vivo* heltzerakoan askoz ere emaitza hobekak lortzen direla, blastozisto egoerara ia enbrioi guztiak heltzen baitira, *in vitro* hazten direnekin gertatzen ez den bezala. *In vitro* heldu diren obozitoen artean, morfinarik gabe zein morfina-rekin tratatzerakoan ez da ezberdintasun handiegirik detektatu, obozito gehienak heldu baitira MII fasera. Gainera, ernaldutako eta blastozisto egoerara oso gutxi heltzen dira, morula eta blastozisto faseen artean jaitsiera nabaria da eta morfina-rekin tratatu zein tratatu gabeko artean antzeko balioak lortu dira. Egia da ezberdintasun esanguratsu batzuk ikusi direla enbrioiaren garapenean erabilitako morfina kontzentrazioaren arabera. Nolanahi ere, blastozistora heltzen direnen artean desberdintasunik ez dagoela azpimarratu behar da.



6. irudia: Obozitoak *in vitro* 17 orduz heltzean zehar eginiko morfina dosi-erantzun analisia fase bakoitzean dagoen obozito/enbrioiaren portzentajetan neurtuta: besikula germinala (GV), I. metafasea (MI), II. metafasea (MII), ernaldutako obozitoa, 2 zelulako enbrioia, 8 zelulako enbrioia, morula eta blastozistoa, *in vitro* ernalketa egin ostean. IVF kontrolaren enbrioiaren garapena erakusten da (marradun barrak), morfina gabeko obozitoen *in vitro* inkubazioa (barra zuriak), 1 nM morfinaekin inkubatutako obozitoak (barra arrosak), 10 nM morfinaekin inkubatutako obozitoak (barra gorriak) eta 100 nM morfinaekin inkubatutako obozitoak (barra marroiak). Emaizak aparteko hiru esperimenturen arteko batez bestekoa \pm SEM bidez adierazten dira. Tratamenduen arteko ezberdintasun adierazgarriak letra ezberinekin (a, b) aurkezten dira; kasu guztietan $p < 0,05$ izanik.

EZTABAIDA

Lan honen helburu orokorra izan da opioide-hartzaileen espresio dinamika aztertzea saguaren gametoetan, halaber, opiazeo batek obozitoen heltze-prozesuan zehar izan dezakeen eraginaren inguruko jakintza handitzea. Zehazki, heldu gabeko obozitoetan morfina bezalako opioidearen dosiaren menpeko erantzuna aztertu zen ERKren fosforilazio dinamika eta IVF ondorengo enbrioiaren garapen-tasa behatuz. Izan ere, opioide sistemak ugalkortasunean eragina baduela aspaldi ezagutzen da baina, obozitoen madurazioan duen eraginari buruz lan oso gutxi daude (Agirregoitia et al., 2012).

Opioide-hartzaileen RNA mezulariaren espresioari dagokionez, saguen espermatozoiden KORen mRNA-ren espresioa detektatu zen, baina ez ordea MOR eta DORena. Gaur egun arte, beste animalia-espezieetan ere detektatu da opioide-hartzaileen espresioa. Kappa eta delta hartzaileei dagokionez, soilik gizakien espermatozoidetan aztertu dira, guk lortutako emaitza berdinekin; hau da, saguetan bezala, gizakietan kappa opioide-hartzailearen mRNA dagoela eta ez ordea delta opioide-hartzailearena (Agirregoitia et al., 2006). Mu opioide-hartzaileari dagokionez, gizaki (Agirregoitia et al., 2006), zaldi (Albrizio et al., 2005) eta arrainetan (Albrizio et al., 2014) detektatu da haren espresioa, saguetan detektatzeko gai izan ez garen arren. Bestalde, saguen obozitoen heltze-fase bakoitzean egindako RT-PCRtan ez genuen opioide-hartzaileen mRNA-rik detektatu. Kasu honetan ere, DOR eta KOR hartzaileak soilik gizakien obozitoetan aztertuak izan dira, hartzaile horien mRNA obozitoetan ez dagoela ondorioztatuta (Agirregoitia et al., 2012). MORen espresioa

nahiz eta saguetan ez genuen hauteman, gizaki, behi zein zaldien (Dell'Aquila et al., 2002; 2008) obozitoetan identifikatua izan da.

Opioide-hartzaileen proteinaren kokapen-zelularrari dagokionez, saguen espermatozoideetan MOR, DOR eta KOR opioide-hartzaileak detektatu ziren; MOR eta DOR batez ere espermatozoide-buruaren alde ganbilean eta KOR nabarmen saguen espermatozide-buruko kako apikalean. Aurreko ikerketetan, beste espezieko espermatozoideen opioide-hartzaileen kokapena ere ezagutu da: hiru opioide-hartzaileak gizakian (Agirregoitia et al., 2006), MOR eta DOR zaldietan (Albrizio et al., 2005; 2010) eta MOR arrainetan (Albrizio et al., 2014). Espermatozoideetan molekula bakoitzak duen kokapena funtzioarekin erlazionatuta dagoenaren teoriarekin jarraituz (Turner, 2006), esan dezakegu MOR eta DOR hartzaileek kokapen oso antzekoa dutenez funtzio antzekotan parte hartuko dutela eta KORek ordea, sagu espermatozoideen kako apikala inplikaturako dagoen funtzio espezifikoagoetan. Hartzaile bakoitzari funtzio bat esleitzekotan, esan genezake MOR eta DOR hartzaileak eskualde akrosomikoan daudenez nagusiki, erreakzio akrosomikoan parte hartu lezaketela (Satouh et al., 2012); eta kako apikalak espermatozoideen ernaltzeko gaitasuna errazteko obiduktuko epiteliara atxikitzea laguntzearen funtzioa duela uste denez (Firman & Simmons, 2009), KOR horretan egon liteke inplikaturako. Dena den, saguen espermatozoideen morfologia bereizgarri horrek zein funtzio duen frogatuta ez dagoenez, ezin dezakegu ziurtatu aipaturikoak duen egiazkotasuna.

Era berean, saguen obozitoetan, heltze-fasean zehar opioide-hartzaileek lokalizazio ezberdina zutela ikusi genuen, baina hartzaile guztiak joera berdinarekin: GV fasean kokapen zitoplasmatico homogeneoa zuten, MI fasean periferikoagoa, eta MII fasean mintz plasmaticoan kokatzen ziren. Ezaguna da GPCRak zelula mintzean direla funtzionalak (Cahill et al., 2007). Beraz, opioide-hartzaileak saguen obozitoetan aktibo egon litezke batez ere MI-MII faseen trantsizioan. Granulosa zeluletan, ordea, hartzaileak obozitoen heltze-fase guztietan zehar agertzen dira, kokapen periferikoarekin. Granulosetan GV fasean MII fasean opioide-hartzaileak presente daudela ikusteak pentsarazi ahal digu obozitoen heltze prozesuan zehar opioideek eraginen bat eduki dezaketela, granulosetan eraginez. Orduan, horrela balitz, opioideek granulosa zeluletan hartzaileetara batu eta seinalea oraindik ezezaguna den mekanismoen bitartez obozitoetara igaroko litzateke, adibidez, obozito eta granulosa zelulen arteko GAP loturen bitartez (Conti et al., 2012).

Beste hainbat espezieetan ere aztertu da opioide-hartzaileek obozitoetan duten kokapena, hala nola, gizaki (Agirregoitia et al., 2012) eta zaldian (Dell'Aquila et al., 2008). Espezie bakoitzean deskribatu diren desberdintasunak espezie bakoitzean opioide sistemak eduki dezakeen portaera desberdinagatik azaldu genitezazke edo, behintzat gizakiaren kasuan, obozitoak ugalkortasun- ezako klinika batetik datozenez, obozito horien osasun-estatusa agian onena ez dela. Hala ere, sagu enbrioietan ere garapen faseetan zehar aztertu dituzte opioide-hartzaileak eta zelula

bakarreko zigotoak duen opioide-hartzaileen patroia nahiko periferikoa dela deskribatu dute (Chen et al., 2014). Horrek gure emaitzen MII-arekin bat egiten du, obozitoa ernaldu aurreko fasea den MII-an ere periferian agertzen baitira.

Zeluletan RNA ez egon eta proteinak azaltzea kontraesan bat dirudien arren, kontuan hartu behar dugu lanean erabili ditugun zelulak germinalak direla. Espermatozoide eta obozitoak oso zelula desberdintzatutak dira baina, aldi berean, izaki bat sortuko duen zelula totipotenzialaren gurasoak. Beraz, argi dago zelula horien portaera zelula somatikoekiko ezberdina izan behar dela. Espermatozoideetan, deskribatu da hain zelula espezializatuak izanda ez dituztela ez transkripzio eta ezta itzulpen prozesurik egiten (Flesch & Gadella, 2000), eta espermatogenesi prozesuan zitoplasmaren zati handi bat (RNA barne) galdu egiten dela (Miller et al., 2005). Era berean, deskribatu da espermatozoide helduetan RNA populazio batzuk besteekiko kantitate handiagoan agertzen direla, RNA horiek enbrioaren garapenerako garrantzitsuak izan daitezkeela iradokiz (Ostermeier et al., 2005). Obozitoetan, transkripzio prozesua isilduta dagoela ikusi da, I. profasetik irten eta meiosiarekin jarraitzen duenetik, saguen kasuan 2-4 zelulako eta gizakien kasuan 4-8 zelulako enbrioia garatu arte (Gosden & Lee, 2010). Gainera, obozitoen RNAn % 50a baina gehiago degradatu egiten da madurazio meiotikoan (Paynton et al., 1988).

Zentzu horretan, mezulari guztietatik KORen papera ikertzea garrantzitsua izan daiteke; izan ere, espermatozoide helduetan agertzen den baina obozito helduetan agertzen ez den bakarra baita (saguetan behintzat), beraz, enbriogenesiaren lehen faseetan garrantzitsua izan liteke, transkripzioa oraindik isilduta dagoenean (Picton et al., 1998). Dena den, opioide-hartzaile guztien proteinak adierazita daudenez oboziten heltze-fasean zein enbrioaren garapen goiztiarrean eragina izan dezakete, eta horietatik lehenengoa da zehazki egindako lan honetan frogatutakoa.

Obozitoen heltze-prozesua egoki gauzatzeko heltze-nuklear zein zitoplasmatikoa eman behar da. Heltze-nuklearra obozitoak lehenengo gorputz polarra kanporatu eta MII-an meiosisia eteteen datza (Sun & Nagai, 2003). Obozitoen heltze-zitoplasmatikoa gertatzeko deskribatuta dago ERK fosforilatu behar dela (Gosden & Lee, 2010; Conti et al., 2012), eta gainera, MII-an pERK maila altuena dela (Wang et al., 2010). Era berean, jakina da opioideek MAPK bidezidorra aktibatu eta ERKren fosforilazioa eragiten dutela (Al-Hasani & Bruchas, 2013).

Guk egindako ikerketan, ikusi zen morfina 1 nM eta 10 nM-ekin obozitoak *in vitro* heltzerakoan madurazio nuklear zein zitoplasmatikoa aurreratuta zihoala morfinarik gabeko kasuarekin alderatuta, izan ere, meiosiari lehenago berrekiten zioten eta pERK 10 minututan agertzen hasten zen. Morfina 1 nM eta 10 nM-ekin tratatutako granuloetan ERK fosforilatuta zegoen, desfosforilatuz zihoan eta 17 ordutarako seinalea guztiz galtzen zen. Gainera, morfina 100 nM-ek morfinarik gabeko egoeraren patroia berdina aurkezten zuen, hau da, madurazio nuklearra astiroago ematen zen eta ERKren fosforilazioa beranduago ematen zen, granuloetan ERK uneoro

fosforilatuta zegoen bitartean. Beraz, obozitoen zitoplasman pERK azaltzea eta granulosean desagertzea obozitoen heltzea gertatu denaren seinale izan daiteke (Su et al., 2003).

ERKren fosforilazioaren azterketan lortutako emaitzak bat datoz hartzaileen kokapena behatzeko egindako immunozitokimika esperimentuekin. Izan ere, opioide-hartzaileak MI- MII faseetan kokatzen dira mintzean, obozitoak heltzen ari diren bitartean. Horrek esan nahi du, opioideek obozitoen MI-MII trantsizio horretan parte hartzen dutela ERKren fosforilazioa eraginez. Gainera, granulosa zelulek opioide-hartzaileak fase guztietan edukitzeak eta pERK galtzeak iradoki dezake hasieran opioideek obozitoen heltzean lagundu egiten dutela granulosean dituzten hartzaile funtzionalen bitartez eta, behin heltze-prozesua gauzatu denean, granulosean ERK gehiago ez dela fosforilatzen obozitoek eragindako atze-elikadura negatibo baten ondorioz akaso.

Beraz, argi geratzen da morfina obozitoen heltzean lagundu egiten duela, baina kontzentrazio-tarte batean. Kontzentrazioaren araberako efektua ere txerri eta behiaren obozitoak naloxona opioide antagonistarekin heltzerakoan deskribatu da, naloxonak kontzentrazio txikian antagonista bezala jokatzeko baitzuen baina, kontzentrazio handian, ordea, agonista partzial bezala (Dell'Aquila et al., 2002).

IVF egiterakoan, ikusi genuen *in vivo* heldu ziren obozitoen efizientzia askoz ere handiagoa zela *in vitro* heltzen zirenekin alderatuta. *In vitro* helduak izan ziren obozitoen artean, badirudi MII-ra gehienak heltzen zirela, haien artean ezberdintasun esanguratsurik egon gabe. Beraz, esan dezakegu morfina heltze-nuklear zein zitoplasmatikoaren abiadura handitzen duen arren, morfina gabekoen antzeko efizientziarekin heltzen direla MII fasera. *In vitro* ernalkuntza egiterakoan ikusi zen obozito batzuk morfinaarekin heldu diren arren, IVFen horrek eraginik ez duela izan, antzeko proportzioarekin ernaltzen baitira. Jarraian, ikusi zen IVMen artean blastozistora proportzio bertsuan heltzen zirela. Beraz, ezin dezakegu ondorioztatu *in vitro* obozitoak morfinaarekin heltzeak *in vitro* ernalkuntzan eraginik duenik, enbrioia blastozisto egoeran dagoenean soilik ezarri egiten baita umetokian.

Dena den, datuak aztertzeke orduan, kontuan hartu behar da soilik hiru ernalketa-esperimentu egin zirela, eta beraz, emaitza esanguratsuak lortzeko erreplika kopurua handitu behar litekeela. Gainera, normalean *in vitro* heltzen diren obozitoen % 20a blastozisto egoerara heltzen denez (Epigg J.J. et al., 1992), argi dago teknikak oraindik optimizazioaren beharra duela, *in vitro* heltzearen efizientzia gutxienez % 20ra heldu eta morfinaaren eraginpean ezberdintasunik ote dagoen aztertzeke.

ONDORIOAK

Ikerketa-lan hau burututa, orokorrean hauek dira atera ditzakegun ondorio nagusiak: lehena, MOR, DOR eta KOR opioide-hartzaileak saguen espermatozoide, obozito zein granulosa zeluletan daudela; bigarren, obozitoen heltze-fasearen arabera opioide-hartzaileek kokapen zelular

ezberdina dutela; hirugarren, obozitoetako opioide-hartzaileak funtzionalak direla (morfinarekin ERK fosforilatu); laugarren, opioide-hartzaileen morfina bidezko aktibazioak obozitoen *in vitro* heltze-nuklear zein zitoplasmatikoa azkartu egiten duela; eta azkenik, obozitoak morfinarekin *in vitro* heltzeak ez duela eraginik *in vitro* ernalkuntzan.

BIBLIOGRAFIA

- Adhikari, D., & Liu, K. (2014). The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 480–487.
- Agirreagoitia, E., Peralta, L., Mendoza, R., et al. (2012). Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, 24, 550–7.
- Agirreagoitia, E., Valdivia, A., Carracedo, A., et al. (2006). Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(November), 4969–75.
- Albrizio, M., Guaricci, A. C., Maritato, F., et al. (2005). Expression and subcellular localization of the mu-opioid receptor in equine spermatozoa: evidence for its functional role. *Reproduction (Cambridge, England)*, 129, 39–49.
- Albrizio, M., Guaricci, A. C., Milano, S., et al. (2014). Mu opioid receptor in spermatozoa, eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus Aurata*) and its involvement in stress related to aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40, 997–1009.
- Albrizio, M., Lacalandra, G. M., Micera, E., et al. (2010). Delta opioid receptor on equine sperm cells: subcellular localization and involvement in sperm motility analyzed by computer assisted sperm analyzer (CASA). *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 8, 78.
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2013). NIH Public Access, 115(6), 1363–1381.
- Cahill, C. M., Holdridge, S. V., & Morinville, A. (2007). Trafficking of μ -opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(1), 23–31.
- Chen, Y., Kong, S., Tang, X., et al. (2014). Preimplantation Mouse Embryo Is a Target for Opioid Ligand-Receptor Signaling. *Biology of Reproduction*, 91(May), 1–9.
- Conti, M., Hsieh, M., Zamah, a. M., et al. (2012). Maturation and Ovulation. *Molecular Cell Endocrinol*, 356(0), 65–73.
- de Frutos C., López-Cardona A. P., Fonseca Balvís N., et al. (2016) telomeres determine telomere length in early embryos and offspring. *Reproduction*. 151(1):1-7
- Dell'Aquila, M. E., Albrizio, M., Guaricci, A. C., et al. (2008). Expression and localization of the μ -opioid receptor (MOR) in the equine cumulus–oocyte complex and its involvement in the seasonal regulation of oocyte meiotic competence. *Molecular Reproduction and Development*, 75, 1229–1246.
- Dell'Aquila, M. E., Casavola, V., Reshkin, S. J., et al. (2002). Effects of β -endorphin and Naloxone on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 63(April), 210–222.
- Eppig J. J., Schroeder A.C. & O'Brien M. J. (1992) Developmental capacity of mouse oocytes matured *in vitro*: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *Journal of reproduction and fertility*, 95(1),119-27.
- Firman, R. C., & Simmons, L. W. (2009). Sperm competition and the evolution of the sperm hook in house mice. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 2505–2511.
- Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1469, 197–235.
- Fu C.Y., Xia R.L., Zhang T.F., et al. (2014). Hemokinin-1(4-11)-induced analgesia selectively up-regulates δ -opioid receptor expression in mice. *PLoS One*, 9(2):e90446.
- Gosden, R., & Lee, B. (2010). Portrait of an oocyte: Our obscure origin. *Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 973–983.
- Halupczok, J., Kluba-Szyszka, A., Bidzińska-Speichert, B., et al. (2015). Ovarian hyperstimulation caused by gonadotroph pituitary adenoma - Review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24, 695–703.
- Iorga, a. I., Valentini, L., De Santis, T., et al. (2009). Expression of the μ opioid receptor and effects of the opioid antagonist naloxone on *in vitro* maturation of oocytes recovered from anoestrous bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 263–268.

- Jin, D. F., Muffly, K. E., Okulicz, W. C., et al. (1988). Estrous cycle- and pregnancy-related differences in expression of the proenkephalin and proopiomelanocortin genes in the ovary and uterus. *Endocrinology*, *122*(4), 1466–1471.
- Madishetti, S., Schneble, N., Kunig, C., et al. (2014). PI3K γ integrates cAMP and Akt signalling of the μ -opioid receptor. *British Journal of Pharmacology*, *171*, 3328–3337.
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., et al. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*, *9*(12), 1–12.
- Mehlmann, L. M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, *130*, 791–799.
- Mehlmann, L. M., Saeki, Y., Tanaka, S., et al. (2004). The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(December), 1947–50.
- Miller, D., Ostermeier, G. C., & Krawetz, S. a. (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends in Molecular Medicine*, *11*(4), 156–163.
- Nader S. (2010). Infertility and pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Minerva Endocrinologica*, *35*(4):211-25.
- Ostermeier, G. C., Goodrich, R. J., Diamond, M. P., et al. (2005). Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertility and Sterility*, *83*(6), 1687–1694.
- Paynton, B. V., Rempel, R., & Bachvarova, R. (1988). Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Developmental Biology*, *129*, 304–314.
- Petraglia, F., Facchinetti, F., M'Futa, K., et al. (1986). Endogenous opioid peptides in uterine fluid. *Fertility and Sterility*, *46*(2), 247–251.
- Petraglia, F., Segre, A., Facchinetti, F., et al. (1985). β -endorphin and met-enkephalin in peritoneal and ovarian follicular fluids of fertile and postmenopausal women. *Fertility and Sterility*, *44*(5), 615-621.
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. [Review] [79 refs]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, *145*, 27–37.
- Pincus, G., & Enzmann, E. V. (1934). Can Mammalian Eggs Undergo Normal Development in Vitro? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *20*, 121–2.
- Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida IA y FIV/ICSI 2013. www.registrosef.com
- Satouh, Y., Inoue, N., Ikawa, M., et al. (2012). Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *Journal of Cell Science*, *125*, 4985–90.
- Su, Y. Q., Denegre, J. M., Wigglesworth, K., et al. (2003). 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. *Developmental Biology*, *263*, 126–138.
- Sun, Q., & Nagai, T. (2003). Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and. *Journal of Reproduction and Development*, *49*(5).
- Tang, X., Chen, Y., Ran, H., et al. (2015). Systemic morphine treatment derails normal uterine receptivity, leading to embryo implantation failure in mice. *Biol Reprod*, *92*(April), 118.
- Timeva, T., Shterev, A., & Kyurkchiev, S. (2014). Recurrent implantation failure: The role of the endometrium. *Journal of Reproduction and Infertility*, *15*(4), 173–183.
- Turner, R. M. (2006). Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*, *18*, 25–38.
- Wang H.B., Zhao B., Zhong Y.Q., et al. (2010) Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. *107*(29):13117-22.
- Wang, S., Kou, Z., Jing, Z., et al. (2010). Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*, 17639–17644.