

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Enfermería

Departamento de Fisiología

**Implicación del receptor mu opioide (MOR) en la
maduración ovocitaria, la capacitación de espermatozoides
y el endometrio durante el ciclo menstrual**

Tesis Doctoral

Estibaliz Olabarrieta López

Directores

Ekaitz Agirregoitia Marcos

Naiara Agirregoitia Marcos

Leioa, 2020

Resumen

En las últimas décadas se ha observado que el sistema opioide está involucrado en la mayor parte de los procesos implicados en la reproducción. Esto provoca que una desregulación de cualquiera de sus componentes, tanto por agentes exógenos como por patologías propias, provoque a su vez una disfuncionalidad del aparato reproductor femenino o masculino. Por ello es importante conocer en qué procesos los opioides ejercen una regulación, así como las vías por las cuales la llevan a cabo. Así pues, el objetivo de esta tesis es contribuir al conocimiento del sistema opioide, en concreto del receptor mu opioide (MOR), en el sistema reproductor haciendo una aproximación tanto descriptiva como funcional en tres procesos clave de la reproducción: la maduración de los ovocitos, la capacitación de los espermatozoides y el ciclo endometrial.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que MOR está presente e involucrado en la regulación de la maduración ovocitaria, la capacitación de los espermatozoides y el ciclo endometrial. En cada uno de estos eventos, tanto la presencia/localización como la regulación ejercida por MOR varía, sugiriendo una regulación en su función dependiendo del proceso en el que actúe e incluso del momento del ciclo reproductivo. Estos resultados son de gran importancia debido a la amplia exposición a fármacos opiáceos frente a la que nos encontramos hoy en día. Aunque los efectos adversos más conocidos de estos sean a nivel de sistema nervioso central, según los resultados aquí expuestos los opiáceos podrían afectar al sistema reproductor alterando al propio sistema opioide endógeno, lo cual sería importante que se tuviera en cuenta en la clínica. Además, estos resultados abren nuevas vías de investigación en la prevención de la esterilidad, en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas para patologías en las que el sistema opioide esté relacionado y en la mejora de las técnicas de reproducción asistida actuales.

Sistema opioide, MOR, IVM, Capacitación espermática, Endometrio

Lista de Abreviaturas

AC: Adenilato ciclasa (<i>adenylate cyclase</i>)	GV: Vesícula germinal (<i>Germinal vesicle</i>)
ACTH: Hormona adrenocorticotrópica (<i>Adrenocorticotropic hormone</i>)	hCG: Gonadotropina coriónica humana (<i>Human chorionic gonadotropin</i>)
AI: Inseminación artificial (<i>Artificial insemination</i>)	HTF: Fluido tubárico humano (<i>Human tubal fluid</i>)
AKT: Proteína quinasa B	ICC: Inmunocitoquímica (<i>Inmunocytochemistry</i>)
APN: Alanina amonipeptidasa N (<i>alanine aminopeptidase N</i>)	ICSI: Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (<i>Intracytoplasmic sperm injection</i>)
cAMP: Adenosín monofosfato-3',5' cíclico (<i>cyclic adenosine 3',5'-monophosphate</i>)	IHC: Inmunohistoquímica (<i>Inmunohistochemistry</i>)
CDK1: Quinasa dependiente de ciclina 1 (<i>cyclin-dependent kinase 1</i>)	IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato (<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate</i>)
COC: Complejo cúmulo-ovocito (<i>cumulus-oocyte complex</i>)	IVF: Fecundación <i>in vitro</i> (<i>In vitro fertilization</i>)
CRH: hormona liberadora de corticotropina (<i>corticotropin-releasing hormone</i>)	IVM: Maduración <i>in vitro</i> (<i>In vitro maturation</i>)
CYCB: Subunidad reguladora ciclina B (<i>cyclin B subunit</i>)	JNK1-3: (<i>c-Jun N-terminal kinases 1-3</i>)
DAG: Diacilglicerol (<i>diacylglycerol</i>)	KOR: Receptor kappa opioide (<i>Kappa opioid receptor</i>)
DNA: Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)	KSOM: Medio de cultivo <i>in vitro</i> de embriones
DOR: Receptor delta opioide (<i>Delta opioid receptor</i>)	LH: Hormona luteinizante (<i>Luteinizing hormone</i>)
eCG: Gonadotropina sérica de yegua preñada (<i>Equine chorionic gonadotropin</i>)	LPH: β-lipotropina (<i>Lipotropic Hormone</i>)
EGF: Factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>)	MAPKs: Proteínas quinasas activadas por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
EOPs: Péptidos opioides endógenos (<i>endogenous opioid peptides</i>)	mRNA: Ácido ribonucleico mensajero (<i>Messenger Ribonucleic acid</i>)
ERK1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>)	MI: Metafase I del ciclo meiótico
FBS: Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)	MII: Metafase II del ciclo meiótico
FCS: Suero fetal bovino (<i>Fetal calf serum</i>)	M2: Medio de extracción de gametos
FGF: Factor de crecimiento fibroblástico (<i>fibroblast growth factor</i>)	MMPs: metaloproteasas de la matriz (<i>matrix metalloproteinases</i>)
FSH: Hormona foliculoestimulante (<i>follicle-stimulating hormone</i>)	MOR: Receptor mu opioide (<i>Mu opioid receptor</i>)
GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas (<i>gonadotropin-releasing hormone</i>)	MPF: Factor promotor de la maduración (<i>maturation promoting factor</i>)
GPCR: Receptores acoplados a proteínas G _{i/o} (<i>G protein-coupled receptors</i>)	MSH: Melanotropinas (<i>Melanocyte-stimulating hormone</i>)
	NEP: Endopeptidasa neutra (<i>neutral endopeptidase</i>)
	NGS: Suero de cabra (<i>Normal goat serum</i>)
	NO: Óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)

NOR: receptor opioide de Nociceptina (*nociceptin opioid receptor*)
OPRD1: Receptor delta opioide (*opioid peptide receptor delta 1*)
OPRK1: Receptor kappa opioide (*opioid peptide receptor kappa 1*)
OPRM1: Receptor mu opioide (*opioid peptide receptor mu 1*)
ORL1: Receptor opioide ORL1 (*opioid receptor-like 1*)
PBS: Buffer Fosfato Salino (*Phosphate-buffered saline*)
PCOS: Síndrome de ovario poliquístico (*Polycystic ovary syndrome*)
PCR: Reacción en cade de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)
PDYN: Prodinorfina (*prodynorphin*)
PENK: Proencefalina (*proenkephalin*)
PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)
PI3K/AKT: Vía de señalización fosfatidilinositol-3-quinasa

PKA: Proteína quinasa A (*protein kinase A*)
PLC: Fosfolipasa C (*phospholipase C*)
POMC: Proopiomelanocortina (*proopiomelanocortin*)
PVA: Polyvinyl alcohol
QRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (*quantitative polymerase chain reaction*)
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
Ser: Serina (*Serine*)
Thr: Treonina (*Threonine*)
Tyr: Tirosina (*Tyrosine*)
uNK: Natural killer uterine (*uterine natural killer cells*)
VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*)
WB: Western Blot (*Western Blot*)

Índice

Resumen	I
Lista de Abreviaturas	V
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sistema opioide	3
1.1.1 Perspectiva histórica	3
1.1.2 Sistema opioide endógeno	4
1.1.3 Receptores opioides	5
1.1.4 Principales funciones fisiológicas del sistema opioide	9
1.2 Reproducción	11
1.2.1 El ovocito	11
1.2.1.1 Regulación hormonal	12
1.2.1.2 Ciclo ovárico	12
1.2.1.3 Comunicación cúmulo-ovocito	15
1.2.1.4 Maduración ovocitaria	16
1.2.1.5 Vías de señalización importantes en la maduración del ovocito	18
1.2.1.6 La maduración <i>in vitro</i> de ovocitos en reproducción asistida	20
1.2.1.7 Implicación del sistema opioide en el ovocito	22
1.2.2 El espermatozoide	24
1.2.2.1 Regulación hormonal	25
1.2.2.2 Espermatogénesis	25
1.2.2.3 Maduración del espermatozoide en el epidídimo	28
1.2.2.4 Capacitación del espermatozoide	29
1.2.2.5 Implicación del sistema opioide en el gameto masculino	30
1.2.3 Fecundación	31
1.2.3.1 Implicación del sistema opioide en la fecundación	32
1.2.4 Desarrollo embrionario preimplantacional	33
1.2.4.1 Implicación del sistema opioide en el desarrollo embrionario temprano	35
1.2.5 Implantación	35
1.2.5.1 El endometrio	36
1.2.5.2 Endometrio y ciclo menstrual	38
1.2.5.3 Implicación del sistema opioide en la implantación	40
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1 Materiales	49
3.2 Métodos	58
3.2.1 Ratón	58
3.2.1.1 Cuidado y manejo	58
3.2.1.2 Cría	58
3.2.1.3 Producción de embriones <i>in vitro</i>	58
3.2.1.4 Fecundación <i>in vitro</i> (IVF)	60
3.2.1.5 Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	62
3.2.1.6 Evaluación del desarrollo embrionario preimplantacional	62
3.2.1.7 Obtención de muestras biológicas ratón	62
3.2.1.8 Extracción de RNA y síntesis de cDNA	63
3.2.1.9 PCR	63
3.2.1.10 Inmunocitoquímica	64

3.2.1.11 Análisis estadístico	65
3.2.2 Humano	66
3.2.2.1 Obtención de muestras biológicas humano	66
3.2.2.2 Extracción de RNA y síntesis de cDNA	66
3.2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	67
3.2.2.4 Preparación de la muestra y extracción de proteína	67
3.2.2.5 Cuantificación de proteína	68
3.2.2.6 Electroforesis (SDS-PAGE)	68
3.2.2.7 Transferencia e inmunodetección	69
3.2.2.8 Procesamiento de muestras de endometrio humano para IHC	69
3.2.2.9 Inmunohistoquímica	70
3.2.2.10 Técnica de análisis de imagen y HSCORE	71
3.2.2.11 Análisis estadístico	71
4 RESULTADOS	73
4.1 <i>Implication of mu opioid receptor in the in vitro maturation of oocytes and its effects on subsequent fertilization and embryo development in mice</i>	77
4.2 <i>Mu opioid receptor expression and localisation in murine spermatozoa and its role in IVF</i>	95
4.3 <i>Mu opioid receptor in the human endometrium: dynamics of its expression and localization during the menstrual cycle</i>	109
5 DISCUSIÓN GENERAL	127
6 CONCLUSIONES	141
7 BIBLIOGRAFÍA	145
8 ANEXO: Artículos derivados de la Tesis Doctoral	173

1 INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA OPIOIDE

El término opioide se aplica a toda sustancia de naturaleza peptídica, tanto endógena como sintética, capaz de producir efectos similares a los de la morfina (Rang *et al.* 2004). El opio es el extracto o resina obtenida de la adormidera (*Papaver Somniferum*; Figura 1) que ha sido utilizada con fines medicinales y sociales durante miles de años, ya que producía euforia y analgesia, entre otros efectos. Este extracto contiene aproximadamente un 20-25 % de alcaloides (dependiendo de la variedad de la planta) entre los que se encuentra la morfina, la codeína o la papaverina, entre otros. La morfina es el más predominante y al que históricamente se han atribuido los efectos más significativos del opio (Rang *et al.* 2004; Brook *et al.* 2017).

1.1.1 Perspectiva histórica

Desde hace tiempo se conocen las propiedades analgésicas y antidiarreicas del opio. Los griegos y los romanos fueron los primeros en describir la forma de extracción y preparación de esta sustancia (Alvarez y Farré 2005). Sin embargo, no fue hasta el año 1805, cuando el químico alemán Friedrich Sertürner, aisló por primera vez la morfina del opio y la denominó *morphium* en recuerdo a Morpheo, dios griego del sueño, debido a sus efectos (Brook *et al.* 2017).

A partir de ese momento, su uso aumentó de forma generalizada, y con ello el consumo con fines lúdicos. La morfina fue ampliamente utilizada en las guerras de los siglos XIX y XX debido al inicio del uso de la aguja hipodérmica, llevando al aumento de dependencias asociadas al consumo de ésta (Brook *et al.* 2017). En 1874, el químico inglés C.R. Wright produjo los primeros derivados de la morfina, entre los que se encontraba la diamorfina, también llamada heroína. La heroína es un derivado semisintético de la morfina al que se le añaden dos grupos acetilo. Esto hace que su liposolubilidad aumente y llegue con más facilidad a los tejidos, produciendo un efecto más potente que el de la morfina.

En 1898, la compañía Bayer comercializó la diamorfina debido a sus propiedades clínicas y no fue hasta 1920 cuando ésta se prohibió en la mayoría de los países debido a su alto poder de adicción (Alvarez y Farré 2005). Mientras, en 1902 se descubría por primera vez la estructura de la morfina (Figura 1). Desde entonces, se han desarrollado numerosos compuestos semisintéticos a partir de modificaciones de la molécula morfina o completamente sintéticos. Por ejemplo, el fentanilo es un compuesto totalmente sintético producido por primera vez en el año 1960 por Paul Janseen

(Armenian *et al.* 2018), con una gran lipofilidad que le permite una rápida difusión a través de las membranas, llegando a ser 50-100 veces más potente que la morfina (Armenian *et al.* 2018).

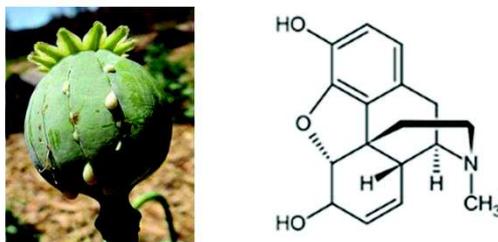


Figura 1. *Papaver Somniferum* y estructura de la morfina (Laux-Biehlmann *et al.* 2013).

El uso de todas estas sustancias, incluida la morfina, está ampliamente distribuido en la clínica por su poder analgésico y se conocen como fármacos morfínicos.

En 1975 se aislaron dos pentapéptidos en el encéfalo que al unirse a sus receptores poseían acciones farmacológicas similares a las producidas por la morfina. Esto demostró que los efectos producidos por los fármacos morfínicos derivaban de su capacidad para imitar a mediadores endógenos: los péptidos opioides (Rang *et al.* 2004). El estudio de éstos ha permitido comprender mejor el mecanismo de acción de los analgésicos opiáceos así como las funciones fisiológicas que llevan a cabo los péptidos opioides.

1.1.2 Sistema opioide endógeno

El sistema opioide endógeno está compuesto por los receptores opioides, sus ligandos endógenos (EOPs; *endogenous opioid peptides*) y las moléculas que participan en su síntesis y degradación.

Los EOPs están codificados por tres genes cuyos productos son la proopiomelanocortina, la proencefalina y la prodinorfina. Cada uno de estos precursores está sujeto a modificaciones post-traduccionales que resultan en la síntesis de múltiples péptidos activos. Estos péptidos comparten la secuencia N-terminal Tyr-Gly-Gly-Phe-(Met o Leu), característica de los opioides y pueden llegar a tener entre 5-32 aminoácidos (Mcnally y Akil 2002). Los péptidos opioides naturales de los mamíferos son la Met-enkefalina, Leu-enkefalina, β -endorfina, Dinorfina A, Dinorfina B, α -Neendorfina, Nociceptina y Endomorfina (Florez *et al.* 1998).

- **Proopiomelanocortina (POMC; proopiomelanocortin):** el principal péptido opioide codificado por este precursor es la β -endorfina. No obstante, también codifica otros péptidos no opioides como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH; *Adrenocorticotropic hormone*), las melanotropinas (MSH;

Melanocyte-stimulating hormone) o la β -lipotropina (LPH; *Lipotropic Hormone*) (Mcnally y Akil 2002).

- **Proencefalina (PENK; *proenkephalin*)**: este precursor codifica principalmente las encefalinas (met- o leu-encefalinas).

- **Prodinorfina (PDYN; *prodynorphin*)**: de este precursor se generan principalmente la dinorfina A, la dinorfina B y las neoendorfinas.

Tanto los opioides exógenos como los endógenos, llevan a cabo su función uniéndose a los receptores opioides y dependiendo de su estructura molecular, tendrán mayor afinidad por uno u otro y los efectos a nivel fisiológico pueden variar (Tabla 1).

1.1.3 Receptores opioides

Como ya se ha mencionado, los péptidos opioides llevan a cabo su función a través de receptores específicos de membrana. Estos receptores pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ (GPCRs; *G protein-coupled receptors*). Existen tres tipos denominados μ (OPRM1, *opioid peptide receptor mu 1* o MOR, *mu opioid receptor*, por su afinidad por la morfina), δ (OPRD1, *opioid peptide receptor delta* o DOR, *delta opioid receptor*, por la palabra “deferens” ya que fue identificado en el conducto deferente del ratón) y κ (OPRK1, *opioid peptide receptor kappa* o KOR, *kappa opioid receptor*, por la ketociclazocina). Posteriormente al hallazgo de los tres principales tipos de receptores opioides, se describió la existencia de un nuevo receptor de nociceptina (NOR, *nociceptin opioid receptor*), péptido similar a la dinorfina, que tenía gran parecido en estructura a los receptores opioides (Mollereau *et al.* 1994; Wick *et al.* 1994). Sin embargo, los ligandos que se unen a este receptor no son los mismos que a los otros tres principales receptores de opioides (Shang y Filizola 2015). Los receptores opioides están compuestos por siete hélices transmembrana conectadas por tres bucles extracelulares y tres intracelulares (Manglik *et al.* 2012). Tienen un dominio N-extracelular y otro intracelular C-terminal (Figura 2). El extremo N-terminal puede estar glicosilado en varios sitios mientras que el extremo C-terminal se une al palmitoil (Mcnally y Akil 2002). Entre ellos, la secuencia de aminoácidos es muy parecida y comparten hasta un 60-70% de homología (Minami y Satoh 1995).

Tabla 1. Clasificación de los principales péptidos opioides endógenos y exógenos en función de su afinidad por los receptores MOR, DOR y KOR (Modificado de Rang *et al.* 2004; Alvarez y Farré 2005).

	MOR	DOR	KOR
Péptidos opioides endógenos			
<i>B-endorfina</i>	+++	++	+
<i>Leu-encefalina</i>	+	+++	-
<i>Met-encefalina</i>	++	+++	-
<i>Dinorfina A</i>	+++	++	+++
<i>Dinorfina B</i>	+++	+++	++
<i>α-Neendorfina</i>	+++	+++	+++
Opioides exógenos			
Acción agonista			
<i>Morfina</i>	+++	+	+
<i>Codeína</i>	+++	+	+
<i>Metadona</i>	+++	-	-
<i>Petidina</i>	++	+	+
<i>Fentanilo y análogos</i>	+++	+	-
Acción antagonista			
<i>Naloxona</i>	+++	+	++
<i>Naltrindol</i>	-	+++	-
<i>Nor-Binaltorfimina</i>	+	+	+++

- **Receptor mu opioide (μ /OPRM1/MOR):** Se encuentra localizado principalmente en el sistema nervioso central; en el córtex, en el caudado-putamen y en el núcleo accumbens (Waldhoer *et al.* 2004; Valentino y Volkow 2018). Más específicamente, se ha descrito en las dendritas y en los cuerpos neuronales, por lo que se dedujo que podría tener una función post-sináptica (Eldredge *et al.* 1995). En el tálamo y el hipotálamo el nivel del mRNA para este receptor también es alto (Mansour *et al.* 1994). Sin embargo, los receptores opioides no solo se han descrito a nivel de sistema nervioso. MOR también se ha descrito en tejidos periféricos tales como conducto deferente, riñón o intestino (Bodnar 2013).

- **Receptor delta opioide (δ /OPRD1/DOR):** En el sistema nervioso central se observa una gran densidad de este receptor tanto en el córtex como en el caudado-putamen (Valentino y Volkow 2018). Se localizan mayoritariamente en los axones, lo que sugiere que tienen una acción

presináptica (Elde *et al.* 1995). En los tejidos periféricos, DOR se expresa en los linfocitos, en los intestinos, en las glándulas adrenales, etc. (Bodnar 2013).

- **Receptor kappa opioide (κ /OPRK1/KOR):** Estos receptores se observan en la amígdala y en el claustró (Pilapil *et al.* 1987), estando el mRNA presente en el córtex, tálamo, hipotálamo y núcleo accumbens, entre otros (Valentino y Volkow 2018). Al igual que MOR, se localiza en las dendritas y en los cuerpos celulares sugiriendo una acción postsináptica (Elde *et al.* 1995). En los tejidos periféricos, se expresan en los intestinos y en las células del sistema inmune, entre otros (Rivière 2004).

- **Receptor opioide ORL1 (OPRL1/NOR):** Aunque este receptor ha sido descrito en el sistema nervioso central, no está presente en el cerebelo o en el caudado-putamen. En los tejidos periféricos, se expresa en el músculo liso, en las gónadas periféricas y en el sistema inmunitario y se cree que está implicado en varios procesos biológicos como la percepción sensorial, procesos de memoria y / o comportamiento emocional, entre otros (Mollereau y Mouledous 2000; Bodnar 2013).

Al unirse los péptidos opioides a los receptores específicos de membrana, las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ de la proteína G se disocian una de la otra y actúan sobre diferentes vías de señalización intracelulares. La subunidad $G\alpha$ actúa inhibiendo la adenilato ciclasa (AC; *adenylate cyclase*) y de esta forma se reduce el contenido intracelular de adenosín monofosfato-3',5' cíclico (cAMP; *cyclic adenosine 3',5'-monophosphate*) y, en consecuencia, la actividad de la proteína quinasa A (PKA; *protein kinase A*) (Waldhoer *et al.* 2004) (Figura 2). Además de actuar sobre la AC, los receptores actúan también sobre los canales iónicos a través del acoplamiento directo de la proteína G al canal. Así, se facilita la apertura de los canales de potasio por la acción de la subunidad $G\alpha$, provocando una hiperpolarización de la membrana, y se inhiben los canales de calcio dependientes de voltaje, por la unión de la subunidad $G\beta\gamma$ al canal (Stein 2016) (Figura 2). $G\alpha$ también activa a la fosfolipasa C (PLC; *phospholipase C*) y a la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs; *mitogen-activated protein kinases*). La PLC activa hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2; *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) dando lugar a inositol 1,4,5-trifosfato (IP3; *Inositol 1,4,5-trisphosphate*) y diacilglicerol (DAG; *diacylglycerol*), lo cual conlleva la movilización del calcio (Ca^{2+}) intracelular (Listos *et al.* 2019). Por otro lado, la vía de las MAPKs comprende una serie de cascadas de señalización que incluye distintas respuestas celulares, como pueden ser la diferenciación, la

apoptosis, la proliferación celular, etc. (Al-Hasani y Bruchas 2011). La familia de las MAPKs está compuesta de 12 a 15 productos génicos, entre los que destacan las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2; *extracellular signal-regulated kinases 1/2*), JNK1-3 (*c-Jun N-terminal kinases 1-3*), y p38 (α , β , γ , δ). Las más comunes inducidas por los opioides son las quinasas ERK1/2, que se ha demostrado que son fosforiladas por la acción de agonistas de MOR o DOR (Al-Hasani y Bruchas 2011). Entre las múltiples quinasas activadas por la cascada de fosforilación de las ERK1/2, los opioides activan a su vez la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K/AKT), que está relacionada con numerosas funciones fisiológicas entre las que se encuentra, por ejemplo, la proliferación celular. 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 (Madishetti *et al.* 2014; López-Cardona *et al.* 2016).

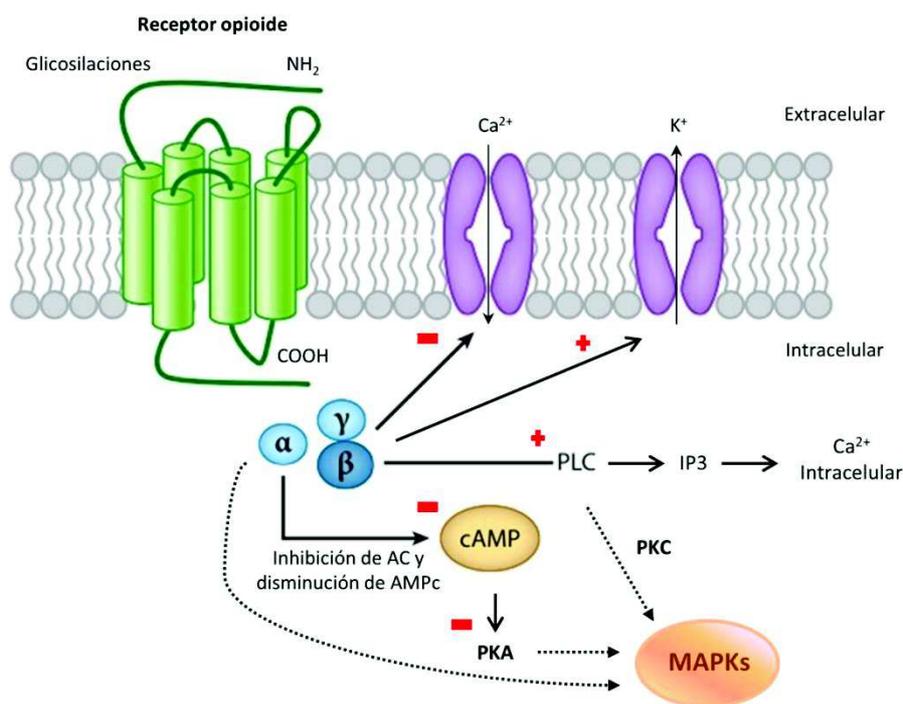


Figura 2. Resumen de señalización inducida por opioides. Al unirse el agonista al receptor opioide se inhibe la adenilato ciclasa (AC), provocando una disminución del contenido de cAMP e inhibiendo la proteína quinasa A (PKA). A su vez, se induce la apertura de los canales de K⁺ y se produce una hiperpolarización de la membrana. Los canales de Ca²⁺ son inhibidos y se induce la actividad de la fosfolipasa C (PLC). Todo esto provoca la movilización de Ca²⁺ intracelular y la estimulación de las vías MAPKs (Modificado de Stein 2016).

Los cambios que se dan en la membrana debido a la acción de los opioides reducen tanto la excitabilidad de la neurona (inhibición de la actividad bioeléctrica) como la liberación de neurotransmisores, provocando una inhibición celular. Cuando se da una exposición crónica a opiáceos, los receptores se fosforilan y esto provoca la unión de la molécula arrestina al dominio C-terminal del receptor, induciéndose la desensibilización e internalización de éste (Al-Hasani y Bruchas 2011; Listos *et al.* 2019).

La inactivación de los péptidos opioides se da mayoritariamente debido a la degradación metabólica llevada a cabo por enzimas denominadas peptidasas. Al romper los péptidos biológicamente activos, se generan fragmentos inactivos. La degradación de las encefalinas (secuencia repetida en casi todos los opioides endógenos) está catalizada por dos enzimas: la alanina aminopeptidasa N (APN; *alanine aminopeptidase N*), que rompe el enlace Tyr-Gly de la encefalina (Waksman *et al.* 1985), y la endopeptidasa neutra (NEP; *neutral endopeptidase*), que rompe el enlace Gly-Phe (Relton *et al.* 1983).

1.1.4 Principales funciones fisiológicas del sistema opioide

Históricamente, se ha relacionado al sistema opioide con sus efectos en el sistema nervioso central, siendo éstos los más estudiados por su aplicación en la clínica. Sin embargo, el sistema opioide también actúa a nivel periférico, como por ejemplo en la modulación de las funciones gastrointestinales, en el sistema endocrino o en la regulación de la función reproductiva, entre otros (Alvarez y Farré 2005; Bodnar 2013). En cualquiera de los casos, la respuesta desencadenada por la acción de los opioides y su intensidad depende del agonista y del receptor al que se una (Fabbri *et al.* 1989). En la tabla 2 se recogen algunos de los efectos fisiológicos y los receptores que se activan para poder llevar a cabo cada respuesta.

Los efectos farmacológicos fundamentales de la morfina y la mayoría de sus derivados analgésicos, así como algunos de los efectos adversos (depresión respiratoria, dependencia, etc.) dependen de MOR (Tabla 2) (Rang *et al.* 2004; Williams *et al.* 2013). La dependencia producida por estos fármacos y el aumento de las prescripciones en la clínica durante las últimas décadas han llevado al estudio del desarrollo de nuevos fármacos que actúen vía otros receptores (KOR o DOR) con el fin de conseguir el mismo efecto de analgesia sin crear dependencia.

Tabla 2. Clasificación de los principales efectos fisiológicos causados por fármacos opiáceos según el receptor por el cual llevan a cabo estas funciones (Modificado de Rang *et al.* 2004).

	MOR	DOR	KOR
Analgesia			
<i>Supraespinal</i>	+++	-	-
<i>Raquídea</i>	++	++	+
<i>Periférica</i>	++	-	++
Depresión respiratoria	+++	++	-
Miosis	++	-	+
Reducción de la motilidad digestiva	++	++	+
Euforia	+++	-	-
Disforia	-	-	+++
Sedación	++	-	++
Dependencia física	+++	-	+

Sin embargo, aunque los receptores de opioides han sido descritos mayoritariamente en el sistema nervioso central, y la mayor parte de su estudio para la clínica se ha centrado en ello debido a la analgesia resultante de su uso, los EOPs están involucrados en otras funciones fisiológicas, ya que se ha observado la expresión de los receptores opioides en otros órganos como el páncreas, el hígado, el intestino y el sistema reproductor, como ya se ha mencionado anteriormente. De aquí la importancia de estudiar su función en el resto de los sistemas, ya que el amplio uso en la clínica no solo podría estar causando los efectos adversos descritos si no que podría estar alterando otros sistemas.

Uno de los sistemas en el que se ha visto que el sistema opioide está presente y que ejerce numerosas funciones es el reproductor. El interés en esta área aumentó tras observar una disminución de la fertilidad en consumidores de opiáceos y, a partir de entonces, se han realizado numerosos estudios para describir la función de los opioides en este sistema. En el siguiente apartado describiremos los diferentes procesos que se dan a lo largo de la reproducción animal y la implicación, descrita hasta la fecha, que el sistema opioide tiene en cada una de estas etapas.

1.2 REPRODUCCIÓN

La reproducción sexual en mamíferos se caracteriza por la unión del óvulo con el espermatozoide (fecundación) para dar lugar al cigoto, su transporte y desarrollo temprano a través del oviducto hasta el lugar de implantación (el endometrio) y el posterior desarrollo del embrión hasta llegar al lactante viable (Faller y Schunke 2006). A continuación, describiremos los procesos desde la producción de los gametos hasta la implantación del embrión.

1.2.1 El ovocito

La meiosis es un tipo de división celular que se da en las células germinales para generar los gametos masculinos y femeninos, de forma que se reduce el número de cromosomas de un número diploide a un número haploide y además se da la recombinación genética entre DNA materno y paterno. Este proceso, en los ovocitos, se denomina ovogénesis. Desde el nacimiento, todos los ovocitos han comenzado la profase de la primera meiosis (Profase I). Sin embargo, en lugar de continuar con la meiosis, entran en un estado de reposo que se mantiene hasta la pubertad, gracias a una serie de eventos inhibitorios de este proceso (Sadler 2004).

La edad reproductiva de la mujer está influenciada por el número de folículos primordiales que posea. Tras el nacimiento, una mujer posee aproximadamente 300.000 folículos primordiales. Sin embargo, esta reserva va disminuyendo durante el crecimiento hasta la pubertad, donde se alcanzan los 200.000 (McGee y Hsueh 2000). A partir de entonces, una mujer sana ovulará unos 400 ovocitos a lo largo de su edad fértil en ciclos de aproximadamente 28 días (Lonergan y Fair 2016). En otros mamíferos, como el ratón, ocurre lo mismo sólo que los ciclos son más cortos (aproximadamente 5 días) y en cada uno de ellos se ovulan 8-12 ovocitos (Behringer 2014). El ovocito maduro es aquel ovocito ovulado que está preparado a nivel celular para la fecundación y que es capaz de generar un embrión viable para el desarrollo embrionario y la implantación. Para poder llegar a este punto, el ovocito necesita salir del estado latente en el que se encuentra desde el nacimiento y pasar por un proceso de maduración, tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear (reanudación de la meiosis), que le permitirá adquirir las características necesarias para convertirse en un ovocito competente (maduración ovocitaria). Este proceso ocurre dentro del ovario, en los folículos, durante un proceso llamado foliculogénesis, y está regulado por el ciclo ovárico.

1.2.1.1 Regulación hormonal

El sistema hormonal femenino (no sólo humano, si no el de la mayoría de los mamíferos) está compuesto por tres grupos de hormonas cuya interacción compone el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La primera de ellas es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH; *gonadotropin-releasing hormone*), la cual es secretada por el hipotálamo y se encarga de inducir la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH; *follicle-stimulating hormone*) y la hormona luteinizante (LH; *luteinizing hormone*) en la hipófisis, las cuales conforman el segundo grupo del sistema hormonal femenino (hormonas adenohipofisarias). El tercer grupo lo componen las hormonas ováricas (estrógenos, progesterona e inhibina) que son secretadas por el ovario en respuesta a las hormonas adenohipofisarias. La secreción de estas hormonas, como veremos más adelante, varía según la fase del ciclo reproductivo, activándose e inhibiéndose unas a otras formando un eje controlado (Hill *et al.* 2006).

1.2.1.2 Ciclo ovárico

El ciclo ovárico está determinado por los cambios cíclicos de las hormonas FSH y LH secretadas por la adenohipófisis. Se pueden distinguir principalmente tres fases: el desarrollo de los folículos o foliculogénesis, que concluye con la maduración ovocitaria, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. En cada ciclo se da el crecimiento de varios folículos, aunque sólo uno llegará a convertirse en folículo maduro y desprenderá el ovocito. A continuación, se explica brevemente cada una de estas etapas.

Foliculogénesis

La fase folicular o foliculogénesis consiste en el desarrollo secuencial de varios folículos primordiales del ovario. Esta fase acaba con la ovulación o con la degeneración del folículo y el ovocito que contiene en un proceso llamado atresia. La foliculogénesis está caracterizada por un aumento progresivo de células de la granulosa productoras de estrógeno, la formación de una capa compuesta por glucoproteínas de la zona pelúcida y el desarrollo de la teca interna vascularizada. 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. En humanos, se calcula que el proceso completo desde el estadio inicial de folículo primordial a folículo preovulatorio requiere más de 6 meses. En roedores, en cambio, la duración de la foliculogénesis es mucho más corta. El tiempo requerido entre el reclutamiento de folículos

primordiales y su crecimiento hasta folículos preovulatorios es aproximadamente de 30 días (McGee y Hsueh 2000).

Los folículos primordiales están formados por un ovocito primario (detenido en la profase I desde el nacimiento) rodeado de una capa de células epiteliales planas pre-granulosas. Periódicamente, pero de forma regular y continua, un grupo de folículos primordiales es estimulado por factores intraováricos y entran en crecimiento (Bajo Arenas y Coroleu Lletget 2009). Esta fase es independiente de las hormonas adenohipofisarias (Gosden y Lee 2010). El ovocito comienza a crecer y las células que lo rodean proliferan y pasan a ser cúbicas, formando un epitelio estratificado de células de la granulosa. El folículo pasa a denominarse folículo primario (Figura 4). Las células de la granulosa y el ovocito secretan glucoproteínas que forman la zona pelúcida (Sadler 2004; Carlson 2014).

El crecimiento de este folículo continúa y cuando se forman varias capas de células de la granulosa pasa a denominarse folículo secundario (Carlson 2014). Seguidamente, comienzan a formarse la teca folicular interna y externa, que tiene una importante función en la proliferación de vasos sanguíneos en esta capa (Figura 4).

En ese momento, el folículo ya es sensible a las concentraciones oscilantes de FSH, ya que las células de la granulosa poseen receptores de esta hormona en la membrana (Bajo Arenas y Coroleu Lletget 2009). Al unirse FSH a las células de la granulosa al inicio del ciclo ovárico, éstas van a comenzar a sintetizar estrógenos. Además, éstas van a formar espacios que se llenan de líquido formándose así la cavidad antral, proceso totalmente dependiente de FSH (Bajo Arenas y Coroleu Lletget 2009; Carlson 2014). En este momento el folículo pasa a llamarse folículo terciario o de Graaf (Figura 4). Las células de la teca interna contienen receptores de LH, que van a inducir una mayor sensibilidad del folículo a las concentraciones circulantes de esta hormona, que van aumentando poco a poco y por tanto va a ser imprescindible para la maduración del ovocito y la ovulación.

Cuando los valores de estrógenos alcanzan su máximo, la FSH disminuye. Al disminuir esta hormona, los folículos en desarrollo entran en competencia y sólo aquel que posee más receptores para FSH consigue avanzar al estadio de folículo pre-ovulatorio o de Graaf, mientras que el resto se vuelven atrésicos (Carlson 2014). Por otro lado, la concentración de LH sigue aumentando hasta alcanzar un pico máximo pre-ovulatorio (Figura 3).

Este pico de LH induce la reanudación de la primera meiosis en el ovocito, llevando a la producción de dos células hijas ($23, 2n$). Una de ellas, el ovocito secundario, recibe la mayor parte del citoplasma mientras que la otra, pasa a formar el corpúsculo polar. El ovocito entra en la segunda meiosis y en el momento en que se encuentra en la metafase, se da la ovulación y el ovocito es expulsado del folículo (Sadler 2004; Carlson 2014).

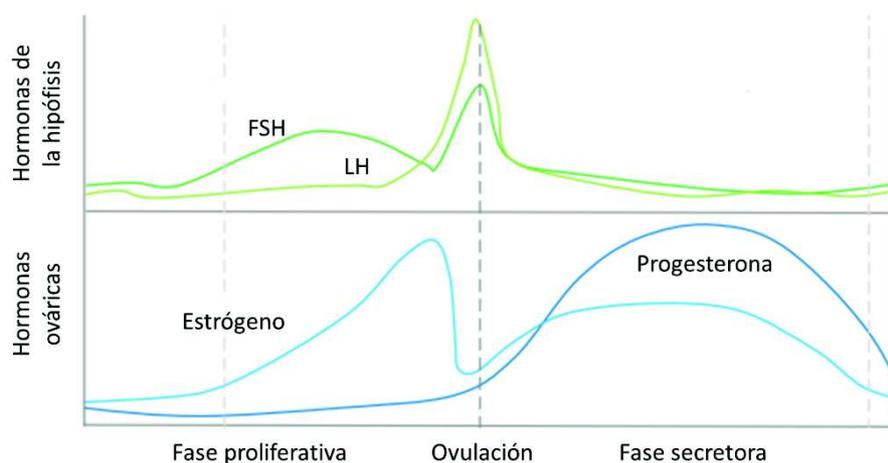


Figura 3. Representación de la fluctuación de hormonas hipofisiarias y ováricas durante el ciclo ovárico (Modificado de Mendes *et al.* 2019).

Ovulación y formación del cuerpo lúteo

La ovulación es desencadenada por el pico de LH y suele producirse de 12 a 24 horas después de éste. El ovocito secundario expulsado está rodeado por la zona pelúcida y varias capas de células foliculares que forman la corona radiada (Moore y Persaud 2008), formando así el complejo cúmulo-ovocito (COC; *cumulus-oocyte complex*). La concentración de estrógenos disminuye durante la fase postovulatoria.

Poco después de la ovulación, el folículo ovárico desde donde se ha expulsado el ovocito se colapsa y se pliega. Así se forma el cuerpo lúteo, que va a tener un papel importante en la implantación, ya que segrega progesterona y algunos estrógenos que van a permitir que el endometrio se prepare para la recepción del embrión. Durante esta fase, las concentraciones de FSH y LH se mantienen bajas. A final del ciclo, en el caso de que no haya fecundación, el cuerpo lúteo se degenera. Las concentraciones de progesterona y estrógenos caen y comienza de nuevo a subir la concentración de FSH por acción de GnRH, dando comienzo de nuevo al ciclo ovárico (Sadler 2004; Carlson 2014).

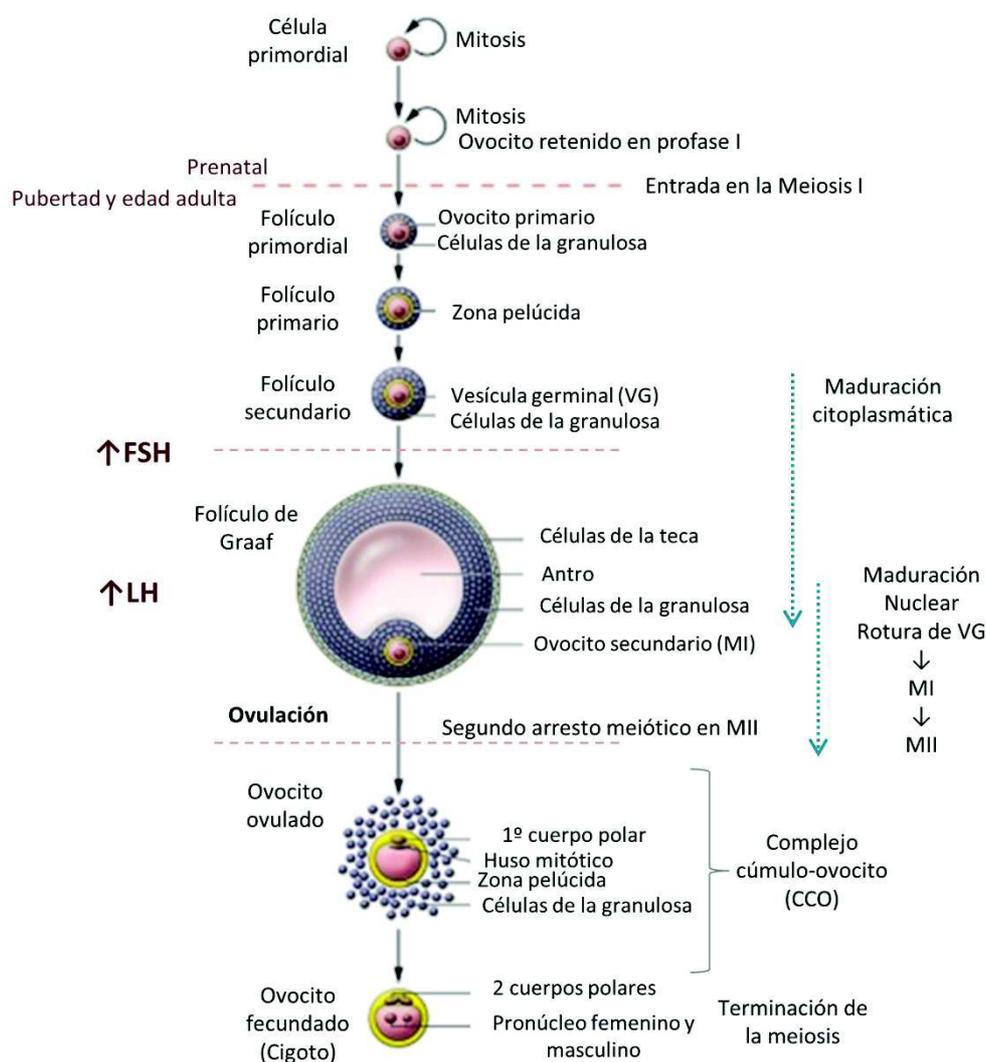


Figura 4. Resumen de los principales procesos y etapas de la foliculogénesis y la ovogénesis (Modificado de Gosden y Lee 2010).

1.2.1.3 Comunicación cúmulo-ovocito

Durante la foliculogénesis, el desarrollo del ovocito depende de la relación con las células del cúmulo o células de la granulosa. Esta relación aporta los nutrientes, metabolitos y moléculas de bajo peso molecular esenciales para el crecimiento del ovocito. Se inicia una regulación continua de tipo paracrino en la que se secretan al espacio intercelular productos tanto del ovocito como de las granulosa, siendo una relación bidireccional (Albertini *et al.* 2001; Kidder y Vanderhyden 2010). Las células de la granulosa se encuentran unidas entre sí mediante prolongaciones citoplasmáticas que también se unen al oolema del ovocito, de tal manera que están siempre comunicados mediante uniones gap. Estas uniones intercelulares son especialmente importantes ya que su desaparición al

final de la foliculogénesis va a provocar el reinicio de la meiosis y la progresión a la metafase II (MII) para completar el proceso de maduración ovocitaria (Veitch *et al.* 2004).

Las granulosas proporcionan nucleósidos, aminoácidos y fosfolípidos manteniendo la estabilidad en el mRNA de los ovocitos (Hunter 2000). El ovocito secreta factores que regulan la expansión y la esteroidogénesis del cúmulo, induciendo el mantenimiento de la producción de estradiol y la inhibición de la producción de progesterona. También induce la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y suprime la expresión del mRNA de los receptores de LH en las granulosas. Además, favorece la ovulación del complejo cúmulo-ovocito y la fecundación mediante la producción de ácido hialurónico que va a estimular la expansión del cúmulo (Clarke 2018).

1.2.1.4 Maduración ovocitaria

Como se ha explicado previamente, durante la foliculogénesis se da el proceso de maduración ovocitaria, en el cual el ovocito pasa del estado de bloqueo en la profase I al estado maduro preparado para la fecundación. Para que esto sea posible, el ovocito sufre cambios a nivel de citoplasma y a nivel nuclear, por lo que se pueden diferenciar dos procesos: maduración citoplasmática y maduración nuclear (Mehta 2014). Esta última está caracterizada por el reinicio de la meiosis. Los ovocitos arrestados en profase I poseen el material genético rodeado por la envoltura nuclear, formando una vesícula germinal que va a dar nombre a los ovocitos en este estadio o “inmaduros” (GV; *germinal vesicle*). Para que se dé la reanudación de la meiosis se debe producir la rotura de la vesícula germinal, lo cual se ha convertido en un indicador de este proceso. En este apartado se van a explicar de forma más detallada los eventos que se producen durante la maduración del ovocito.

Maduración citoplasmática

Desde que comienza el crecimiento del folículo primordial y, sobre todo, después de darse el aumento de LH, se desencadenan cambios a nivel citoplasmático en el ovocito. Comienza a aumentar levemente la producción de progesterona por parte de las granulosas. Además, el ácido hialurónico que ha hecho que fueran creciendo las células de la granulosa, provoca la desaparición de las uniones gap entre el ovocito y las células del cúmulo. Como consecuencia de esta pérdida, aumenta el transporte de membrana y se produce una reorganización de los orgánulos citoplasmáticos en el ovocito. Comienza la transcripción del mRNA almacenado, produciéndose algunas proteínas que juegan un papel crítico en la progresión del ciclo meiótico ya que van a ser

necesarias para la rotura de la membrana nuclear, antes mencionada (Clarke 2018). Las proteínas sintetizadas son usadas para la propia diferenciación del ovocito, para la comunicación con las células de granulosa, para la formación de la zona pelúcida, para regular la penetración del espermatozoide durante la fecundación y para el desarrollo temprano del embrión (Picton *et al.* 1998; Trounson *et al.* 2001). El ovocito expresa activamente alrededor de 900 genes (Merton *et al.* 2003), cuya transcripción se detiene en el momento en que se rompe la GV (Christians *et al.* 1999; Gosden y Lee 2010).

También se da una relocalización de las mitocondrias a lo largo del proceso de maduración que antes de la rotura de la membrana nuclear se encontraban uniformemente distribuidas por el citoplasma con una baja actividad (Nishi *et al.* 2003; Cummins 2004; Sowińska *et al.* 2017).

Durante la maduración citoplasmática también se adquiere la capacidad de liberar gránulos corticales que contienen enzimas hidrolíticas, lo cual va a ser crucial para la fecundación ya que evitará la poliespermia (Bhakta *et al.* 2019). Estos gránulos migran hacia la periferia conforme madura el ovocito y se forma una monocapa irregular en la membrana (Liu 2011). Este proceso ocurre como consecuencia de las oscilaciones de iones cálcicos liberados desde el retículo endoplasmático hacia el citosol, que a su vez también media la formación de los pronúcleos y el reinicio de la meiosis (Wakai *et al.* 2013). Por último, el aparato de Golgi migra hacia la membrana y se encargará de la producción de glicoproteínas a la zona pelúcida (Picton *et al.* 1998).

Maduración nuclear

Se ha observado que el mecanismo por el cual la meiosis se encuentra paralizada es el mantenimiento elevado de cAMP dentro del ovocito (Gilchrist *et al.* 2016), el cual es provocado por la acción de las granulosas ya que son las encargadas de transferir ese cAMP al interior del ovocito (Mehlmann 2005).

La reanudación de la meiosis es impulsada por la elevación de LH preovulatoria, produciéndose una caída en la concentración de cAMP intraovocitario, lo que provoca la progresión de la meiosis (Mehlmann 2005). Los ovocitos no contienen receptores de LH, es por esto que se supo que las células de las granulosas más externas, las cuales son receptoras de LH, tenían una función importante en la reanudación meiótica (Lawrence *et al.* 1980). Además, teniendo en cuenta que las granulosas son las encargadas de mantener los niveles altos de cAMP en el ovocito, se llegó a la

conclusión de que para que el cAMP disminuyera y la meiosis progresara era necesario que las células de la granulosa perdieran la unión con el ovocito (Moor *et al.* 1980; Sun y Nagai 2003). Esta pérdida de uniones intercelulares es inducida por la LH que actúa inhibiendo la proteína de unión ovárica conexina-43 (Cx43). Sin embargo, también participan otros elementos como el Ca^{2+} o IP_3 . La elevación de LH induce un aumento en los niveles de Ca^{2+} e IP_3 en las células del cúmulo que se transmite hasta el ovocito provocando la hidrólisis de cAMP (Eppig *et al.* 1993).

Por otro lado, aunque el cAMP impulsa la reanudación de la meiosis, el factor promotor de la maduración (MPF; *maturation promoting factor*) es el responsable de los cambios intraocitarios que regulan esta división (Adhikari y Liu 2014). El MPF está compuesto por una quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1; *cyclin-dependent kinase 1*), que se mantiene constante a lo largo del ciclo, y por una subunidad reguladora ciclina B (CYCB; *cyclin B subunit*), que se sintetiza periódicamente (Trounson *et al.* 2001). Para que este complejo se active, CDK1 debe defosforilarse (Mehlmann 2005), lo que provoca la entrada del ovocito en metafase I (MI). La entrada en MI produce la rotura de la GV mediante la desintegración de la envoltura nuclear, y la condensación de los cromosomas (Carlson 2014). Este se considera el primer paso de la maduración nuclear.

Tras este primer paso, la actividad del MPF disminuye. Según avanza el proceso de maduración, el complejo vuelve a activarse y provoca el paso del ovocito a MII justo antes de la ovulación, estado (segundo arresto meiótico) en el que se mantendrá hasta la fecundación, cuando la actividad del MPF vuelve a disminuir (Adhikari y Liu 2014). Así pues, para reanudar nuevamente la meiosis II, alcanzar el estado haploide y expulsar el segundo cuerpo polar se requiere el contacto entre el espermatozoide y el ovocito (Sun y Nagai 2003; Rodriguez y Farin 2004).

1.2.1.5 Vías de señalización importantes en la maduración del ovocito

Se han identificado alrededor de 15 GPCRs que se expresan en ovocitos (Mehlmann *et al.* 2004). Por ejemplo, GPR3 y GPR12, se ha visto que están activos y que mantendrían el arresto meiótico (Mehlmann *et al.* 2004; Hinckley *et al.* 2005).

Las hormonas FSH y LH también forman parte de la familia GPCRs (Themmen y Huhtaniemi 2000; Ascoli *et al.* 2002) y regulan la señalización después de su activación por el desacoplamiento de la membrana mediado por β arrestinas (Lowther *et al.* 2011). En ovocitos, uno de los principales eventos asociados con la estimulación de los receptores GPCRs de LH y FSH es la activación de la vía

de las MAPKs (Sela-Abramovich *et al.* 2005). Esta vía se ha visto implicada en la regulación de la esteroidogénesis, en la proliferación de las células de la granulosa, en el reinicio de la meiosis, en la reorganización de los microtúbulos y en el mantenimiento de la MII (Su *et al.* 2007; Schindler 2011).

Como se ha mencionado en el apartado 1.1.3, las proteínas ERK1/2 son unas de las quinasas mejor caracterizadas perteneciente a la superfamilia de las MAPKs (Zhang y Liu 2002) y se activan por la fosforilación de residuos de tirosina (Tyr204/187) y treonina (Thr202/185) (Crews y Erikson 1992; Roskoski 2012). Éstas han sido aisladas en ovocitos durante la maduración (Duranthon y Renard 2001) y se ha visto que tienen una importante función en la meiosis (Zhang *et al.* 2015). ERK1/2 son importantes ya que afectan al establecimiento del huso mitótico y la organización de los microtúbulos en ovocitos (Song *et al.* 2018). Durante la meiosis, ERK1/2 son activadas tras la rotura de la GV, en ratones, por ejemplo, 1-2 horas después de que se dé este proceso (Sun *et al.* 1999; Fan y Sun 2004), y alcanzan un pico máximo de expresión en MII, manteniendo el segundo arresto meiótico en esta fase (Tong *et al.* 2003). También se ha visto que su inhibición altera negativamente la activación genómica del cigoto y la fecundación. Por otra parte, los ovocitos provenientes de ratones donde se ha suprimido la expresión de ERK1/2 no reanudan la meiosis a pesar de ser estimulados con hormonas (Fan *et al.* 2009).

La proteína quinasa B/AKT es una quinasa serina/treonina (Ser/Thr) que actúa como intermediario de la vía de señalización fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K/AKT) (Song *et al.* 2018). AKT se activa mediante la fosforilación en dos residuos: residuo de treonina (Thr308) y residuo de serina (Ser473). La máxima activación de AKT requiere la fosforilación de Ser473 (Manning y Toker 2017). En ovocitos de mamíferos, AKT está relacionada con el reinicio de la meiosis y se ha detectado tanto en los ovocitos como en las células del cúmulo durante la maduración (Kalous *et al.* 2006). En el ovario, se ha observado que la activación de AKT por la FSH en las células de la granulosa contribuye a la regulación de la apoptosis, a la diferenciación celular y a la síntesis de ácido hialurónico (Cecconi *et al.* 2010, 2012). Aunque AKT no es necesaria para la rotura de la vesícula germinal, sí que es crucial para el paso de MI a MII durante la meiosis (Shimada y Terada 2001; Tomek y Smiljakovic 2005) así como para la expulsión del segundo corpúsculo polar en la MII (Cecconi *et al.* 2010). Por último, se ha demostrado que varios problemas de fertilidad en humanos están asociados a una desregulación de AKT, como por ejemplo el síndrome de ovario poliquístico o el cáncer de ovario (Cecconi *et al.* 2012).

1.2.1.6 La maduración *in vitro* de ovocitos en reproducción asistida

En los últimos años se ha estimado que aproximadamente el 10-15 % de parejas en edad reproductiva (entre 15 y 44 años) son estériles (Sociedad Española de Fertilidad (SEF) 2012). Según la Organización Mundial de la Salud, la esterilidad es la incapacidad para conseguir el embarazo tras 12 meses de relaciones sexuales regulares con fines reproductivos. Las causas pueden ser de origen femenino, masculino, mixto o desconocido. Entre las causas femeninas más comunes se encuentran el factor tubo-peritoneal (lesiones en las trompas de Falopio), la endometriosis, el síndrome de ovario poliquístico (PCOS; *Polycystic ovary syndrome*) y la edad avanzada. Esta última es una de las principales hoy en día y conlleva una disminución de la calidad de los gametos y tejidos adyacentes (Jose-Miller *et al.* 2007). A partir de los 35 años el potencial reproductivo se ve afectado y, a partir de los 40, la posibilidad de embarazo disminuye considerablemente. En el caso del factor masculino, las principales causas de infertilidad son la baja concentración espermática, la baja movilidad de los espermatozoides y la morfología espermática alterada (Sociedad Española de Fertilidad (SEF) 2012).

Por estas razones, cada vez son más las parejas que acuden a clínicas de fertilidad y entre las principales técnicas de reproducción asistida (ART; *Assisted reproduction techniques*) empleadas se encuentran:

- **Fecundación in vitro** (IVF; *In vitro fertilization*): Esta técnica está recomendada en casos de infertilidad femenina. Consiste en la unión del ovocito y el espermatozoide en un cultivo *in vitro* en el laboratorio.
- **Microyección intracitoplasmática de espermatozoides** (ICSI; *Intracytoplasmic sperm injection*): Esta técnica está recomendada en casos de infertilidad masculina y consiste en la unión directa del espermatozoide con el ovocito. Esta técnica es la más utilizada en la actualidad.
- **Inseminación Artificial** (AI; *Artificial insemination*): En este caso la fecundación se da en el entorno natural. La muestra de semen se coloca en el interior del útero de la mujer para poder facilitar así la fecundación.

Aunque la tasa de éxito de estas técnicas aumenta año tras año, aún sigue encontrando dificultades y en cada etapa se va perdiendo material biológico. Por este motivo, para poder realizar cualquiera de las tres técnicas es necesaria una estimulación hormonal alta de la mujer. En el caso de IVF e ICSI, por ejemplo, se administran de forma exógena las hormonas propias del ciclo natural durante un tiempo determinado con el fin de obtener el máximo número de ovocitos maduros, ya que, de los ovocitos recogidos de la paciente, +/- el 80 % se recupera en MII. De éstos, no todos llegan a

fecundarse y no todos los embriones producidos son viables para ser transferidos: de cada 100 ciclos iniciados se llevan a cabo aproximadamente 70 transferencias, y solo el 41% de éstas acaban en gestación (Sociedad Española de Fertilidad (SEF) 2017).

Sin embargo, esta previa estimulación hormonal, a día de hoy necesaria, disminuye a su vez la receptividad del endometrio tras el inicio de varios ciclos y con ello la tasa de gestación (Horcajadas *et al.* 2007; Shapiro *et al.* 2011). Por otro lado, en algunas pacientes este procedimiento no puede realizarse ya que en casos de preservación de la fertilidad en cánceres con componente hormonal o en ciclos en mujeres con PCOS, la administración hormonal no está recomendada por el riesgo de hiperestimulación ovárica y la alteración de estas patologías. Con el objetivo de aumentar las tasas de éxito y evitar la estimulación hormonal, para que la técnica sea en las condiciones más parecidas a las naturales, se ha desarrollado un procedimiento previo a la IVF e ICSI; la *maduración in vitro* de ovocitos (IVM; *In vitro maturation*) (Chang *et al.* 2014; Mehta 2014).

La IVM consiste en extraer ovocitos inmaduros (en profase I o estadio de GV) desde los folículos ováricos antrales sin estimulación hormonal o con dosis bajas y madurarlos exógenamente (hasta el estadio de MII) en medios de cultivo controlados (Smitz *et al.* 2011). Una vez los ovocitos están maduros, se continúa con las técnicas de IVF e ICSI.

Aunque esta técnica propone una buena alternativa a la estimulación hormonal, su eficacia es muy baja y, a día de hoy, a pesar de llevar descrita desde 1965 (Edwards 1965) y puesta en uso desde los 90 (Smitz *et al.* 2011), en España solo el 0,02 % y en Europa una media del 0,06 % de los tratamientos de fertilidad incluyen este proceso (Kupka *et al.* 2016; Sociedad Española de Fertilidad (SEF) 2017). Por esta razón, durante estos años numerosas investigaciones se han puesto como objetivo mejorar esta técnica mediante el estudio del proceso de maduración de ovocitos y las moléculas que participan en él. Específicamente, se han centrado en las señales externas que participan en la regulación de las cascadas de señalización que se dan durante el reinicio de la meiosis *in vivo*, para así poder desarrollar nuevas moléculas que puedan complementar los medios de maduración *in vitro* actuales.

Hoy en día existen diversos medios de cultivo que se utilizan en la clínica. En general, consisten en una solución equilibrada de sales, un tampón de bicarbonato y una suplementación proteica y energética. El medio resultante suele tener una concentración osmótica de entre 265 y 300 mOsmol (Rosenkrans y First 1994; Thompson 1996), dependiendo de la especie, y un pH de 7,2-7,4,

simulando al pH fisiológico. Además, se añaden hormonas como FSH, LH, estradiol o factor de crecimiento epidérmico (EGF; *Epidermal growth factor*) para simular la señalización *in vivo* que origina el pico preovulatorio de LH y poder obtener una adecuada reanudación de la meiosis (Sirard *et al.* 1988). El proceso de IVM se realiza bajo unas condiciones controladas de temperatura, humedad y CO₂ adecuado para cada situación.

1.2.1.7 Implicación del sistema opioide en el ovocito

El sistema opioide actúa a diferentes niveles en la regulación de la foliculogénesis y ovogénesis. A continuación, se detalla lo descrito hasta ahora de cada uno de los componentes de este sistema.

Para empezar, en cuanto a los precursores opioides, el mRNA de POMC está presente en folículos antrales, en el cuerpo lúteo y en las células de la granulosa y de la teca (Petraglia *et al.* 1985; Chen *et al.* 1986; Sanders *et al.* 1990; Staszkievicz *et al.* 2007), y su expresión está regulada por las hormonas FSH y LH, variando a lo largo del ciclo menstrual (Chen *et al.* 1986; Melner *et al.* 1986). La LH induce la expresión de PENK en las células de la teca en folículos pequeños (Staszkievicz *et al.* 2007). Por último, las gonadotropinas modulan también la expresión de PDYN: la FSH actúa sobre las células de la granulosa y la LH sobre las células de la teca (Staszkievicz *et al.* 2007).

Los péptidos opioides actúan sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario modulando la secreción de GnRH y LH (Fabbri *et al.* 1989; Dobson y Smith 2000; Parvizi 2000). En concreto, se ha observado que la morfina inhibe la liberación de LH actuando sobre la GnRH (Yilmaz y Gilmore 1999). Debido a esto, la liberación de hormonas como los estrógenos y la progesterona se ve alterada, y con ello, el funcionamiento normal del ciclo reproductivo.

Además de los efectos sobre las principales hormonas, los péptidos opioides tienen una acción directa en el folículo ovárico de la especie porcina y bovina (Dell'Aquila *et al.* 2002; Kaminski *et al.* 2003). En el ovario se ha observado que hay una producción local de β -endorfina (Sanders *et al.* 1990). En el líquido folicular también se han encontrado los péptidos met-enkefalina y β -endorfina, en mayor concentración que en el oviducto o en el útero (Petraglia *et al.* 1986) (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de péptidos opioides encontradas en distintas partes del sistema reproductor tanto femenino como masculino. (Agirregoitia 2008).

	Plasma periférico	Líquido seminal	Endometrio	Oviducto	Líquido folicular
Met-enkefalina (pM)	41,3 ± 0,6	139,2 ± 8	197,5 ± 43,5	29,5 ± 10,1	471,5 ± 58,1
β-endorfina (pM)	2,8 ± 0,4	82,5 ± 37 12,9 ± 1,2	151 ± 37,7	39,7 ± 15,5	308,5 ± 44,5

La β-endorfina se ha visto implicada en varios procesos. Estudios en rata demostraron que la β-endorfina disminuía el número de ovocitos ovulados en cada ciclo menstrual (Faletti *et al.* 1995) y que justo antes de la maduración ovocitaria había una disminución de la concentración de dicho opioide en el líquido folicular humano (Tam *et al.* 1988). Sin embargo, recientemente, se ha realizado otro estudio en el cual se ha detectado una correlación positiva entre la proporción de ovocitos maduros recogidos tras la superovulación y la concentración de β-endorfina en el líquido folicular, indicando una posible función de la β-endorfina en la maduración ovocitaria (Jaschke *et al.* 2018). Otros estudios han relacionado variaciones en la actividad de la β-endorfina con la época del año, sugiriendo un control inhibitorio de los opioides sobre la GnRH y sobre la función reproductora (Davison *et al.* 1998; Sakharkar *et al.* 2006).

En cuanto a los receptores opioides, se han descrito MOR, DOR y KOR en las células de la granulosa de humano, cerdo y caballo (Słomczyńska *et al.* 1997; Dell'Aquila *et al.* 2008; Agirregoitia *et al.* 2012). En estas células, se ha observado que el sistema opioide influye en la secreción de progesterona por las células de la granulosa, en la ovulación y en la síntesis de prostaglandinas en rata (Faletti *et al.* 1995, 2003; Hamada *et al.* 1995; Dell'Aquila *et al.* 2002; Polisseni *et al.* 2005). Los receptores opioides también han sido descritos en ovocitos de varias especies como la humana (Agirregoitia *et al.* 2012), la porcina (Dang-Nguyen *et al.* 2013), la canina (Iorga *et al.* 2009), la bovina (Dell'Aquila *et al.* 2002) o la equina (Dell'Aquila *et al.* 2008).

En varios de estos estudios han relacionado al sistema opioide con la maduración ovocitaria, y es que, como hemos visto, las vías de señalización implicadas en la reanudación de la meiosis son muy parecidas a aquellas que activan los péptidos opioides endógenos. Es por esto que numerosos estudios han querido observar un efecto opioide durante este proceso. Sin embargo, entre los resultados obtenidos hay mucha variedad según las dosis de opioides que se utilicen y la especie estudiada. Por ejemplo, en la especie canina, los ovocitos madurados *in vitro* en presencia de

naloxona alcanzaban mayor tasa de MII con respecto al control (Iorga *et al.* 2009). Lo mismo observaron en porcino, bovino y en equino, sólo que al utilizar dosis más elevadas de naloxona, el efecto era el contrario (Dell'Aquila *et al.* 2002, 2008; Dang-Nguyen *et al.* 2013). Estos resultados coinciden con estudios previos realizados por Faletti y colaboradores en rata (Faletti *et al.* 1995). Estos últimos también observaron un efecto bivalente del antagonista de opioide naloxona en la maduración ovocitaria dependiendo de la concentración utilizada. En equino, además, se observó como la β -endorfina disminuía también la tasa de maduración ovocitaria (Dell'Aquila *et al.* 2008), aunque en la especie bovina, en cambio, β -endorfina no mostró efectos (Dell'Aquila *et al.* 2002). Por último, como hemos mencionado anteriormente, en humanos existe una correlación positiva entre la concentración de β -endorfina en el líquido folicular y la tasa de ovocitos en MII recogidos (Jaschke *et al.* 2018). Por tanto, no hay un consenso general sobre el papel del sistema opioide durante la maduración ovocitaria, aunque todo indica que los opioides son capaces de modular este proceso.

Por último, cabe decir que el sistema opioide se encuentra involucrado en algunos trastornos del aparato reproductor femenino. Entre ellos, el PCOS es uno de los más comunes y una de las mayores causas de disfunción ovulatoria en mujeres en edad reproductiva. En pacientes con este síndrome se han observado unos niveles de β -endorfinas más elevados (Jaschke *et al.* 2018).

1.2.2 El espermatozoide

El espermatozoide es el gameto masculino y se produce en los testículos. Una vez producidos se mantienen en un estado de quiescencia, inmóviles y sin capacidad de fecundar. Cuando el espermatozoide abandona el testículo, se encuentra cubierto de macromoléculas que se van perdiendo gradualmente a su paso por los tubos del epidídimo, adquiriendo así la capacidad de movimiento. Este proceso se conoce como maduración epididimal. Sin embargo, para que sean completamente competentes para llevar a cabo la fecundación, tras la eyaculación, los espermatozoides necesitan estar en contacto con el tracto reproductor femenino, donde se desarrollan cambios moleculares, fisiológicos y bioquímicos (Tosti y Ménéz 2016). Para poder entender todos estos procesos, comenzaremos explicando el desarrollo del espermatozoide desde el principio; la espermatogénesis.

1.2.2.1 Regulación hormonal

El sistema hormonal masculino en la mayoría de los mamíferos consta, al igual que el femenino, de tres grupos de hormonas cuya interacción forma el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La primera de ellas es la GnRH hipotalámica, encargada de la liberación de la FSH y LH adenohipofisarias, que conforman el segundo grupo. Por último, está la testosterona, principal hormona androgénica, que es secretada por el testículo en respuesta a las hormonas adenohipofisarias. La FSH estimula la producción en las células de Sertoli de la proteína ligadora de andrógenos, factores de crecimiento y enzimas, entre otros, necesarias para el desarrollo, mantenimiento y transporte del espermatozoide. La LH estimula la secreción por las células de Leydig de testosterona, necesaria para el inicio de la espermatogénesis (Levy *et al.* 2006).

1.2.2.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo que se da en los túbulos seminíferos y que culmina con la producción del gameto masculino maduro (Neto *et al.* 2016). Durante la infancia, este proceso se mantiene latente y en la pubertad se inicia respondiendo a la producción de testosterona por las células de Leydig activadas por el aumento de las hormonas FSH y LH (Sadler 2004). La espermatogénesis se puede dividir en tres fases que describiremos a continuación.

Fase mitótica

Esta fase se inicia con la división mitótica de las espermatogonias (46, 2N) que se encuentran en la base del epitelio seminífero retenidas por prolongaciones de las células de Sertoli. Hay dos tipos de espermatogonias; las espermatogonias de tipo A representan la población de células madre que se mantienen a lo largo de la vida mediante mitosis, mientras que las espermatogonias de tipo B, producidas por las anteriores, entran en meiosis, dando lugar a la siguiente fase (Carlson 2014) (Figura 5).

Fase meiótica

Los descendientes de las espermatogonias de tipo B son los espermatocitos primarios (46, 4N), los cuales se posicionan debajo de las espermatogonias pero aún bajo el entorno de las células de Sertoli. Durante esta etapa, que dura aproximadamente 24 días, se producen por adelantado moléculas que serán necesarias en etapas posteriores (Carlson 2014) y se replica el DNA para la segunda división meiótica. Los espermatocitos primarios, una vez terminada la primera meiosis, dan

lugar a los espermaticitos secundarios, los cuales, tras entrar en la segunda meiosis, producirán cada uno 2 espermátidas (23, 1N) (Figura 5). De esta forma se ha pasado de una célula diploide a una haploide, estado necesario para la fecundación.

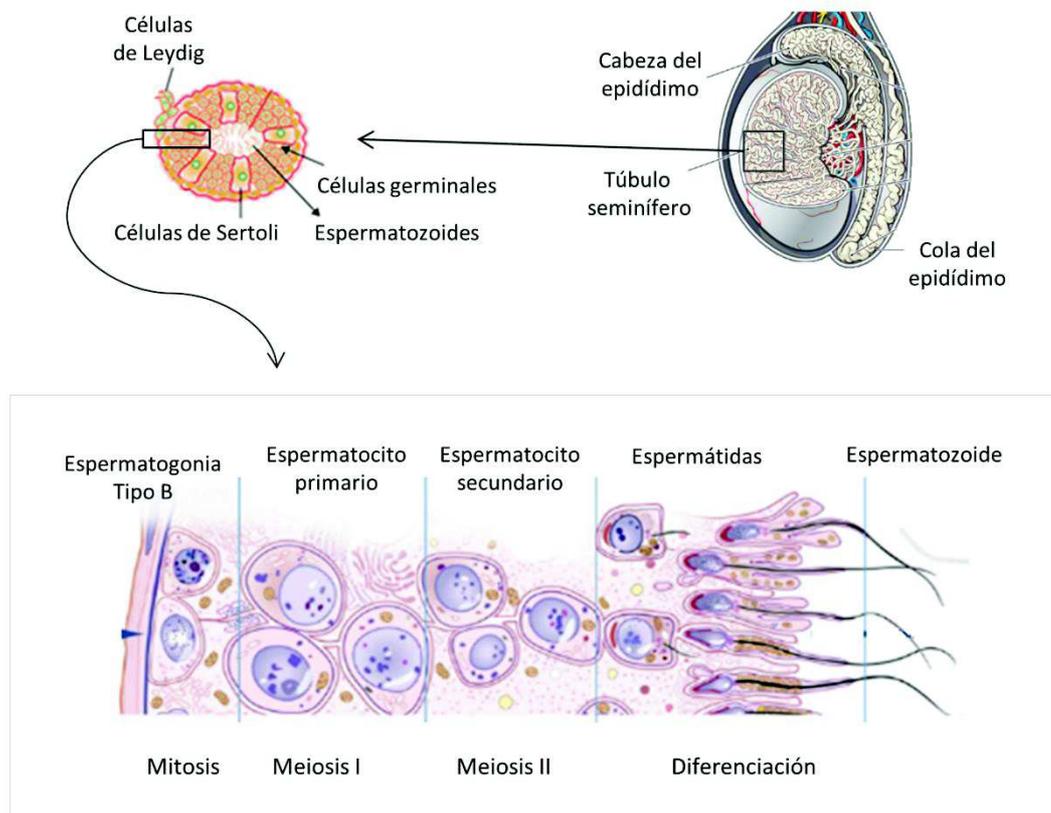


Figura 5. Resumen de la espermatogénesis en mamíferos (Modificado de du Plessis *et al.* 2011)

Espermiogénesis

Las espermátidas no se dividen más pero sí que sufren cambios para pasar a ser espermatozoides altamente especializados. Este proceso se conoce con el nombre de espermiogénesis. Entre los cambios más destacados se encuentran la reducción del tamaño del núcleo, la condensación del material cromosómico y la reorganización del citoplasma. El acrosoma se forma por una condensación del apartado de Golgi y tendrá una función crucial en la fecundación. También se forma el flagelo a partir de la región centriolar y las mitocondrias se sitúan en la región proximal de éste. Parte del citoplasma se pierde durante la espermiogénesis formándose un cuerpo residual que es degradado por las células de Sertoli. Sin embargo, una parte se queda unida al flagelo en forma de

gota citoplásmica que, dependiendo de la especie, se pierde en el epidídimo o después de la eyaculación (Carlson 2014). En ratones, por ejemplo, esta gota puede encontrarse en espermatozoides del epidídimo o del testículo, pero no en el eyaculado, lo cual sí que ocurre en humano (Darszon *et al.* 2011) (Figura 6).

De esta forma se adquiere la estructura característica del espermatozoide (Figura 6). Brevemente, las principales partes que conforman el espermatozoide son:

- **Cabeza:** la cabeza del espermatozoide la componen el acrosoma, el núcleo haploide y el citoplasma. El acrosoma contiene enzimas que serán liberadas durante la fecundación y permitirán al espermatozoide dispersar las células de la granulosa y penetrar en la zona pelúcida (Moore y Persaud 2008). La morfología puede variar entre especies. En ratón, por ejemplo, la región acrosómica tiene forma de gancho y la cabeza tiene forma de media luna. En humanos, en cambio, la cabeza es redondeada y el acrosoma la cubre de igual forma (Figura 6).
- **Pieza intermedia:** Esta es la zona donde se sitúan las mitocondrias. Una de sus funciones principales es generar el ATP necesario para el movimiento del flagelo.
- **Cola o flagelo:** Permite la movilidad al espermatozoide y su transporte a lo largo del tracto reproductor femenino hasta llegar a lugar de fecundación. El motor principal del espermatozoide es el axonema. La estructura de éste se mantiene en todas las regiones de la cola y se compone principalmente de microtúbulos y proteínas asociadas, que emanan del centriolo que se encuentra en la base del núcleo. El centro del axonema consiste en dos microtúbulos de tubulina rodeados por una hilera de 9 pares de microtúbulos. Además de la tubulina, la proteína dineína, que se encuentra adherida a los microtúbulos, también es importante ya que se va a encargar de dar el impulso al espermatozoide. La dineína hidroliza moléculas de ATP y convierte la energía en energía mecánica que permite el desplazamiento del doblete externo de microtúbulos haciendo que el flagelo se doble (Gilbert 2005). En mamíferos, el flagelo puede dividirse en tres zonas; la pieza intermedia, explicada antes, la zona principal y la zona final. La zona intermedia y la principal están separadas por una especie de anillo, denominado *annulus*.

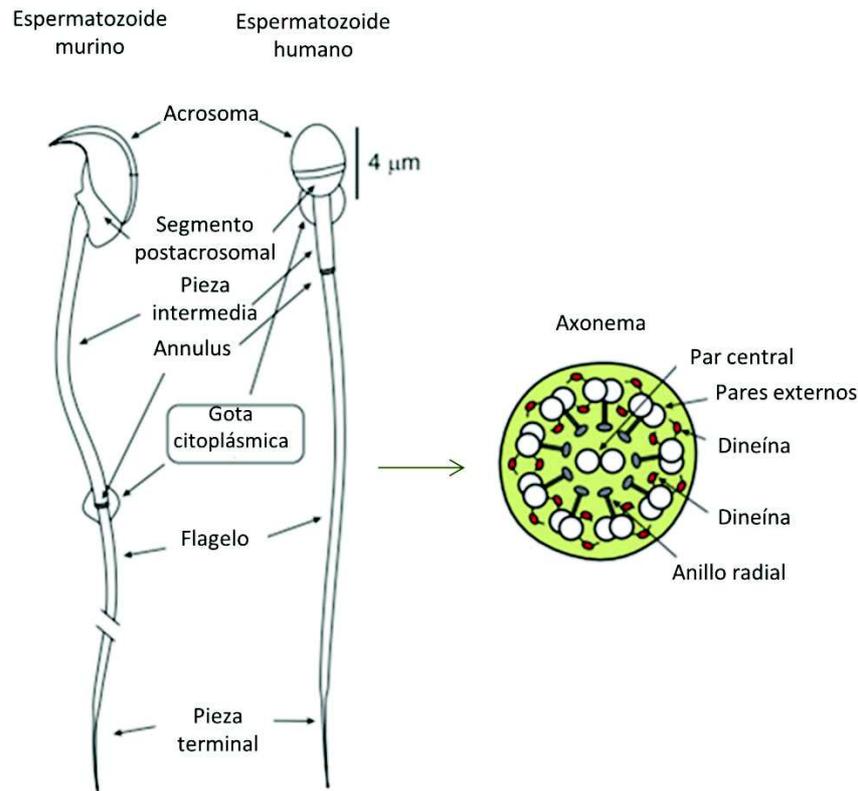


Figura 6. Diferencias morfológicas entre espermatozoides de ratón y de humano. Detalle del axonema en la zona del flagelo. (Modificado de Darszon *et al.* 2011).

1.2.2.3 Maduración del espermatozoide en el epidídimo

Una vez terminada la espermiogénesis, los espermatozoides entran en la luz de los túbulos seminíferos y éstos son transportados pasivamente hacia el epidídimo, donde se llevará a cabo la maduración. La principal característica de los espermatozoides maduros es que flotan y se mueven libremente, aunque éstos aún no tienen la capacidad de fecundar (Carlson 2014).

En el epidídimo, los espermatozoides adquieren la capacidad de moverse. Aunque aún no se conocen todas las señales que recibe el espermatozoide para iniciar estos cambios, hay varios factores que inducen estos procesos y que han sido descritos. Por ejemplo, se ha visto que el pH intracelular induce el movimiento en espermatozoides de mamíferos mediante la activación de la dineína. Otro factor importante es el cAMP intracelular. Un aumento en su concentración induce la movilidad a través de la regulación de proteínas asociadas al axonema vía MAPKs. El mantenimiento

de la movilidad depende también de la concentración de Ca^{2+} , lo cual está asociado con el incremento de cAMP (Tosti y Ménéz 2016).

1.2.2.4 Capacitación del espermatozoide

Como se ha mencionado anteriormente, el espermatozoide una vez eyaculado ya ha adquirido la capacidad de movimiento, pero aún no es capaz de fecundar. Para lograr esta capacidad fecundante, el espermatozoide tiene que pasar por un proceso denominado capacitación que ocurre en contacto con el tracto femenino, en el oviducto, y que lo va a preparar para llevar a cabo la reacción acrosómica. Dependiendo de la especie, el tiempo de esta adaptación varía, siendo, por ejemplo, de unas 6 horas en humanos (Urbina y Lerner Biber 2008), mientras que en ratón se alcanza la capacitación en una hora (Behringer 2014).

Durante este proceso, se da la eliminación de factores inhibitorios como las glicoproteínas de membrana o las proteínas seminales del plasma, que van a permitir al espermatozoide adquirir un estado de hiperactivación. La hiperactivación ocurre coincidiendo con el momento de la ovulación y parece estar asociada con el requerimiento de un movimiento más largo y con mayor curvatura con el fin de alcanzar el lugar de fecundación: el ampulla (Quill y Garbers 2002). Aunque el movimiento es menos progresivo que el que el espermatozoide ha tenido anteriormente, este está preparado para moverse a través de fluidos más viscosos como por ejemplo el moco cervical o también para atravesar las células del cúmulo en el momento de la fecundación. Este proceso está influenciado por factores externos que son secretados por el ovocito o por el oviducto (Darszon *et al.* 2011).

El colesterol es uno de los factores inhibitorios de la capacitación mejor estudiados, el cual se encuentra en grandes cantidades en el plasma seminal (De Jonge 2005). Cuando éste se disgrega de la membrana por acción de la albúmina, se producen cambios en las concentraciones de iones y en la osmolaridad, dándose una hiperpolarización de la membrana y provocando el flujo de bicarbonato (HCO^{3-}). El pH se vuelve más alcalino, lo que va a inducir la capacitación. Además, debido a la hiperpolarización de la membrana, los canales de Ca^{2+} se abren causando un incremento de la permeabilidad de Ca^{2+} . Los altos niveles de Ca^{2+} y HCO^{3-} van a provocar la activación de AC, provocando así un aumento del cAMP intracelular. Por último, esto desencadenará una serie de fosforilaciones de proteínas que son esenciales para la capacitación (Gilbert 2005).

La inhibición del colesterol como factor inductor de la capacitación es uno de los más estudiados e importantes, sin embargo, existen otros que también son capaces de regular el proceso de capacitación. Por ejemplo, en mamíferos se ha descrito que la progesterona secretada por las células del cúmulo es capaz de inducir la capacitación en el espermatozoide, mediante la regulación de las oscilaciones de Ca^{2+} (Quill y Garbers 2002).

1.2.2.5 Implicación del sistema opioide en el gameto masculino

El sistema opioide ha sido ampliamente estudiado en la fisiología del aparato reproductor masculino y, como ya hemos visto anteriormente en el gameto femenino, ejerce una función importante modulando el sistema hormonal. La administración de morfina está asociada con una inhibición de LH, lo que, en espermatozoides, va a llevar a una alteración de la producción de testosterona (Cicero *et al.* 1975). La administración regular de opioides se ha visto asociada a una disminución de la libido, disfunción eréctil o incluso a trastornos como el hipogonadismo (Drobnis y Nangia 2017). Además, se ha visto que consumidores de opio tenían menor movilidad espermática, fenómeno conocido como astenozoospermia (Ragni *et al.* 1988).

Cicero y colaboradores, realizaron varios estudios en ratón en los que administraban morfina tanto de forma crónica como ocasional y observaban los efectos en las tasas de fecundación y en la progenie. Observaron que en los casos en los que se administraba morfina a machos antes de cruzarlos con las hembras, había menor tasa de gestación, el número de camada disminuía y aumentaba la mortalidad (Cicero *et al.* 1995, 2002). También se vio que esto afectaba al peso de las crías y, con ello, a la mortalidad durante los primeros días de vida. En cuanto a los receptores opioides, en 1997 se observó que en machos murinos a los que se les había delecionado el receptor μ , poseían menor cantidad de espermatozoides, menor movilidad de éstos y menor tamaño (Tian *et al.* 1997). Este hecho volvía a confirmar la teoría de una importante regulación opioide en los espermatozoides.

Los tres receptores opioides (MOR, DOR y KOR) y los precursores peptídicos (PENK, PDYN y POMC) han sido descritos en espermatozoides de varias especies (Albrizio *et al.* 2005, 2006, 2010; Agirregoitia *et al.* 2006; Subiran *et al.* 2011; Vicente-Carrillo *et al.* 2016). Las enzimas degradadoras de opioides también se han descrito en espermatozoides (Subirán *et al.* 2008). Por otro lado, se han detectado péptidos opioides, como endorfina y encefalinas, en el líquido seminal y en las células espermáticas (Foresta *et al.* 1986; Davidson *et al.* 1989; Kew *et al.* 1990).

Estudios sobre la funcionalidad de los opioides en este sistema han revelado una posible regulación de la espermatogénesis (Estomba *et al.* 2016; Takzare *et al.* 2016). Se ha visto que el tramadol, uno de los fármacos más usados en la actualidad, inhibe la espermatogénesis y disminuye la calidad de los espermatozoides (Farag *et al.* 2018). Otro de los efectos más estudiados ha sido el impacto en la movilidad de los espermatozoides. Se ha observado que tanto las enzimas degradadoras de opioides (NEP y APN) como los péptidos opioides son capaces de modular la movilidad en espermatozoides humanos. La enzima APN se encuentra tanto en la región acrosómica como en el flagelo y se ha visto que regula la movilidad (Subirán *et al.* 2008). Por otro lado, un estudio de este mismo grupo reveló que el péptido opioide met-enkefalina y su precursor (PENK) se encuentran en la cabeza del espermatozoide humano y la administración de met-enkefalina endógena aumentaba la movilidad, mientras que la exógena tenía un doble efecto inductor e inhibitorio (Subirán *et al.* 2012). En otro estudio sobre el efecto de fármacos analgésicos, se vio cómo el fármaco butorfanol tenía efecto paralizante en espermatozoides humanos, mientras que el fentanilo producía una inhibición parcial de la movilidad (Xu *et al.* 2013).

Por otro lado, la activación *in vitro* de MOR con morfina reduce la movilidad en espermatozoides humanos (Agirregoitia *et al.* 2006). En cerdo, MOR aumenta la movilidad en espermatozoides (Vicente-Carrillo *et al.* 2016) mientras que, en equino, bajas concentraciones del antagonista naloxona aumentan la movilidad y concentraciones altas tienen el efecto contrario, mostrando una modulación dosis-dependiente (Albrizio *et al.* 2005). Esto mismo ocurre en el caso del receptor DOR. En un estudio del mismo grupo en equino vieron como a concentraciones bajas del antagonista naltrindol aumentaba la movilidad mientras que en dosis altas disminuía (Albrizio *et al.* 2010). En humanos, no se han visto cambios en la movilidad al utilizar agonistas de los receptores DOR y KOR, aunque el naltrindol sí que se ha visto que disminuye la movilidad inmediatamente tras su adición, volviendo a recuperarla con el tiempo (Agirregoitia *et al.* 2006).

1.2.3 Fecundación

Tras la ovulación, el ovocito maduro es recogido por las fimbrias del oviducto para llegar al ampulla, lugar donde se da la fecundación. La fecundación es el conjunto de procesos que se dan desde que el espermatozoide entra en contacto con el ovocito hasta que se da el intercambio genético entre ambos gametos (Moore y Persaud 2008). Primero, tras darse el reconocimiento entre gametos, el espermatozoide capacitado se abre paso a través de las células del cúmulo, atraviesa la zona

pelúcida y se adhiere al oolema, membrana plasmática del ovocito. Para ello es necesario que se dé la reacción acrosómica del espermatozoide.

La **reacción acrosómica** del espermatozoide se produce generalmente después de la unión de éste a la zona pelúcida. Al fusionarse la membrana del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, se da un escape de enzimas acrosómicas, como la acrosina y la tripsina, que son necesarias para penetrar la zona pelúcida (Sadler 2004). La unión del espermatozoide a la zona pelúcida se da gracias a la unión con la proteína ZP3 del ovocito. Cuando esto ocurre, la membrana del acrosoma se digiere totalmente y se liberan todas las enzimas del acrosoma, terminando de abrirse paso así a través de la zona pelúcida (Hall 2012).

En segundo lugar, se da la penetración del espermatozoide en el ovocito provocando la fusión de gametos. En cuanto esto ocurre, se activa la reacción cortical en el ovocito, mencionada en el apartado 1.2.1.4, y se liberan los gránulos corticales al espacio perivitelino que provocan cambios en la zona pelúcida y el oolema, lo que bloquea la posible fusión de otros espermatozoides (Liu 2011; Bhakta *et al.* 2019). También se da la activación del ovocito, reanudándose la segunda división meiótica y generando el segundo corpúsculo polar. En este momento se conforma el pronúcleo femenino. Después, el material cromatínico de la cabeza del espermatozoide se condensa y se forma el pronúcleo masculino. En este momento el ovocito fecundado pasa a llamarse cigoto. Ambos pronúcleos van creciendo y pierden sus envolturas nucleares hasta que se produce el inicio de la primera división mitótica, en la cual se entrecruzan los cromosomas maternos con los paternos (Sadler 2004).

1.2.3.1 Implicación del sistema opioide en la fecundación

Hasta la fecha, no hay muchos estudios que describan la función de los opioides en el momento de la fecundación. Sin embargo, el hecho de que las concentraciones de opioides encontradas en el oviducto sean más bajas que en el resto de tejidos del tracto reproductor femenino (Petraglia *et al.* 1986) sugiere que puedan ejercer algún tipo de regulación.

Como se ha mencionado anteriormente en el apartado 1.2.2.5, se ha descrito la presencia del sistema opioide en espermatozoides de distintas especies y se ha observado que su incubación con opioides provoca cambios en algunos procesos fisiológicos del espermatozoide como, por ejemplo, la movilidad. Desde el punto de vista del gameto masculino, uno de los procesos más importantes

para una fecundación exitosa es la reacción acrosómica. PENK está presente durante la espermatogénesis y se ha visto que se almacena en la región acrosómica del espermatozoide en humanos, por lo que podría tener una función durante este proceso (Kew *et al.* 1990). Más recientemente se ha observado que la β -endorfina era capaz de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos (Urizar-Arenaza *et al.* 2016). Por otro lado, en un estudio realizado en 2019 se observó cómo la activación del KOR inhibía la reacción acrosómica en espermatozoides humanos (Urizar-Arenaza *et al.* 2019).

En cuanto al gameto femenino, hay muy pocos estudios en los que se haya analizado la función opioide en el momento de la fecundación. En estudios enfocados a la utilización de anestésicos en la clínica de reproducción asistida, se ha observado que la incubación de ovocitos de erizo de mar con fentanilo durante una hora previa a la realización de la IVF no produce ningún efecto en la tasa de éxito de esta técnica (Bruce *et al.* 1985).

1.2.4 Desarrollo embrionario preimplantacional

El desarrollo embrionario preimplantacional o temprano comprende el periodo de tiempo desde que el ovocito es fecundado hasta que se alcanza el estadio de blastocisto viable para la implantación (Mihajlović y Bruce 2017) y tiene lugar en el oviducto, el cual provee al embrión tanto de apoyo estructural como nutricional (Li y Winuthayanon 2017). Las paredes del oviducto están revestidas por células ciliadas y no ciliadas; las primeras se caracterizan por generar el movimiento necesario para el transporte del embrión y las no ciliadas por la actividad secretora que aporta metabolitos clave para su desarrollo. Dependiendo de la especie, la duración de esta etapa puede variar. Por ejemplo, el desarrollo embrionario temprano en humanos dura aproximadamente 7 días (Norwitz *et al.* 2001), mientras que en ratón se reduce a 4 (Bedzhov *et al.* 2014). Durante este tiempo se produce la segmentación del cigoto por divisiones mitóticas sucesivas que van produciendo células embrionarias de menor tamaño (blastómeros) (Moore y Persaud 2008). En estas divisiones, el embrión va adquiriendo distintas morfologías que definen los estadios embrionarios (Figura 7). Después del estadio de 8 células (ratón) o 16 células (humano), los blastómeros se unen unos a otros por medio de un proceso llamado “compactación” que facilita una mayor interacción entre las células, lo que va a llevar a la formación de las mórulas. Al finalizar la compactación, las células más externas comienzan a bombear fluido desde el exterior hacia el interior del embrión. Este líquido se va acumulando en los espacios intercelulares formándose así una cavidad que va aumentando de tamaño, llamada cavidad blastocística o blastocele (Moore y Persaud 2008). Conforme esto va

ocurriendo, los blastómeros se separan dividiendo lo que ya es el blastocisto en dos partes: una capa celular externa y delgada llamada trofoblasto o trofoectodermo y un grupo de blastómeros centrales que pasan a formar la masa celular interna del blastocisto (Figura 7). El trofoectodermo dará lugar a la placenta, mientras que la masa celular interna seguirá con el desarrollo del embrión (Carlson 2014).

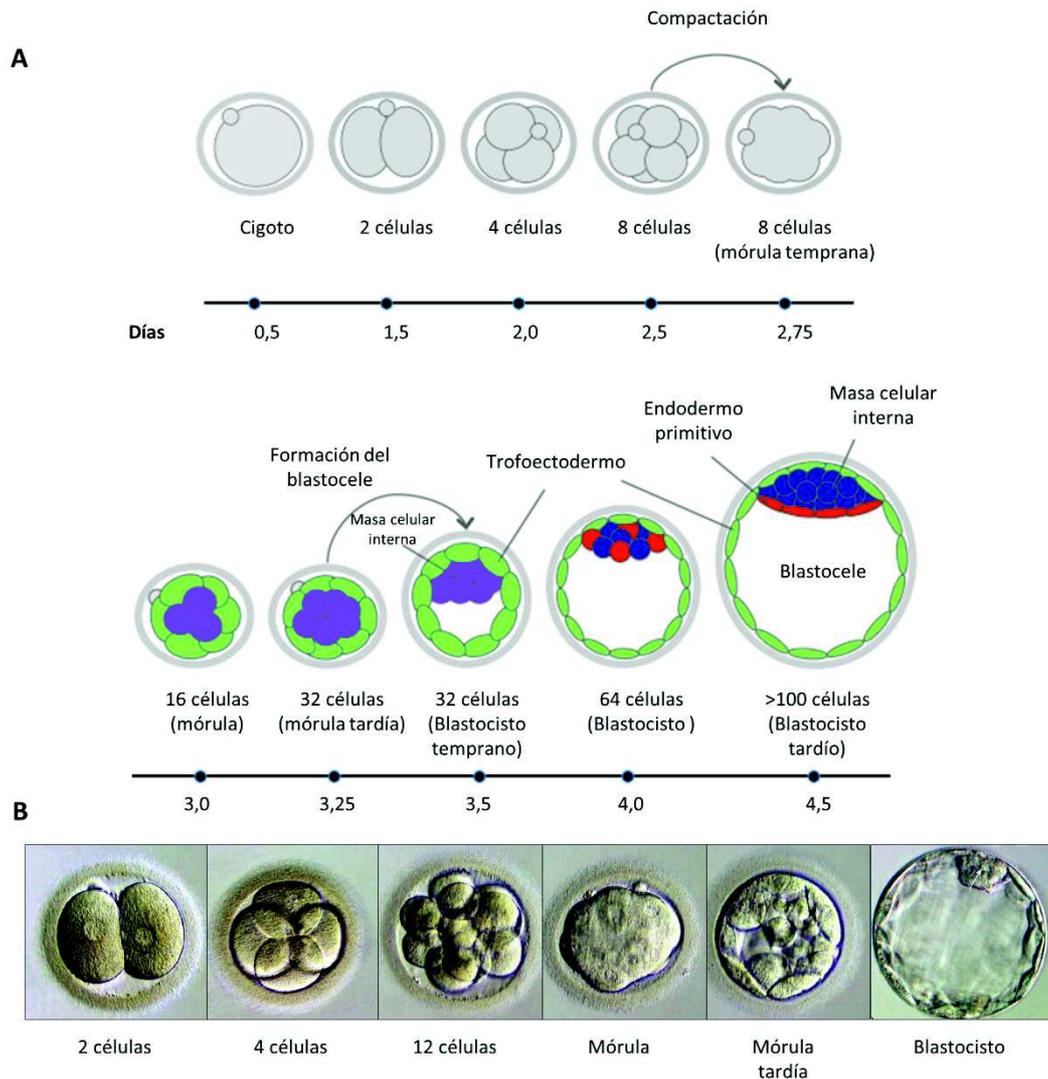


Figura 7. Desarrollo embrionario preimplantacional. A) Estadios principales del desarrollo embrionario desde cigoto hasta blastocisto en escala temporal (días tras la IVF) en ratón (modificado de Mihajlović y Bruce 2017). B) Microfotografías representativas de los distintos estadios en embriones humanos. (Modificado de Carlson 2014).

El inicio de la síntesis de DNA comienza después de la fecundación, pero la transcripción no se inicia hasta varios estadios después (Speroff y Fritz 2006). La activación transcripcional del genoma embrionario va a promover la expresión de genes claves para los procesos de diferenciación y

proliferación celular (Mihajlović y Bruce 2017). En ratones, la activación genómica se da en el estadio de 2 células mientras que en humanos no ocurre hasta el estadio de 4-8 células (Schultz 2002).

1.2.4.1 Implicación del sistema opioide en el desarrollo embrionario temprano

Hasta la fecha, existen evidencias de la implicación del sistema opioide durante el desarrollo embrionario temprano, tanto en el oviducto como en los embriones en desarrollo. Ya en el año 1986, se describió la presencia de EOPs, como la β -endorfina y la met-enkefalina, en el fluido oviductal de vacas, aunque su concentración en este conducto disminuye en comparación con el líquido folicular o el endometrio (Petraglia *et al.* 1986) (Tabla 3). En la especie porcina, se ha visto la presencia de β -endorfina en el oviducto tras la administración de estradiol (Okrasa *et al.* 2003). También se ha observado la presencia de los precursores de opioides en el oviducto de ratones, cambiando sus perfiles de expresión a lo largo del desarrollo embrionario preimplantacional y sugiriendo una posible función opioide sobre esta etapa del desarrollo (Chen *et al.* 2014). Por otro lado, MOR está presente en las células ciliadas y no ciliadas del epitelio oviductal en yegua, pudiendo estar relacionado con la ayuda a la movilidad de los espermatozoides a su paso por el oviducto (Desantis *et al.* 2008).

En cuanto al embrión, se ha descrito la presencia de los principales receptores opioides (MOR, DOR y KOR) en todos los estadios desde cigoto hasta blastocisto (Chen *et al.* 2014). En ese mismo estudio, se observó que la administración de morfina a ratonas gestantes durante el desarrollo embrionario preimplantacional, inhibía el desarrollo normal del embrión mediante la inhibición de la movilización del Ca^{2+} intracelular, mientras que un co-tratamiento con naloxona revertía estos efectos (Chen *et al.* 2014).

1.2.5 Implantación

La implantación es el proceso mediante el cual el blastocisto se adhiere al endometrio para continuar con su desarrollo embrionario (McGowen *et al.* 2014). Este proceso es clave para que se lleve a cabo una gestación exitosa y su fallo es uno de los principales problemas en casos de infertilidad. En condiciones naturales sólo el 39 % de los embriones consiguen implantar (Simón *et al.* 2009). Además, como ya hemos mencionado anteriormente, debido a la estimulación hormonal de la paciente en las ART para poder extraer los ovocitos y aumentar así las posibilidades de fecundación, la receptividad del endometrio disminuye considerablemente y, con ello, la eficacia de implantación (Horcajadas *et al.* 2007; Shapiro *et al.* 2011). De hecho, solo el 41 % de las

transferencias generan una gestación y de éstas solo el 29% culminan en parto (Sociedad Española de Fertilidad (SEF) 2017).

En la mayoría de los mamíferos la implantación se compone de tres etapas: aposición, adhesión e invasión. La primera de ellas consiste en el establecimiento del contacto físico entre el trofoectodermo del blastocisto y las células epiteliales del endometrio. Para ello, es necesario que antes se dé la “eclosión” o salida del embrión de la zona pelúcida. Aunque este proceso no es dependiente del endometrio, se ha visto que en condiciones *in vitro* la eclosión lleva más tiempo que en condiciones *in vivo*, por lo que el endometrio podría estar influyendo (Simón *et al.* 2009). La etapa de adhesión se caracteriza por la unión del blastocisto al epitelio endometrial de forma que ya no puede separarse. Por último, se da la invasión del blastocisto en el endometrio por medio de la fusión o el desplazamiento de las células endometriales por parte del embrión (Schlafke y Enders 1975; McGowen *et al.* 2014).

Este proceso ocurre durante un periodo de tiempo en el que el útero se encuentra en un estado receptivo. En humanos, el ciclo menstrual de la mujer dura aproximadamente 28 días por término medio y este estado de “recepción” uterina se daría entre los días 20 y 24 (Norwitz *et al.* 2001). En ratones, en cambio, el ciclo estral dura 5 días y el útero se encuentra receptivo entre los días 4 y 5 (Namiki *et al.* 2018). A continuación, vamos a centrarnos en el modelo humano para explicar la naturaleza del endometrio y su histología a lo largo de las distintas fases del ciclo menstrual.

1.2.5.1 El endometrio

El endometrio es la mucosa que tapiza la cavidad uterina (Simón *et al.* 2009). Está regulado principalmente por la acción de las hormonas ováricas estrógenos y progesterona, sufriendo cambios a lo largo del ciclo reproductivo y formando lo que se denomina ciclo menstrual (Figura 8). Estos cambios van a permitir que el endometrio adquiera el estado receptivo imprescindible para que se dé la implantación embrionaria, previamente explicada, y el subsiguiente desarrollo de la gestación.

Histológicamente, el endometrio se encuentra revestido por un epitelio cilíndrico simple (epitelio luminal) que a su vez forma las glándulas endometriales (epitelio glandular). Además, se compone de tejido conjuntivo (estroma) que alberga el componente vascular. Todos ellos se encuentran distribuidos en dos regiones denominadas funcional y basal. La región funcional se transforma y se

regenera cada ciclo en respuesta al sistema hormonal, mientras que la basal permanece y permite la regeneración de la otra (Mazur y Kurman 2005) (Figura 8).

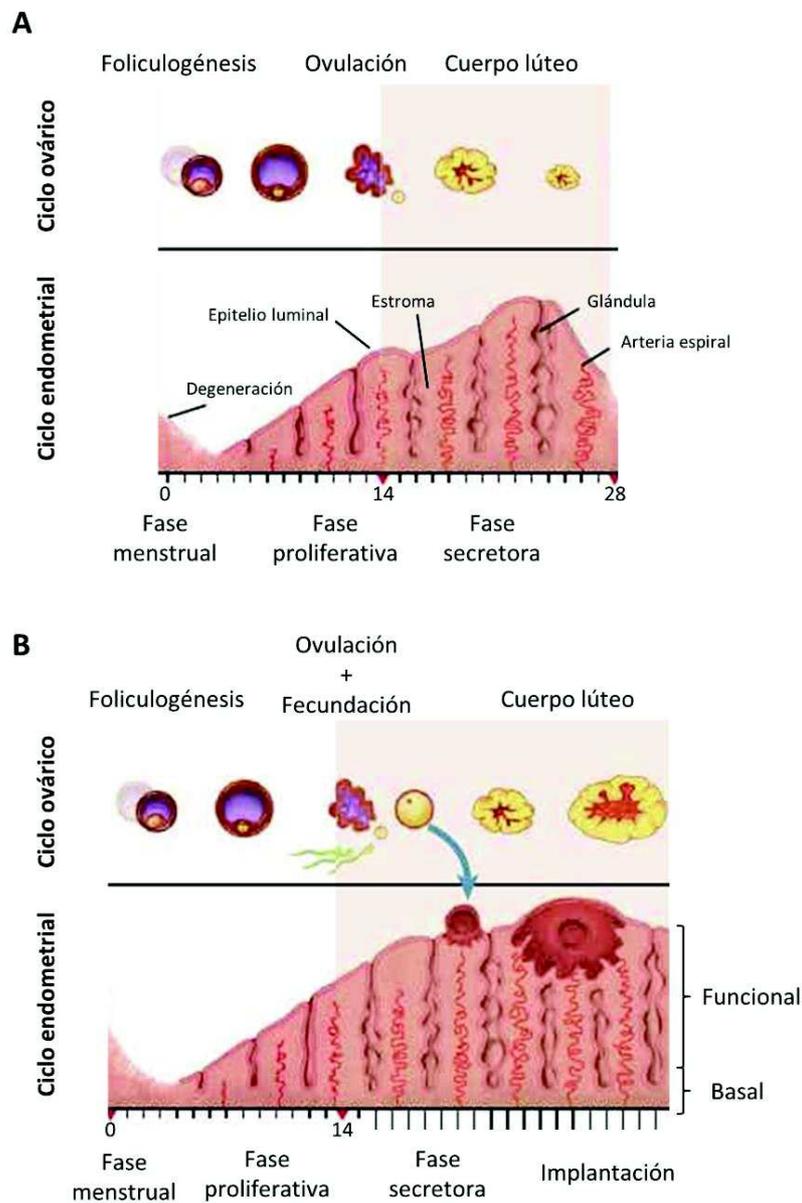


Figura 8. Dinámica del endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual. A) Desarrollo del ciclo sin fecundación. El cuerpo lúteo y la capa funcional del endometrio se degeneran. B) Desarrollo del ciclo endometrial con fecundación. El cuerpo lúteo se mantiene una vez finalizada la implantación del embrión. (Modificado de Cunningham *et al.* 2011).

1.2.5.2 Endometrio y ciclo menstrual

El ciclo menstrual en humanos comienza con el sangrado provocado por el fin del ciclo anterior: fase menstrual. En esta fase (días 1-4), la capa funcional del endometrio se desprende en caso de no haber fecundación, dejando sólo la capa basal para su regeneración (Figura 8).

Además, como se ha descrito en el apartado 1.2.1.2, comienza la secreción de estrógenos en las células de la granulosa del folículo ovárico en desarrollo por acción de la hormona FSH. La producción de estrógenos provoca la regeneración de la capa funcional del endometrio mediante el inicio de la fase proliferativa (días 5-15). Se inicia la expresión de genes que llevan a la producción de factores de crecimiento, los cuales van a propiciar el crecimiento de las glándulas endometriales así como el aumento de la vascularización. Aun así, no hay actividad secretora durante esta etapa (Simón *et al.* 2009).

La acumulación de estrógenos, a su vez, comienza a inhibir la acción de la FSH y, en cambio, aumentan los niveles de LH. Entre los días 12 y 14, aproximadamente, se da el pico máximo de estrógenos y LH que provoca la ovulación. Una vez ocurrida ésta, los niveles de estrógenos disminuyen y comienza a aumentar lentamente la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo (Cunningham *et al.* 2011).

La progesterona inhibe el estímulo proliferativo comentado anteriormente y el endometrio alcanza su máxima proliferación, iniciándose la fase secretora (días 16 en adelante). En esta fase el útero se prepara para la implantación mediante el aumento de la secreción de glicoproteínas y péptidos hacia la luz de las glándulas endometriales mediada por la progesterona. Las glándulas se hacen más tortuosas, con un lumen muy amplio debido a la secreción acumulada en su interior. También se da la aparición de edema en la lámina propia uterina, facilitando el desplazamiento celular y proporcionando sitios de anclaje para el trofoblasto. Además, en el periodo peri-implantacional, aparecen unas estructuras denominadas pinópodos en la porción apical de las células epiteliales que sólo permanecen de 24 a 48 horas, y son capaces de succionar líquido endometrial y facilitar el acercamiento y la adhesividad entre las paredes endometriales y el trofoblasto. Esas estructuras suelen ser utilizadas como marcadores morfológicos del periodo de receptividad uterina. Por otro lado, las células del estroma ubicadas alrededor de las arteriolas que ahora son espiraladas, aumentan considerablemente de tamaño y acumulan glicógeno y lípidos en su citoplasma teniendo lugar la reacción predecidual (Gellersen *et al.* 2007).

La decidualización es el proceso mediante el cual las células estromales se diferencian en células secretoras deciduales, indispensables para la implantación del embrión (Gellersen *et al.* 2007). Este proceso comienza a mitad de la fase secretora, independientemente de que haya o no implantación y está mediado por la progesterona (Namiki *et al.* 2018). Sin embargo, para que la progesterona pueda inducir la decidualización, se debe dar un aumento previo del cAMP en las células estromales, provocado por factores locales a los que el estroma ha sido expuesto tras la ovulación (Gellersen *et al.* 2007). Las células deciduales juegan un papel importante en la implantación ya que regulan la invasión del trofoblasto y la respuesta inmune, entre otros (Gellersen y Brosens 2014; Vinketova *et al.* 2016).

Otro punto importante a destacar es la respuesta inmune del endometrio. Este sistema tiene una función importante ya que no sólo proporciona protección al tracto genital femenino frente a infecciones, sino que también se encarga de evitar el rechazo inmunológico durante la implantación embrionaria. La población de células del sistema inmune constituye aproximadamente el 10-15 % de las células del estroma, alcanzando un máximo durante la fase secretora tardía y premenstrual (Simón *et al.* 2009). Esta población está formada mayoritariamente por células *natural killer* uterinas (uNK; *uterine natural killer cells*), macrófagos y linfocitos T (Maybin y Critchley 2015). Durante la decidualización, se da el reclutamiento de células del sistema inmune del torrente sanguíneo por parte de las quimoquinas. Las quimoquinas son secretadas tanto por las células endometriales al diferenciarse como por las células del trofoblasto en el momento de la adhesión. Entre las células inmunes reclutadas se encuentra las NK, que van a diferenciarse a uNK en el estroma del endometrio (Vinketova *et al.* 2016). Las uNK se localizan en la zona próxima a las glándulas endometriales y las arteriolas y suponen la población mayoritaria. Su principal función, de forma general, es reconocer la presencia de los antígenos del trofoblasto y, por tanto, mediar el reconocimiento entre embrión y endometrio (Simón *et al.* 2009). El mantenimiento de estas células inmunes y su diferenciación está regulado por las citoquinas y factores del endometrio y del trofoblasto, lo que va a crear un entorno específico en el sitio de implantación (Vinketova *et al.* 2016).

La angiogénesis en el endometrio adquiere vital importancia ya que va a participar en varios procesos: en la menstruación para la reparación vascular, en la fase proliferativa para el crecimiento endometrial y en la fase secretora para promover la decidualización. La angiogénesis está regulado por varios factores entre los que destacan el óxido nítrico (NO; *nitric oxide*), las metaloproteinasas

de la matriz (MMPs; *matrix metalloproteinases*) y los factores de crecimiento. Entre estos últimos se encuentran el factor de crecimiento fibroblástico (FGF; *fibroblast growth factor*) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; *vascular endothelial growth factor*) (Simón *et al.* 2009; Maybin y Critchley 2015).

Si no hay fecundación, el cuerpo lúteo involuciona y sobreviene un descenso brusco de los niveles de estrógenos y de progesterona sanguíneo y esta variación hormonal produce la descamación de la capa funcional uterina, en forma de sangre, mucus, y restos de tejidos necróticos, lo que lleva nuevamente al inicio del ciclo (Figura 8).

1.2.5.3 Implicación del sistema opioide en la implantación

La implantación y la implicación del sistema opioide durante este proceso ha sido uno de los puntos más estudiados de los procesos reproductivos. Los tres precursores de opioides han sido detectados en el útero de mamíferos (Makrigiannakis *et al.* 1995). En humanos, los precursores POMC y PDYN han sido detectados en las células endometriales (Zoumakis *et al.* 1997). Además, la expresión del mRNA de PENK muestra un gran aumento en las células cercanas a la zona de implantación según avanza el proceso de fecundación (Jin *et al.* 1988; Rosen *et al.* 1990).

El análisis de la presencia de péptidos opioides en las diferentes fases del ciclo menstrual y durante la gestación ha concluido que existen patrones variables en los gradientes de concentración de éstos. Así, en el endometrio, la concentración de β -endorfina y met-enkefalina va aumentando desde la fase folicular a la fase lútea (Petraglia *et al.* 1985; Słomczyńska *et al.* 1997). Estudios inmunocitoquímicos en la especie porcina han revelado la presencia de β -endorfina en el epitelio superficial y en las glándulas endometriales, localizada específicamente en la zona apical de estas células y aumentando su concentración en la mitad del ciclo estral (Li *et al.* 1993).

Se postula, además, que el sistema opioide pueda tener implicación en la remodelación uterina mediando procesos de apoptosis (Gravanis *et al.* 2002) y en la contracción del miometrio mediante la movilización de Ca^{2+} (Zoumakis *et al.* 1997), lo que podría estar relacionado también con la ayuda que recibe el espermatozoide en su camino hasta el ámpula (Gravanis *et al.* 1994) o con la orientación que toma el embrión durante la implantación (Zoumakis *et al.* 1997). También se ha observado una función inmunosupresora de los péptidos opioides. Podrían actuar junto con glucocorticoides, interleucinas y la hormona liberadora de corticotropina (CRH; *corticotropin-*

releasing hormone) en la inmunosupresión localizada en el sitio de implantación, inhibiendo así el rechazo al blastocisto (Zoumakis *et al.* 1997). Además, el sistema opioide podría estar vinculado con otros procesos que se dan durante la implantación, como la decidualización y la vascularización del tejido. De hecho, se ha observado en varios estudios que los opioides son capaces de modular la angiogénesis (Dai *et al.* 2010; Yamamizu *et al.* 2015).

En cuanto a los receptores opioides, en la década de los 90, se observaron receptores KOR en las células endometriales humanas (Hatzoglou *et al.* 1995) y receptores MOR en células estromales del útero de rata gestante (Zhu y Pintar 1998). En ratones, se ha observado que el mRNA de KOR se expresa en la zona donde se ha implantado el embrión disminuyendo en estadios más avanzados del embarazo (Zhu y Pintar 1998). La β -endorfina, que se une a MOR y KOR para llevar a cabo su función, aumenta la concentración de receptores de estrógenos en las células epiteliales del útero, por lo que aumenta la sensibilidad del endometrio a los estrógenos (Makrigiannakis *et al.* 1995). A su vez, se ha observado que los estrógenos disminuyen la concentración de β -endorfina en el útero (Zoumakis *et al.* 1997).

Estudios realizados en la última década sugieren que la modulación exógena del sistema opioide pueda alterar el proceso de implantación embrionaria. En un estudio realizado en 2015, se administró morfina a ratonas durante los primeros días de gestación (durante el desarrollo embrionario temprano) y se observó cómo aquellos úteros de ratonas a las cuales se les había administrado morfina habían desarrollado menos sitios de implantación que el grupo control (Tang *et al.* 2015). Además, la exposición a morfina provocó una disminución de la diferenciación celular de las células estromales y epiteliales y una menor angiogénesis. Por otro lado, se ha observado la expresión diferencial de los precursores opioides y péptidos opioides en el útero de ratón durante el desarrollo embrionario preimplantacional, sugiriendo una regulación coordinada entre ellos (Tang *et al.* 2015; Wu *et al.* 2016).

Con respecto a las enzimas degradadoras de opioides, la NEP ha sido purificada en trofoblastos humanos y parece ser que pueda estar implicada en el patrón de secreción de la hCG, vía GnRH (Kikkawa *et al.* 2002).

Por último, cabe destacar la implicación del sistema opioide en uno de los desórdenes más comunes que afectan a la fertilidad; la endometriosis (Matsuzaki *et al.* 2007). La endometriosis se caracteriza

por la proliferación de glándulas endometriales y células del estroma, en tejidos extrauterinos, lo cual suele producir dolor e infertilidad. MOR se ha visto regulado de forma positiva en las células estromales de esta patología (Matsuzaki *et al.* 2006), siendo mayor su expresión en la fase proliferativa de las endometriosis ectópicas. Además, se ha visto que las vías de las MAPKs y la vía PI3K/AKT están sobreactivadas en estos casos y se cree que puedan estar involucradas en el inicio de la endometriosis (Matsuzaki *et al.* 2005).

2 OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis es contribuir al conocimiento del papel que juega el sistema opioide en el sistema reproductor, haciendo una aproximación tanto descriptiva como funcional en tres procesos clave de la reproducción: la maduración *in vitro* de ovocitos, la capacitación *in vitro* de los espermatozoides y el ciclo endometrial.

Objetivo 1

Los receptores opioides han sido descritos en ovocitos de distintas especies en las distintas fases de la maduración nuclear (GV, MI y MII) y en las granulosas, y se ha sugerido una posible función en el proceso de maduración ovocitaria. El **primer objetivo** de esta tesis es estudiar la posible modulación opioide vía receptor mu opioide (MOR) en la maduración ovocitaria de la especie murina mediante el uso de la técnica de maduración *in vitro* de ovocitos (IVM). En concreto, observar si el opioide morfina es capaz de alterar este proceso y, con ello, la subsiguiente fecundación *in vitro* (IVF) y desarrollo embrionario temprano.

Objetivos específicos:

- Estudiar la presencia y localización de MOR en el complejo cúmulo-ovocito durante la maduración nuclear en ratones.
- Observar si la activación de MOR es capaz de modificar las vías de señalización PI3K/AKT y MAPKs, importantes en la maduración ovocitaria.
- Realizar estudios farmacológicos de agonismo/antagonismo de MOR durante la maduración ovocitaria analizando la subsiguiente IVF y desarrollo embrionario preimplantacional.

Objetivo 2

El sistema opioide en espermatozoides ha sido ampliamente estudiado y, en general, se ha observado una regulación negativa sobre la función espermática. Sin embargo, a día de hoy no hay estudios de IVF con espermatozoides que hayan sido tratados con opiáceos. Por tanto, el **segundo objetivo** de la tesis es observar si la modulación de MOR con el opioide morfina y/o naloxona durante la capacitación del espermatozoide, utilizando técnicas de IVF, es capaz de alterar la capacidad de fecundación de éste.

Objetivos específicos:

- Analizar la presencia de MOR en espermatozoides maduros de ratón.

- Realizar estudios farmacológicos de agonismo/antagonismo de MOR durante la capacitación de espermatozoides de ratón para observar si, realmente, la exposición de éstos a diferentes concentraciones de morfina y naloxona en el momento previo a la IVF genera una variación en la tasa de cigotos generados y en el subsiguiente desarrollo embrionario.

Objetivo 3

El sistema opioide ha sido detectado en el útero y endometrio de varias especies de mamíferos y se ha sugerido una función de este sistema en la funcionalidad del endometrio. El **tercer y último objetivo** de esta tesis es, por tanto, describir la presencia, localización y distribución temporal de MOR en el endometrio humano a lo largo de las distintas fases del ciclo menstrual.

Objetivos específicos:

- Analizar la dinámica de expresión de MOR en el endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual, tanto a nivel de RNA como a nivel proteico.
- Estudiar la localización de este receptor en las distintas células endometriales y su variación a lo largo de las distintas fases del ciclo menstrual: menstrual, proliferativa y secretora.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

En este apartado se muestran inicialmente los aparatos utilizados a lo largo de la tesis doctoral (Tabla 4), así como los reactivos (Tabla 5 y 6) y las soluciones empleadas (Tabla 7).

Tabla 4. Aparatos utilizados para llevar a cabo las diferentes técnicas.

Aparatos	Casa comercial
Balanza de precisión	AE Adam
Cabina de bioseguridad Bio II A	Telstar
Cámara Makler	Sefi Medical Inst.
Centrífuga Centronic	JP Selecta
Cubeta electroforética Western Blot	BIO-RAD
Cubeta electroforética en gel de agarosa	BIO-RAD
Estación de inclusión en parafina	Thermo Scientific Shandon Histocentre
Espectrofotómetro Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific
Incubador de CO ₂	Memmert
Máquina Tinción Eosina/Hematoxilina	Thermo Scientific
Microcentrífuga Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Microtomo Shandon Finesse 325	Thermo Scientific
Microscopio estereoscópico SMZ 745T	Nikon
Microscopio óptico Olympus BX50	Olympus Optical
Microscopio óptico Eclipse E200	Nikon
Microscopio de fluorescencia Axioskop	Zeiss
Microscopio confocal de fluorescencia Axio Observer, Apotome 2.0	Zeiss
Microscopio confocal de fluorescencia LSM800	Zeiss
pH-metro Basic 20	Crison
Placa calefactora	Labolan
Rack magnético DynaMan 2	Thermo Fisher
Shandon Citadel 1000	Thermo Scientific
Sistema Chemidoc XRS	BIO-RAD
Termociclador StepOne (qPCR)	Thermo Fisher
Termociclador T100 (PCR)	BIO-RAD
Vitrina Extracción de gases	Indelab

Tabla 5. Lista de reactivos utilizados.

Reactivos	Casa comercial
Acrilamida 30%	
RNasy mRNA Purification Kit	Ambion
ImProm-II Reverse transcription System	Promega
Vectastain Kit ABC	Vector Labs
Nova Red kit	Vector Labs
Dynabeads mRNA Direct Micro Kit	Ambion
GoScript Reverse Transcription Kit	Promega
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	ThermoFisher
Hoechst 33342	Thermo Scientific
Fluoromont G	Electron Microscopy Sciences (EMS)
Vectamount	Vector Labs
Formaldehído	Electron Microscopy Sciences (EMS)
Cloroformo	Sigma
Trizol- Tri Reagent	Sigma
Hematoxilina	Richard-Allan Scientific
Etanol absoluto	Scharlau
Peso molecular nucleótidos	Nippon Genetics
Peso molecular proteínas	Invitrogen
DNA Taq Polimerasa	Sigma
TEMED	Sigma
Tritón X-100	Sigma
Poli-L-lisina	Sigma
Etidio Bromuro	Sigma

Tabla 6. Otros reactivos utilizados en experimentos de IHC, ICC, IVM y IVF.

Sueros		Casa comercial
Suero de cabra (Normal Goat Serum, NGS)		Abcam
Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine/Calf Serum, FBS/FCS)		Biowest
Anticuerpos primarios	Uso	Casa comercial
Anti-Mu Opioid Receptor (Conejo)	IHC/ICC	Abcam
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (Conejo)	ICC	Cell Signaling
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® (Conejo)	ICC	Cell Signaling
Anti-Mu Opioid Receptor (Conejo)	WB/ICC	Chemicon/ Millipore
Anti- β -Actin (ratón)	WB	Sigma
Anticuerpos secundarios	Uso	Casa comercial
Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG	IHC	VectorLabs
Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit IgG	ICC	Invitrogen
Anti-Rabbit IgG HRP Goat	WB	Affinity BioReagents
Agonistas y antagonistas opioides		Casa comercial
Morfina		Alcaliber
Naloxona		Sigma
Hormonas		Casa comercial
Gonadotropina sérica de yegua preñada (eCG)		Folligon
Gonadotropina coriónica humana (hCG)		Veterin Corion

Tabla 7. Soluciones empleadas durante la experimentación y preparadas en el laboratorio.

Soluciones	Composición
Tris-HCl 10 mM pH 7,4	12.11 g Trizma base + H ₂ O destilada hasta 1000ml. pH: 7,4
Tris-HCl 1M pH 8.8	121.1 g Trizma base + H ₂ O destilada hasta 1000ml. pH: 8,8
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	62.07 g Trizma base + H ₂ O destilada hasta 1000ml. pH: 6,8
PBS 10X	NaCl 137 mM + KCl 2,7 mM + KH ₂ PO ₄ 1,5 mM + Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM + H ₂ O destilada.
Buffer de lisis	PBS + Triton X 100 (1%) + inhibidores de proteasas (2,5 µl/ml)
SDS 10%	10 g SDS + H ₂ O destilada hasta 100 ml
Persulfato amónico 10%	1 g Persulfato amónico + H ₂ O destilada hasta 10ml
Solución de carga	Tris-HCl 50 mM pH 6,8 + SDS 2% + Glicerol 10% + Azul de bromofenol 0,1% + β-Mercaptoetanol 1% + H ₂ O destilada hasta volumen deseado
Reactivo de Bradford	Azul brillante Coomassie 0,117 mM + etanol 5% (v/v) + ácido ortofosforico 15% (p/v)+ H ₂ O destilada hasta volumen deseado
Gel separador	Acilamida/Bisacrilamida (30%;1%) + Tris-HCl 1 M pH 8,8 (25% vol) + SDS (1% vol) + Persulfato amónico 10% (50 µl) + TEMED (10 µl) + H ₂ O destilada hasta volumen deseado
Gel concentrador	Acilamida/Bisacrilamida (30%;1%) + Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (25% vol) + SDS (1% vol) + Persulfato amónico 10% (25 µl) + TEMED (5 µl) + H ₂ O destilada hasta volumen deseado
Solución de electroforesis	Tris-HCl 250 mM pH 8,8 + SDS 1% + Glicina 2 M + H ₂ O destilada hasta volumen deseado
Solución de transferencia	Tris-HCl 250 mM pH 8,3 + SDS 0,25% + Glicina 1,92 M + H ₂ O destilada hasta volumen deseado

TBS (Tris Buffered saline)	Tris-HCl 50 mM pH 7,5 + NaCl 150 mM + H ₂ O destilada hasta volumen deseado
Blotto	TBS + Triton X 100 1%
Solución bloqueante	Blotto + leche desnatada en polvo (%5)
Luminol	Luminol 250 mM + 10 ml DMSO
Ácido cumárico	Ácido cumárico 90 mM + 10 ml DMSO
Amplificador de quimioluminiscencia ECL	Luminol 1,25 mM + ácido p-cumárico 0,2 mM + Tris-HCl pH 8,5 + H ₂ O destilada hasta volumen deseado. En el momento de utilizarse, se le añade H ₂ O ₂ 0.03% (v/v).
Tampón Tris/acetato/EDTA (TAE) 1X	0,4 M Trizma+ ácido acético glacial 5,7% (v/v) + 10 mM EDTA (pH 8)
Gel de agarosa	Agarosa 1,5% + 100 ml TAE 1X + 2 µl BrET.
PBS-PVA 0,1%	0,5 g PVA + 500 ml PBS 1X
Buffer Citrato Trisódico 10 mM	1,47 g citrato trisodico + 500 ml H ₂ O destilada. pH 6

A continuación se muestra la composición de los medios utilizados para la manipulación de gametos, así como los medios de maduración, fecundación y cultivo *in vitro*. Todos los medios fueron preparados en el laboratorio y se esterilizaron por filtración (filtros de 0,22 μm). Los medios M2 y HTF (*Human Tubal Fluid*) (manipulación de gametos y fecundación *in vitro*, respectivamente) fueron almacenados a 4°C durante un máximo de 30 días (Tabla 9 y 10, respectivamente). En el caso del medio de cultivo *in vitro* de embriones (KSOM), fue congelado a -20°C durante un máximo de 60 días (Tabla 11). Un día antes de su uso se descongeló en la nevera a 4°C durante toda la noche. El medio de maduración *in vitro* de ovocitos fue preparado el mismo día de experimento (Tabla 8). Todos los medios, a excepción del M2, fueron incubados al 5% CO₂ y 95% de humedad al menos 5 horas antes de su utilización para la regulación del pH. El medio M2 sólo se calentó a 37°C antes de su uso, ya que el pH se reguló durante su preparación (pH 7,3-7,4).

Tabla 8. Composición del medio de maduración *in vitro* de ovocitos murinos.

Reactivos	Casa comercial	Concentración
TCM-199	Sigma / M4530	
Solución de Gentamicina	Sigma / G1397	1:200
Suero Fetal Bovino al 10%	Biowest / S181B	10% V/V
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Sigma / E9644	10 ng/ml

Tabla 9. Composición del medio M2 para la extracción y lavado de ovocitos murinos. pH regulado (7,3-7,4) durante su preparación. Almacenado a 4°C.

Reactivos	Casa comercial Referencia	Cantidad g/L	Concentración mM
Hepes	Sigma	4,969	20,85
Cloruro de calcio (Cl ₂ Ca.2H ₂ O)	Sigma / C7902	0,252	1,71
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma / S5886	5,533	94,68
Cloruro de potasio (KCl)	Sigma / P5405	0,356	4,78
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma / P5655	0,162	1,19
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Sigma / M1880	0,293	1,19
Lactato de sodio 60% syrup	Sigma / L7900	3,77 ml	33,64
Glucosa anhidra	Sigma / G7021	1	5,55
Piruvato sódico	Sigma / P2256	0,036	0,33
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	Sigma / S8875	0,349	4,15
Penicilina	Sigma / S4687	0,0624	0,17
Estreptomicina	Sigma / S9137	0,05	0,07
Rojo de Fenol	Sigma / P5530	0,01	0,03
Disolver bien			
Ajustar pH (7,3-7,4)			
Medir osmolaridad (285-287 mOsmol)			
Albúmina (BSA)	Sigma / A9647	4	4 mg/ml
Esterilizar mediante filtración (0,22 µm)			
Almacenar a 4°C (máximo 30 días)			

Tabla 10. Composición del medio HTF (Human Tubal Fluid) para la fecundación *in vitro* (FIV). Almacenado a 4°C.

Reactivos	Casa comercial Referencia	Cantidad g/L	Concentración mM
Cloruro de calcio (Cl ₂ Ca.2H ₂ O)	Sigma / C7902	0,3	2,04
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma / S5886	5,93	101,60
Cloruro de potasio (KCl)	Sigma / P5405	0,3496	4,96
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma / P5655	0,0504	0,37
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Sigma / M1880	0,0492	0,20
Lactato de sodio 60% syrup	Sigma / L7900	3,42 ml	30,52
Glucosa anhidra	Sigma / G7021	0,5	2,78
Piruvato sódico	Sigma / P2256	0,0364	0,33
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	Sigma / S8875	2,1	25,00
Penicilina	Sigma / S4687	0,075	0,20
Estreptomicina	Sigma / S9137	0,05	0,07
R rojo de Fenol	Sigma / P5530	0,004	0,01
Albúmina (BSA)	Sigma / A9647	4	4 mg/ml
Disolver bien			
Medir osmolaridad (300 mOsmol)			
Albúmina (BSA)	Sigma / A9647	4	4 mg/ml
Esterilizar mediante filtración (0,22 µm)			
Almacenar a 4°C (máximo 30 días)			

Tabla 11. Composición del medio de cultivo *in vitro* de embriones (KSOM). Almacenado a -20°C.

Reactivos	Casa comercial Referencia	Cantidad g/L	Concentración mM
Cloruro de calcio (Cl ₂ Ca.2H ₂ O)	Sigma / C7902	0,2514	1,71
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma / S5886	5,54	94,7
Cloruro de potasio (KCl)	Sigma / P5405	0,1864	2,5
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma / P5655	0,0476	0,35
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Sigma / M1880	0,048	0,194
Lactato de sodio 60% syrup	Sigma / L7900	1,42 ml	12,67
Glucosa anhidra	Sigma / G7021	0,036	0,19
Piruvato sódico	Sigma / P2256	0,022	0,2
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	Sigma / S8875	2,10	25,00
Glutamina	Sigma / G8540	0,147	1,0
EDTA	Sigma / E6635	0,0038	0,013
Penicilina	Sigma / S4687	0,062	0,18
Estreptomicina	Sigma / S9137	0,050	0,086
Rojo de Fenol	Sigma / P5530	0,01	0,028
Aminoácidos esenciales 50X	Sigma / B6766	10 ml	1X
Aminoácidos no esenciales 100X	Sigma / M7145	5 ml	1X
Disolver bien			
Medir osmolaridad (250-255 mOsmol)			
Albúmina (BSA)	Sigma / A9647	1	1mg/ml
Esterilizar mediante filtración (0,22 µm)			
Almacenar a -20°C (máximo 60 días)			

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Ratón

Los animales utilizados durante la experimentación como donantes de ovocitos y espermatozoides fueron ratones híbridos provenientes del cruce entre hembras de la línea C57BL6/J y machos de la línea DBA/2J (Envigo, España). Los procedimientos experimentales con ratones fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Animal de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU CEEA número de referencia: M20-2015-016-027-028-173; M20-2018-247-248-249-250).

3.2.1.1 Cuidado y manejo

Todos los animales utilizados durante el desarrollo de la tesis fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad), con libre acceso a agua y comida. Toda la experimentación con animales fue llevada a cabo bajo las directrices de 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 fueron siempre sacrificados por dislocación cervical con el fin de causar el menor sufrimiento.

3.2.1.2 Cría

Los procesos de cría y producción de animales fueron llevados a cabo según las recomendaciones del Servicio General de Animalario de la Universidad del País Vasco (SGIker). La realización de los cruces para la obtención de la línea híbrida se hizo manteniendo una proporción de dos hembras por macho. Las camadas se destetaron tras 21 días desde su nacimiento y fueron separadas por sexo. Todos los animales usados en experimentación tenían entre 8 y 10 semanas de edad. Los machos utilizados para fecundación *in vitro* fueron individualizados al menos dos semanas antes de comenzar el experimento.

3.2.1.3 Producción de embriones *in vitro*

Obtención de COCs

Para poder obtener una cantidad óptima de COCs tras la superovulación, se utilizaron hembras de 8 a 10 semanas de edad. Se inyectó 0,1 ml de gonadotropina sérica de yegua preñada (eCG; *Equine chorionic gonadotropin*, Folligon), con actividad de la FSH, a una concentración de 7,5 UI /0,1 ml disuelta en suero fisiológico. Tras 48 horas, las hembras se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los ovarios en medio M2 (composición descrita en Tabla 9). Tras limpiarlos y colocarlos en

placas de 35 mm, se recogieron los COCs mediante punción de los ovarios con ayuda de una aguja de calibre 30-G y se seleccionaron solo aquellos en los cuales hubiera al menos tres capas de células de la granulosa rodeando al ovocito en GV. Todo el proceso se hizo bajo un microscopio estereoscópico (Nikon) y en placa calefactora a 37°C (Labolan).

Maduración *in vitro* de ovocitos

Los COCs seleccionados se lavaron en M2 y una segunda vez en medio de maduración (Tabla 9). Después fueron trasladados en grupos de 25-30 a placas Nunc de 4 pocillos (Thermo Scientific) que contenían 500 µl del medio de maduración. Los COCs permanecieron en este medio 17 horas a 37°C bajo una atmósfera controlada de 5% de CO₂ y con una humedad del 95%. Cumplido este tiempo, los COCs se utilizaron para la IVF o para los análisis descritos en apartados posteriores.

Incubación con agonista del receptor mu opioide

Con el fin de poder elucidar la función de MOR en la maduración ovocitaria, los COCs fueron expuestos a distintas concentraciones de un agonista selectivo, un antagonista y ambos al mismo tiempo (Figura 9). Para ello, se añadieron las cantidades correspondientes de cada compuesto opioide y/o vehículo al medio de maduración 5 minutos antes de introducir los COCs, para así evitar su degradación.

Como agonista selectivo de MOR se utilizaron dosis crecientes de morfina (1, 10 y 100 nM) (Alcaliber, Ki (nM): 1,4). El antagonista elegido en los experimentos posteriores para bloquear el efecto de la morfina fue la naloxona (SIGMA, Ki (nM): 1,78) a una concentración de 10 µM. Todas las disoluciones stock fueron preparadas en PBS-PVA 0.1%. Como control, un grupo de COCs fue cultivado en medio de maduración al cual se añadió la misma cantidad de PBS-PVA 0.1% que se había añadido de cada compuesto opioide.

Maduración *in vivo* de ovocitos

Al igual que lo descrito al inicio de este apartado, se inyectó 0,1 ml de eCG a hembras de 8 a 10 semanas de edad. 54 horas después se administró 0,1 ml de hCG a una concentración de 7,5 UI/0,1 ml disuelta en suero fisiológico. 14 horas tras esta última administración se sacrificó a las hembras por dislocación cervical y se extrajeron los oviductos colocándolos en placas de 35 mm con medio M2. Con ayuda de una aguja calibre 30-G, se obtuvieron mediante punción los COCs del ampulla, los cuales suelen encontrarse en estadio de MI y/o MII. Tras lavarlos en medio M2, se trasladaron al

medio de fecundación *in vitro* (HTF, composición descrita en Tabla 10) y posteriormente a placas Nunc de 4 pocillos conteniendo 500 μ l de HTF, donde tendrá lugar la IVF.

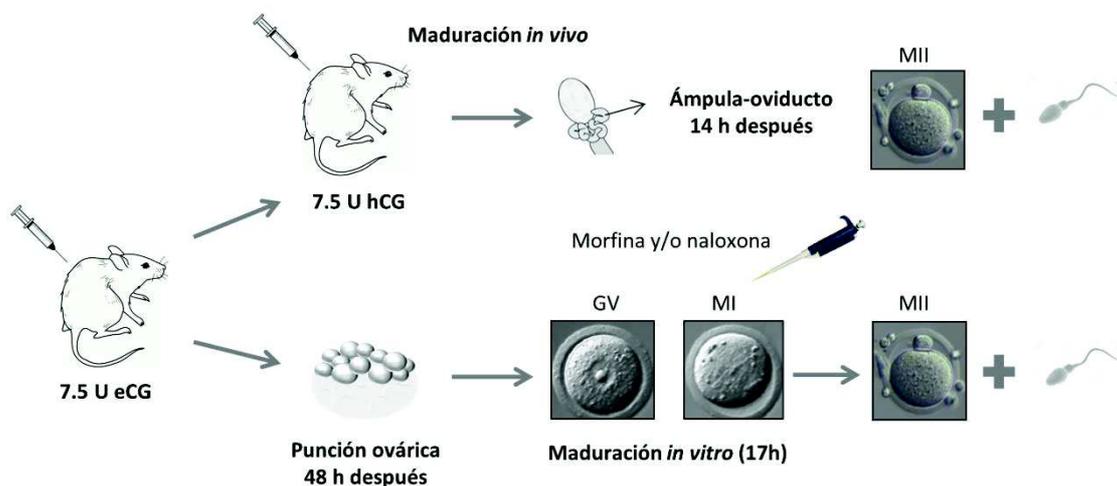


Figura 9. Diseño experimental de la IVF con ovocitos madurados *in vitro* en presencia/ausencia de morfina y/o naloxona.

3.2.1.4 Fecundación *in vitro* (IVF)

Obtención de espermatozoides

Se utilizaron machos de 8 a 10 semanas de edad, previamente individualizadas y testadas su fertilidad. 16 horas después de comenzar la maduración *in vitro*, o bien, 13 horas después de la administración de hCG en caso de realizar la maduración *in vivo* de ovocitos, se sacrificaron los machos por dislocación cervical y se llevó a cabo la extracción de espermatozoides maduros del epidídimo, con ayuda de material quirúrgico.

Capacitación de espermatozoides

Los espermatozoides se extrajeron del epidídimo bajo microscopio estereoscópico (Nikon) en una gota de 500 μ l de HTF cubierta de aceite mineral (Sigma), preparada el día anterior para que el pH del medio estuviera correctamente equilibrado. Una vez extraídos, se incubaron durante una hora bajo una atmósfera de 5 % de CO₂ y una humedad del 95%, donde tuvo lugar la capacitación.

Incubación con agonista del receptor mu opioide

Para estudiar la función de MOR en la capacitación de espermatozoides, éstos fueron expuestos a distintas concentraciones de un agonista opioide selectivo, un antagonista y ambos al mismo tiempo (Figura 10). Para ello, se añadieron las cantidades correspondientes de cada compuesto opioide y/o vehículo al medio de capacitación 5 minutos antes de introducir los espermatozoides.

Al igual que en el caso de maduración *in vitro* de ovocitos, como agonista selectivo de MOR se utilizaron dosis crecientes de morfina (0, 1, 10 y 100 nM; K_i (nM): 1,4) (Alcaliber). El antagonista elegido en los experimentos posteriores para bloquear el efecto de la morfina fue la naloxona (SIGMA, K_i (nM): 1,78) a una concentración de 10 μ M. Todas las disoluciones stock fueron preparadas en PBS-PVA 0.1%. Como control, un grupo de espermatozoides fue capacitado en medio HTF al cual se añadió la misma cantidad de PBS-PVA 0.1% que se había añadido de cada compuesto opioide.

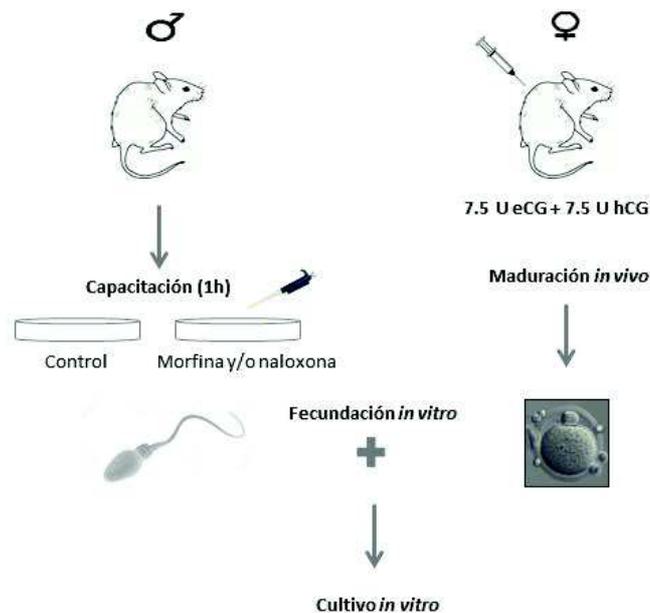


Figura 10. Diseño experimental de la IVF con espermatozoides capacitados en presencia de morfina y/o naloxona.

Co-incubación de gametos

Tanto en el caso de los ovocitos provenientes de IVM, como los madurados *in vivo*, fueron lavados en medio HTF antes de llevarlos a la placa Nunc de 4 pocillos donde tendrá lugar la IVF. Una vez distribuidos en los pocillos, se cuantificó en la cámara Makler la concentración de espermatozoides y

se calculó el volumen necesario para obtener una concentración de 1 millón de espermatozoides por ml en la IVF. Se añadieron los espermatozoides a los pocillos de la placa Nunc y los gametos permanecieron juntos durante 5 horas.

3.2.1.5 Cultivo *in vitro* de embriones

Una vez transcurridas las 5 horas de IVF, se traspasaron los posibles cigotos a una placa de 35 mm con medio HFT y se lavaron para eliminar los restos de espermatozoides alrededor de la membrana. Los cigotos se pasaron por el medio de cultivo *in vitro* de embriones (KSOM; composición descrita en la Tabla 11) para finalmente introducirlos en la placa de cultivo *in vitro* con medio KSOM cubierto de aceite mineral donde permanecerán hasta llegar al estadio de blastocisto (día 4 post-IVF) (Figura 11).

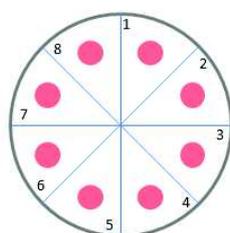


Figura 11. Diseño de placa de cultivo *in vitro* de embriones distribuida en 8 gotas de KSOM cubiertas de aceite mineral.

3.2.1.6 Evaluación del desarrollo embrionario preimplantacional

Al cabo de 24 horas de cultivo, se tiñeron con Hoechst 33342 (Thermo Scientific) aquellas células que no se habían dividido y se evaluaron con microscopio de fluorescencia (Axioskop, Zeiss) bajo luz ultravioleta. A su vez, se recogieron las tasas de embriones en 2 células y en los siguientes tres días de cultivo *in vitro*: 4-8 células, mórula y blastocisto.

3.2.1.7 Obtención de muestras biológicas ratón

Durante los procesos de maduración *in vitro* de ovocitos y extracción de espermatozoides se recogieron muestras destinadas a la evaluación de la expresión de MOR por RT-PCR e ICC. Durante la maduración *in vitro* de ovocitos se recogieron ovocitos en fase GV, MI y MII y células de la granulosa extraídas directamente del ovario tras la punción. En el caso de los espermatozoides, se extrajeron directamente del epidídimo en medio HTF. Se centrifugaron durante 10 minutos a 800 g y se retiró el sobrenadante. Todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la extracción.

3.2.1.8 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Para extraer el RNA de ovocitos, granulosa y espermatozoides se utilizó el kit Dynabeads mRNA Direct Micro siguiendo las instrucciones del fabricante (Ambion). Brevemente, se añadieron 50 μ l de buffer de lisis a cada muestra y se resuspendió. La muestra permaneció 5 minutos a temperatura ambiente y después se añadieron 10 μ l de la solución con microbeads. Se resuspendió y se dejó 5 minutos en hielo y con agitación suave. La muestra se llevó al imán y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 50 μ l de Buffer A y se repitió el mismo proceso. Esto se hizo de nuevo con Buffer A y posteriormente dos veces con Buffer B. Finalmente, se resuspendió la muestra en 10 μ l de Tris-HCl. Inmediatamente después de la extracción de mRNA, se llevó a cabo el procedimiento para la obtención de cDNA mediante el sistema GoScript Reverse Transcription (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 1 μ l de mezcla de dNTPs y 1 μ l de hexámeros aleatorios a 8 μ l de muestra. Se calentó a 70°C en el termociclador durante 10 minutos. Mientras, se preparó la mezcla para la síntesis de cDNA; 6,5 μ l de H₂O milliQ, 2 μ l de RT Buffer 10X, 0,5 μ l de RNAasa inhibidora y 1 μ l de enzima GoScript Reverse Transcriptase. Transcurridos los 10 minutos, se añadieron 10 μ l de esta mezcla a la inicial y se dejó a temperatura ambiente 10 minutos. Después se introdujo la muestra en el termociclador y se siguió el siguiente programa: 50 minutos a 37°C y 10 minutos a 80-94°C. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C. Como control positivo para MOR se utilizaron células del cortex cerebral de ratón, cedidas por la Dra. Leyre Uriguen (departamento de Farmacología, Universidad del País Vasco).

3.2.1.9 PCR

Para llevar a cabo la PCR se siguieron los parámetros descritos en la tabla 12, usando como molde el cDNA sintetizado anteriormente. A la mezcla se añadieron 2,5 μ l de cada cebador, 5 μ l de Buffer 10X, 7 μ l de MgCl₂, 1 μ l de dNTP y por último, 0,5 μ l de DNA Taq polimerasa (Sigma). La mezcla se llevó hasta un volumen de 49 μ l añadiendo H₂O y se le añadió 1 μ l de cada muestra de cDNA.

Tabla 12. Parámetros usados para PCR

Proceso	Tiempo	Temperatura (°C)	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	2 min	95	1
Desnaturalización	30 sec	95	
Hibridación	30sec	58	40
Elongación	1 min	72	
Elongación final	5 min	72	1
Mantenimiento	∞	4	

Los cebadores usados fueron los descritos en la tabla 13. Una vez finalizada la PCR, los productos fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 2%.

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para PCR en ovocitos y espermatozoides murinos.

Gen	Secuencia	Tamaño	Referencia
Receptor mu opioide (MOR)	(Fw) 5'-ATCCTCTCTTCTGCCATTGGT-3' (Rv) 5'-TGAAGGCCGAAGATGAAGACA-3'	148 pb	(Fu <i>et al.</i> 2014)
B-Actina (ACTB)	(Fw) 5'-GCTTCTTTGCAGCTCCTTCG-3' (Rv) 5'-ACGGTTGGCCTTAGGGTTCA-3'	390 pb	

3.2.1.10 Inmunocitoquímica

Evaluación del receptor mu opioide

En el caso de ovocitos y granulosas, las células se recogieron directamente del medio de cultivo y se manejaron con ayuda de una pipeta en todos los pasos posteriores. Por el contrario, los espermatozoides se colocaron en cubres con poli-L-Lisina con el menor medio posible y se dejaron secar sobre una placa calefactora a 37°C. El procedimiento a continuación fue el mismo para todas las muestras tratadas.

Se hizo un lavado con PBS-PVA 0.1% y las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Tras realizar otro lavado en PBS-PVA 0.1%, las muestras se incubaron durante 1 hora con Tritón 1% disuelto en PBS-PVA 0.1% y suplementado con suero fetal bovino (FCS; *Fetal calf serum*) al 10%, con el fin de permeabilizar la membrana. En el caso de espermatozoides se hizo una condición

omitiendo este paso para localizar el receptor en ausencia o presencia de permeabilización de la membrana.

Tras la permeabilización, las células se incubaron toda la noche a 4°C en presencia del anticuerpo primario anti MOR (Millipore). Pasado este tiempo, las muestras fueron lavadas 3 veces consecutivas en PBS-PVA 0.1% y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (Invitrogen) en una concentración de 1:500. Después, las muestras se volvieron a lavar 3 veces en PBS-PVA 0.1% y se tiñeron con Hoechst 33342 (5mg/ml). Finalmente, las muestras se montaron en microgotas de Fluoromont G (EMS). Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. Los resultados fueron analizados en un microscopio confocal de fluorescencia (Apotome 2, Zeiss) y las imágenes fueron procesadas en ImageJ.

Evaluación de AKT y ERK1/2

Para evaluar la activación de la señalización de AKT fosforilada y ERK1/2 fosforilada durante el proceso de maduración *in vitro* de ovocitos, se recogieron COCs siendo incubados en presencia de distintas concentraciones de morfina (apartado 3.2.1.3) a distintos tiempos. Para AKT fosforilada se recogieron ovocitos a 0 h, 30 min, 1 h, 8 h y 17h, mientras que para ERK1/2 los tiempos fueron; 0h, 10 min, 30 min, 1h y 17h. Estos tiempos fueron establecidos según la bibliografía existente. El procedimiento para la realización de la inmunocitoquímica fue el mismo que el descrito en el apartado anterior. En este caso, los anticuerpos primarios usados fueron anti Akt (Ser473) a una concentración de 1:200 y anti fosfo-ERK a 1:400. Los resultados fueron analizados en un microscopio confocal de fluorescencia según la disponibilidad de los servicios generales de la Universidad del País Vasco (SGiker). En el caso de la evaluación de AKT los resultados se analizaron con el microscopio LSM800 (Zeiss), mientras que en la evaluación de pERK se hizo con el microscopio Apotome 2 (Zeiss). Todas las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ.

3.2.1.11 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con Graph Pad Prism 5.0 y IBM SPSS Statistics 21.0. En el caso de los experimentos de maduración *in vitro* de ovocitos en presencia de opioides, los resultados de las tasas de fecundación *in vitro* fueron normalizados respecto al grupo control de cada experimento. Se analizó la distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene. Los datos seguían una distribución

normal y fueron comparados mediante el análisis de varianza de 2 vías (ANOVA). Se usó Bonferroni como test post hoc y la significancia fue establecida a $p < 0,05$ en todos los casos.

3.2.2 Humano

3.2.2.1 Obtención de muestras biológicas humano

Las muestras de endometrio humano utilizadas para el desarrollo de la tesis fueron cedidas por la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario de Cruces tras la obtención del consentimiento informado por parte de las pacientes y previa aprobación del Comité de Ética en Investigación Clínica (CEIC EI4/36, 02/2015). El trabajo fue llevado a cabo en la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

El tejido endometrial humano fue obtenido por biopsia endometrial en distintos días del ciclo menstrual de 86 mujeres (22-39 años de edad) incluidas en el programa de reproducción asistida. Todas las pacientes presentaban ciclos menstruales normales (25-35 días) y no habían recibido tratamiento hormonal en los últimos tres meses. Además, cumplían los siguientes criterios; ecografía vaginal uterina normal, ausencia de endometriosis, síndrome de ovario poliquístico, fallo de implantación o abortos recurrentes y sin historial de consumo de opiáceos. Los tejidos se extrajeron utilizando una cánula de biopsia endometrial Pipelle de Cornier (Laboratorios CCD). No se usaron antibióticos y no hubo casos de infección u otros efectos adversos.

Las muestras se agruparon en cinco fases; fase I (menstrual, días 1-5; $n=4$), fase II (proliferativa temprana-media, días 6-10; $n=7$), fase III (proliferativa tardía-secretora temprana, días 11-19; $n=9$), fase IV (secretora media, días 20-24; $n=7$) y fase V (secretora tardía, días 25-28; $n=8$). La datación de las muestras fue determinada histológicamente por un patólogo experto de la Unidad de Reproducción Humana, siguiendo el criterio de Noyes *et al.* (1950). Los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C para la extracción de proteínas o mRNA, o bien fijados en paraformaldehído al 4% e incluidos en bloques de parafina para inmunohistoquímica.

3.2.2.2 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA de las muestras congeladas de endometrio se extrajo mediante el kit RNasy mRNA Purification Kit (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, tanto para las muestras de endometrio como para el control positivo córtex cerebral humano, se calculó la concentración de

RNA y la pureza de la muestra calculando el ratio 260/280 nm espectroscópicamente mediante el uso del NanoDrop®ND-1000 (Thermo Scientific).

El procedimiento para la síntesis de cDNA fue llevado a cabo con el kit ImProm-II Reverse transcription System (Promega). Brevemente, a 150 ng de RNA total de cada muestra se le añadieron 2 µl de hexámeros aleatorios y agua mili-Q hasta alcanzar un volumen final de 12 µl. La mezcla se calentó a 65°C durante 10 minutos y seguidamente se pasaron a hielo durante 5 minutos para deshacer posibles estructuras secundarias de las cadenas de RNA. A continuación, se añadieron 8 µl de la mezcla de reacción (*Reverse Transcription Mix*) y se hibridó a una temperatura de 25°C durante 5 minutos. Se llevó a cabo una primera síntesis a 55°C durante 60 minutos y se inactivó la retrotranscriptasa a 70°C durante 15 minutos.

3.2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

El cDNA sintetizado se usó como molde para la realización de la RT-PCR cuantitativa, que se llevó a cabo en 3 replicados de cada fase del ciclo menstrual. Para ello se utilizó el termociclador StepOne (ThermoFisher) usando una secuencia específicamente diseñada para reconocer MOR (TaqMan Gene Expression Assays) (Tabla 14). Brevemente, a 2 µl de cDNA se añadieron 2,5 µl de la mezcla de reacción (TaqMan Master Mix), 0,25 µl de la secuencia TaqMan y 0,25 µl de H₂O MilliQ. Los ciclos usados para esta PCR fueron; 20 segundos a 95°C y 40 ciclos con dos pasos; 1 segundo a 95°C y 20 segundos a 60°C. Se usó el gen GAPDH como control endógeno. La cantidad de mRNA en cada muestra fue determinada por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ usando GAPDH como gen de referencia.

Tabla 14. Secuencias específicas para qPCR.

Gen	Ref. Secuencia TaqMan® Assay
MOR	Hs01053957_m1
GAPDH	Hs99999903_m1

3.2.2.4 Preparación de la muestra y extracción de proteína

Las muestras obtenidas de las pacientes fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su utilización. Para la evaluación de MOR mediante Western Blot se utilizaron las siguientes muestras de endometrio: de la fase I, n=3; de la fase II, n=5; de la fase III, n=4; de la fase IV, n=4; y de la fase V, n=6. Como control positivo de MOR se utilizó córtex cerebral humano facilitado por la Dra. Leyre Uriguen (Departamento de Farmacología, Universidad del País Vasco). Las

muestras se homogenizaron en una solución tampón (Tris-HCl 10 mM) a una temperatura de 4°C. Se centrifugó a 1.500 g, durante 5 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se eliminó y el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 g durante 35 minutos a 4°C. Para poder medir la concentración de proteína del precipitado que se formó en esta última centrifugación se resuspendió en la solución tampón usada para la homogenización.

3.2.2.5 Cuantificación de proteína

Se calculó la concentración de la proteína presente en las muestras de endometrio mediante el método Bradford (Bradford 1976), basado en la afinidad de los polipéptidos por el colorante azul brillante de Coomasie. La unión de colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda máxima de absorción del azul Coomasie, que pasa de 465 nm a 595 nm. El incremento de absorción, medido a 595 nm, es directamente proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra, cuyo valor puede ser calculado mediante la extrapolación en una recta patrón de absorción.

Para la recta patrón, se parte de una concentración conocida de BSA (1 mg/ml en Tris-HCl 10 mM) que se reparte en diferentes volúmenes (de 0 ml a 25 ml) y se incuba con 2,5 ml del reactivo Bradford (Bio-Rad) durante 10 minutos. Los valores de absorbancia medidos a 595 nm se recogen y se representan gráficamente obteniendo la función lineal ($y = ax + b$).

Se incubaron 10 ml de cada una de las muestras del estudio con 2,5 ml de reactivo Bradford durante 10 minutos. Los valores de absorbancia recogidos se extrapolaron a la recta patrón previamente calculada y se calculó la concentración de proteína de cada muestra.

3.2.2.6 Electroforesis (SDS-PAGE)

Para separar las proteínas presentes en las muestras en base a su peso molecular se utilizó la electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida.

Primero se preparó el gel separador según lo descrito en la tabla 7. La mezcla se vertió en el espacio creado entre los dos cristales, añadiendo una capa de isopropanol para dejar lisa la superficie del gel separador. Se dejó polimerizar entre 15-20 minutos y se retiró el isopropanol de la parte superior. A continuación, se preparó el gel concentrador según lo descrito en la tabla 7. La mezcla se introdujo entre los cristales y se colocó un peine para la creación de las diferentes calles. Después de 15-20

minutos se retiró el peine y los geles se introdujeron en la cubeta electroforética. Se cubrió con tampón de electroforesis y se cargaron las muestras. En el caso de las muestras de endometrio, se cargó una concentración de 20-30 μg . Como control positivo para MOR se utilizó cortex cerebral humano (30 μg). Las proteínas se corrieron a 100V hasta que atravesaron el gel concentrador y a partir de entonces, migraron a 200V durante 1 h a través del gel separador.

3.2.2.7 Transferencia e inmunodetección

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Amersham Biosciences) usando el sistema *Mini Trans-Blot electrophoretic transfer system* (Bio-Rad Laboratories). La membrana y el gel se montaron en un sándwich de transferencia que contenía: esponja, papel *Whatman* (x3), gel, membrana de transferencia (PVDF), papel *Whatman* (x3) y esponja, todo previamente hidratado con el tampón de transferencia, excepto la membrana de PVDF que fue tratada con metanol. Las proteínas se transfirieron a la membrana a 100V durante 1 hora 30 minutos.

Para la inmunodetección, las membranas se sumergieron en leche desnatada en polvo al 5% disuelta en Blotto para bloquear los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos a la membrana. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo anti-MOR (Chemicon) a una concentración de 1:2500 durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron con Blotto (3x5 minutos) y se incubaron, durante 2h, con el anticuerpo secundario (IgG) (Affinity BioReagents) conjugado a peroxidasa a una concentración de 1:2500. La detección de las bandas se realizó empleando un sistema amplificador de la quimioluminiscencia (sistema ECL) que se produce tras la reacción catalizada por la peroxidasa sobre el peróxido de hidrógeno. La imagen correspondiente a dicha reacción se captó mediante el uso del Chemidoc™ XRS y se midió la concentración de proteína con el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories). Los resultados fueron normalizados con el control positivo ACTB (1:10000, Sigma).

3.2.2.8 Procesamiento de muestras de endometrio humano para IHC

Una vez obtenidas las muestras de las pacientes, éstas fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, un máximo de 48 horas, y posteriormente lavadas con etanol al 70% durante 24 horas a temperatura ambiente. La deshidratación se realizó mediante la inmersión del tejido en disoluciones de etanol de concentraciones crecientes (50%, 70%, 96% y 100%) durante 1 hora y 30 minutos cada una, en benzoato de metilo 2 horas y 45 minutos y en citrosol 45 minutos, utilizando un procesador

automático (Shandon Citadel 1000, Thermo Scientific). Finalmente fueron embebidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes histológicos de 4 μm de grosor con microtomo (Shandon Finesse 325, Thermo Scientific). Los cortes obtenidos se recogieron en portaobjetos previamente tratados con poly-L-lysine 1:10 (SIGMA).

3.2.2.9 Inmunohistoquímica

Se desparafinaron e hidrataron las muestras mediante la inmersión de las mismas en citrosol durante 25 minutos y sucesivos lavados en alcoholes de concentración decreciente (100, 96, 70 y 50%) de 10 segundos cada uno. Tras un lavado en agua de 5 minutos, se sumergieron en una solución de Citrato Trisódico (Tabla 7) hasta la ebullición (3 minutos) para realizar la recuperación antigénica. Se lavaron en agua destilada 5 minutos y posteriormente se sumergieron en PBS 1X y Tritón X-100 al 0.2% otros 5 minutos. A continuación, se llevó a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena mediante la incubación de las muestras durante 30 minutos en una solución de H_2O_2 3% y PBS 1X y se hicieron 2 lavados en PBS 1X de 5 minutos. Los portas se incubaron en cámara húmeda 30 minutos con suero de cabra (NGS; *Normal goat serum*) al 10% y PBS 1X-Tritón X-100 al 0.2%. Seguidamente, se añadió el anticuerpo primario Anti-MOR (Abcam) diluido (1:1100) en PBS 1X-Tritón X-100 0.2% y suero de cabra al 10% y se incubaron toda la noche a 4°C, en cámara húmeda.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las muestras 2 veces en PBS 1X durante 5 minutos. A continuación se añadió el anticuerpo secundario biotinilado (Vectastain Kit ABC) de cabra anti-conejo en una dilución 1:400 en PBS 1X-Tritón X-100 0.2% y suero de cabra al 2% durante 1 hora en cámara húmeda. Se lavaron las muestras 2 veces en PBS 1X 5 minutos. Para llevar a cabo el revelado se preparó el Vectastain Kit ABC (Vectorlabs) 30 minutos antes de aplicarlo y se incubaron las muestras en él 30 minutos. Después se realizaron dos lavados con PBS 1X y se añadió el cromógeno Nova Red (Vectorlabs) hasta observar color (1 minuto). Acto seguido se aclararon las muestras con agua corriente durante 5 minutos y se contrastaron con hematoxilina 6 segundos. Tras lavar de nuevo las muestras, se procedió a su deshidratación mediante lavados de 1 minuto en alcoholes de concentración creciente (95 y 100%) y se sumergieron en citrosol 3 minutos. Por último se montaron las secciones con medio de inclusión para histología VectaMount (VectorLabs).

3.2.2.10 Técnica de análisis de imagen y HSCORE

Todas las imágenes fueron capturadas con el microscopio óptico Olympus BX50 (Olympus Optical Co.) conectado a una cámara digital a color (Olympus XC50). Las imágenes obtenidas se analizaron con el software de análisis de imagen ImageJ.

La intensidad de marcaje y localización de MOR fue valorada digitalmente mediante el parámetro histológico semicuantitativo HSCORE (modificado de Fuhrich *et al.* 2013). Se establecieron cuatro niveles de intensidad de marcaje (0, 1, 2 y 3; inexistente, débil, moderado e intenso, respectivamente) que fueron asociados a cuatro rangos de intensidad de color (umbral 255-0) programados en ImageJ por tres evaluadores (0; 255-235, 1; 234-174, 2; 173-113, 3; 112-0). De esta forma, se midió la intensidad de marcaje de glándulas, estroma y epitelio luminal del tejido endometrial durante el ciclo menstrual (nueve réplicas de cada fase). Una vez obtenidos los datos, se llevó a cabo la siguiente fórmula:

$$\text{HSCORE} = \sum P_i (I + 1);$$

donde I es la intensidad de marcaje (0, 1, 2 y 3) y P_i es el porcentaje de células marcadas con dicha intensidad.

3.2.2.11 Análisis estadístico

Para analizar los datos de este primer capítulo se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0. Todos los resultados fueron clasificados y representado según las fases del ciclo menstrual mencionadas anteriormente (Fase I, II, III, IV y V). Los experimentos de análisis de mRNA y proteína fueron analizados usando el análisis de varianza de una vía (ANOVA). El test post hoc utilizado fue Bonferroni. Los experimentos de inmunohistoquímica se analizaron con Anova de 2 vías, considerando distintos compartimentos (epitelio luminal, glándulas, endotelio y estroma) junto con las distintas fases del ciclo menstrual. En este caso también se utilizó Bonferroni como test post hoc. La significancia fue establecida a $p < 0,05$ en todos los casos.

4 RESULTADOS

4.1

Implication of mu opioid receptor in the in vitro maturation of oocytes and its effects on subsequent fertilization and embryo development in mice

Implicación del receptor mu opioide en la maduración in vitro de ovocitos y su efecto en la subsiguiente fecundación in vitro y desarrollo embrionario en ratones

4.1 Implication of mu opioid receptor in the in vitro maturation of oocytes and its effects on subsequent fertilization and embryo development in mice

Estibaliz Olabarrieta, Lide Totorikaguena, Naiara Agirregoitia and Ekaitz Agirregoitia

Department of Physiology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia

SUMMARY

Oocyte maturation is the process by which immature oocytes acquire all the necessary characteristics for successful fertilization. The endogenous opioid peptides have been suggested to have a role modulating this process. However, little is known about its implication and the effect of exposing oocyte maturation to opioids on the subsequent fertilization and embryo development. Hence, in the present work, we focused on elucidating the function of the mu opioid receptor (OPRM1) in the modulation of the oocyte maturation. We analyzed the expression and localization of OPRM1 in mice oocytes and granulosa cells by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry. To observe the activity of the OPRM1, immature oocytes were incubated with morphine agonist and/or naloxone antagonist and we evaluated the PI3K/Akt and MAPK pathways, as well as the effect on the subsequent fertilization and embryo development. OPRM1 was present in mice oocytes and granulosa cells, changing its expression pattern depending on the maturation stage. Moreover, morphine, modulating PI3K/Akt and MAPK pathways, helped oocytes to reach blastocyst stage, which was reverted by naloxone. These results propose the OPRM1 as a possible therapeutic target for in vitro maturation culture medium, as it could improve the blastocyst rates obtained in the actual reproduction assisted techniques.

Key words: Opioids, oocyte, in vitro maturation, in vitro fertilization, embryo

INTRODUCTION

Oocyte *in vitro* maturation (IVM) is the process by which immature oocytes acquire, *in vitro*, all the characteristics required for successful fertilization (Lonegan y Fair 2016). This technique has been proposed as an alternative to the current methods used in assisted reproduction clinics, since a high dose of hormones would not be necessary for the patient, thus avoiding several side effects (Mehta 2014). However, it only represents the 0.04% of the assisted reproduction techniques (Sociedad Española de Fertilidad (SEF) 2016) due to its poor efficiency (Data collected from Spanish clinics).

The molecular mechanisms responsible for oocyte maturation are not completely understood and different molecules have been reported to be implicated as modulators of this process (Conti *et al.* 2012). Among these molecules, the endogenous opioid peptides could be interesting candidates because they are involved in the regulation of reproductive physiology at multiple sites (Fabbri *et al.* 1989). Endogenous opioid peptides (EOPs) exert their effects by binding to the G-protein-coupled receptors: δ -opioid receptor (OPRD1), κ -opioid receptor (OPRK1) and μ -opioid receptor (OPRM1) (Waldhoer *et al.* 2004). When those receptors are activated, among other effects, the adenylyl cyclase is inhibited, thus reducing cyclic AMP and blocking PKA (Mehlmann 2005; Madishetti *et al.* 2014). Moreover, opioids are also able to activate both PI3K/Akt and MAPK signaling pathways (Bodnar 2013).

It is well studied the inhibitory role of the opioid peptides in the secretion of GnRH at the hypothalamic level and the inhibition of the release of LH (Mehmanesh *et al.* 1988; Yilmaz y Gilmore 1999). However, the role of opioid system has also been described in the reproductive axis and appears to have a direct local action in gonads (Makrigiannakis *et al.* 1995). Opioid peptides such as β -endorphin, met-enkephalin and α -neoendorphin have been found in human and porcine follicular fluid (Petraglia *et al.* 1985; Słomczyńska *et al.* 1997) and an increased concentration of β -endorphin was related with follicle maturation (Petraglia *et al.* 1985; Facchinetti *et al.* 1988).

Opioid receptors have been described in oocytes and granulosa cells from various species at the different maturation stages (Dell'Aquila *et al.* 2008; Iorga *et al.* 2009; Agirreagoitia *et al.* 2012; Dang-Nguyen *et al.* 2013; Lunger *et al.* 2016). In mammals, oocytes are arrested at germinal vesicle stage (GV) and during meiotic resumption they evolve to mature oocytes at metaphase II (MII). Several studies have been carried on to determine the function of opioid peptides during this event. The

opioid antagonist naloxone appeared to modify the canine and porcine oocyte *in vitro* maturation, obtaining higher maturation rates when oocytes were matured in culture medium supplemented with low concentrations of naloxone (Iorga *et al.* 2009; Dang-Nguyen *et al.* 2013). Besides, the addition of β -endorphin to the IVM culture resulted in an inhibition of the maturation rates in rats, bovine and equine oocytes (Wai-sum 1990; Dell'Aquila *et al.* 2002, 2008). However, little is known about the effect of maturing oocytes with opioids on the fertilization and subsequent preimplantation embryo development. The oocyte preincubation with naloxone in bovine did not result in an improvement of the fertilization rate or blastocyst yield, but the inner cell mass from blastocysts increased (Dang-Nguyen *et al.* 2013). On the contrary, more recently, it has been seen that in patients with higher levels of β -endorphin, more matured oocytes were collected in assisted reproductive cycles (Jaschke *et al.* 2018), which would contradict the previous results obtained in other species.

As we have been able to verify, there is evidence suggesting a role for opioids during oocyte maturation, in fact, it is interesting to note that the signaling exerted by opioids is similar to that necessary for the meiosis resumption (Mehlmann *et al.* 2004; Freudzon *et al.* 2005). Even so, it is still unclear what could be the role of opioids in the maturation of oocytes. So that, in this study, we focused on elucidating the function of the mu opioid receptor in order to clarify the role of the opioid system in the modulation of the oocyte maturation. On one hand, we studied the expression and location-pattern of mu opioid receptor during oocyte maturation. On the other hand, we observed the mu receptor activity through agonism/antagonism (morphine/naloxone) experiments to determine if that receptor could modify some processes involved in oocyte maturation (as PI3K/Akt and MAPK pathways), as well as, the subsequent *in vitro* fertilization and *in vitro* embryo development in mice.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals and drugs

Adult mice used in this study (C57BL6/J x DBA/2J) were kept in an animal house under controlled conditions of temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and photoperiod (light/dark cycle 14 h:10 hr). Animals were given free access to water and food. Approval for this study was obtained from the Animal Research Ethical Committee of the University of the Basque Country (UPV/EHU CEEA reference number: M20-

2015-016-027-028-173) and all the experiments were performed according to the Guide for Care and use of Laboratory Animals, endorsed by the Society for the Study of Reproduction and European legislation. All the morphine (Alcaliber, S.A. Spain) and naloxone (SIGMA, UK) stock solutions used in this experimentation were prepared in phosphate-buffered saline-polyvinyl alcohol (PBS-PVA) 0.1%.

Isolation and in vitro maturation of cumulus-oocyte complexes (COCs)

Immature oocytes, in germinal vesicle (GV), were collected from 8 to 10 week-old ovaries of female mice superovulated by intraperitoneal injections of 7.5 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; Folligon, Intervet, Castle Hill, Australia) 48 hr earlier. Ovaries were placed in M2 medium and COCs were collected with the aid of a needle. Only COCs with three compact cumulus were used. COCs were matured for 17 hr in TCM-199 supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS, SIGMA, Spain) and 10 ng/ml epidermal growth factor (SIGMA, USA) at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ in air with maximum humidity. For some experiments that are described later, during this maturation, COCs were incubated with increased concentration of the OPRM1 selective agonist morphine (1 nM, 10 nM or 100 nM) and/or antagonist naloxone (10 µM). COCs containing the same amount of PBS-PVA 0.1% were used as an incubation control.

Reverse-transcription and PCR analysis

RNA from 20 oocytes of each maturation stage (GV, metaphase I -MI- and metaphase II -MII-) and granulosa cells (n=3) was isolated using the Dynabeads mRNA Direct Micro Kit (Ambion, Life Technologies AS, Oslo, Norway) according to the manufacturer's instructions. Immediately after extraction, the procedure for obtaining the cDNA was performed using the GoScript Reverse Transcription system (Promega, Madison, WI, USA). Positive control was performed using RNA from mice cerebral cortex.

Primers used for PCR were as follows: Oprm1, 5'-ATCCTCTCTTCTGCCATTGGT-3' and 5'-TGAAGGCGAAGATGAAGACA-3' (148-bp product; (Fu *et al.* 2014)) and mouse β-actin (ACTB), 5'-GCTTCTTTGCAGCTCCTTCG-3' and 5'-ACGGTTGGCCTTAGGGTTCA-3' (390-bp product) used as endogenous control. PCRs were performed using the following parameters: 95°C for 2 min, 40 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 5 min. The mixture was electrophoretically separated on a 2% agarose gel.

Immunofluorescence

Twenty oocytes of each maturation stage (GV, MI and MII) and granulosa cells were suspended in PBS-PVA 0.1% (n=3). Samples were washed in PBS-PVA 0.1% and fixed in 4% paraformaldehyde (Panreac, Barcelona, Spain) for 10 min at room temperature. They were then permeabilized by incubation in PBS-PVA 0.1% with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% Triton X-100 for 1 hr at room temperature. Afterwards, samples were incubated overnight at 4°C in PBS-PVA 0.1% containing 10% FCS and 1:200 rabbit polyclonal antibody anti-mu opioid receptor (Millipore, UK). Samples were washed three times in PBS-PVA 0.1% and then incubated in PBS-PVA 0.1% supplemented with 5% FCS serum and 1:500 goat polyclonal secondary antibody Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 2 hr at room temperature. Next, samples were washed three times in PBS-PVA 0.1%. In all cases, nuclei were stained with Hoechst 33342 (5 mg/ml) and finally, they were mounted in microdrops with Fluoromount G (EMS, Hatfield, United Kingdom) and examined by confocal microscopy (ApoTome.2; Zeiss). Negative controls were performed in the same way, except for omission of the primary antibody before secondary antibody addition.

pAKT and pERK1/2 signaling evaluation

To evaluate the activation of phosphorylated AKT and phosphorylated ERK1/2 signaling during oocyte *in vitro* maturation process, COCs were incubated with increased concentration of the OPRM1 selective agonist morphine (1 nM, 10 nM or 100 nM), and the same procedure as the previous section was followed with oocytes (20, n=3) collected at different times of the maturation process (0h, 30 min, 1, 8 and 17 hr for AKT and 0h, 10 min, 30 min and 17 hr, for ERK1/2). In this case, samples were incubated overnight at 4°C in PBS-PVA 0.1% containing 10% FCS and 1:200 rabbit phospho-Akt (Ser473) or 1:400 rabbit polyclonal phospho-ERK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

In vitro fertilization of oocytes and culture of embryos

Using COCs matured in presence of OPRM1 agonist and/or antagonist we performed the *in vitro* fertilization (IVF) and the culture of the embryos achieved. Sperm from male mice (C57BL6/J x DBA/2J), and of proven fertility, were incubated for 1 hr in HTF medium under 5% CO₂ at 37°C for capacitation. Isolated COCs were transferred to 500µl equilibrated HTF drops and were overlaid with

mineral oil and a concentration of 1×10^{-6} spermatozoa/ml was used to carry out the *in vitro* fertilization (IVF) (n=5).

Five hours after IVF, presumptive zygotes were washed in HTF medium and cultured in 25 μ l drops of equilibrated culture medium KSOM overlaid with mineral oil at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ in air with maximum humidity. Embryos were cultured for 24 hr, and cleavage rates were assessed 24 hr after fertilization.

To assess whether adding morphine or naloxone affected rates of oocyte nucleus maturation and fertilization, the presence of the first polar body and pronuclear formation were identified respectively at 24 hr after fertilization. The presumptive zygote that had not divided into 2 cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and then stained with Hoechst 33342 for observation with immunofluorescence microscope (Axioskop, Zeiss) under UV light.

In vivo maturation and isolation of oocytes

To verify that the *in vitro* fertilization process was correctly done, we performed a control condition with oocytes matured *in vivo*. *In vivo* matured oocytes (mostly on MII), were collected from 8- to 10-week-old oviducts of female mice superovulated by intraperitoneal injections of 7.5 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; Folligon, Intervet, Castle Hill, Australia), followed, 48hr later, by 7.5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG; Veterin Corion; Divasa-Farmavic S.A., Spain). Briefly, at 14 hr after hCG administration, oviducts were removed from superovulated female mice and placed in a Petri dish containing M2 medium at room temperature. After washing, collected oviducts were placed in fresh M2 medium and COCs were released from the ampulla with the aid of a needle and washed in new M2 medium until fertilization.

Statistical analysis

All statistical tests were performed by Graph Pad Prism 5 software and IBM SPSS Statistics 21.0. MII, zygote and cleavage rates between the different conditions were normalized as a fold over control group and tested for normality of the distribution (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene test). The data were normally distributed and compared by two-way analysis of variance (ANOVA). Bonferroni was used as a post hoc test. Significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Oprm1 mRNA expression in mouse oocytes and granulosa cells

We evaluated by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) the presence of the transcript for *Oprm1* gene in the different stages of the mouse oocyte's maturation, as well as in the granulosa cells at the moment of the extraction from the ovary. The obtained transcript was compared with the transcript for *Oprm1* of mouse cerebral cortex as a positive control. The expected 148 bp fragment was detected in the germinal vesicle stage and in granulosa cells, whereas in MI and MII stage the signal was missing (Figure 1). To verify that the cDNA generation was correct, the housekeeping gene *Actb* was detected in all cases at the expected 398 bp (Figure 1).

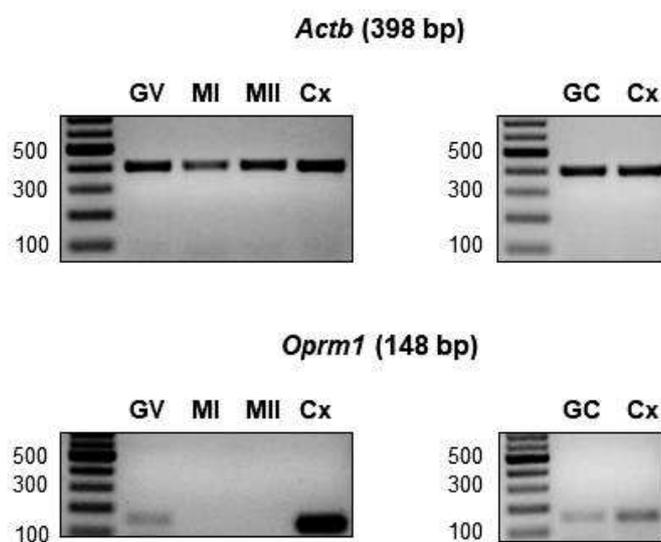


Figure 1. Reverse transcription PCR products for *Oprm1* and β -actin (*Actb*) in each maturation stage of mouse oocytes (Germinal vesicle -GV-, metaphase I -MI- and metaphase II -MII-), granulosa cells (GC) and cerebral cortex (Cx), used as positive control. Base pairs are indicated on the left side. Representative RT-PCR experiment is shown (n=3).

The primers used were located on different exons to avoid the amplification of genomic DNA and the retrotranscriptase negative controls were performed to assure the absence of that genomic DNA (data not shown).

Immunolocalization of OPRM1 in mouse oocytes and granulosa cells

Immunofluorescence analysis revealed that OPRM1 protein was present in mouse oocytes (Figure 2); but, its localization differed at the different stages of the maturation process. At the germinal vesicle stage (GV) the OPRM1 protein was detected homogeneous over the oocyte. Then, it was more externalized at MI stage, while finally it was identified in a peripheral location at the mature oocyte (MII). The OPRM1 protein was also found in a granulosa pool (GC) extracted directly from the ovary. When primary anti-OPRM1 antibody was omitted before secondary antibody addition, the fluorescent staining pattern was not evident (data not shown).

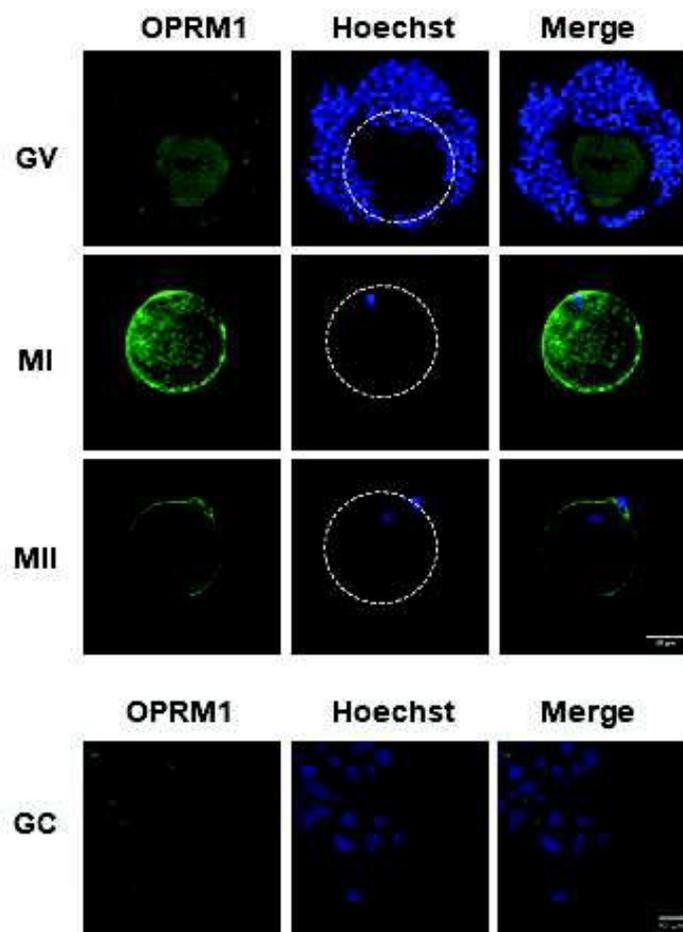


Figure 2. Immunolocalization of mu opioid receptor (OPRM1) in mouse oocytes in each maturation stage (Germinal vesicle -GV-, metaphase I -MI- and metaphase II -MII-) and granulosa cells (GC). Representative microphotography showing the distribution of OPRM1, in green, and hoechst-labelled DNA, in blue (n=3). Scale bar represents 25 μ m in oocytes images and 10 μ m in granulosa cells image.

Modulation of AKT and ERK1/2 signaling by opioid agonist morphine during mouse oocyte maturation

To further understand the physiologic relevance of opioid signaling during oocyte maturation process, we analyzed the modulation of AKT and ERK1/2 proteins by the selective mu opioid agonist morphine. Immature oocytes were collected from ovaries of superovulated female mice and we incubated them for 17 hr with increased concentration of morphine (0 nM, 1 nM, 10 nM and 100 nM).

To see the modulation of AKT, we analyzed oocytes at different times (0hr, 30 min, 1hr, 8hr and 17hr). As it is observed in the Figure 3, in the presence of morphine 1 and 10 nM, the signaling for phosphorylated AKT increased in the oocyte by the time of 30 min, while in the case of control, it did not until 8 hr.

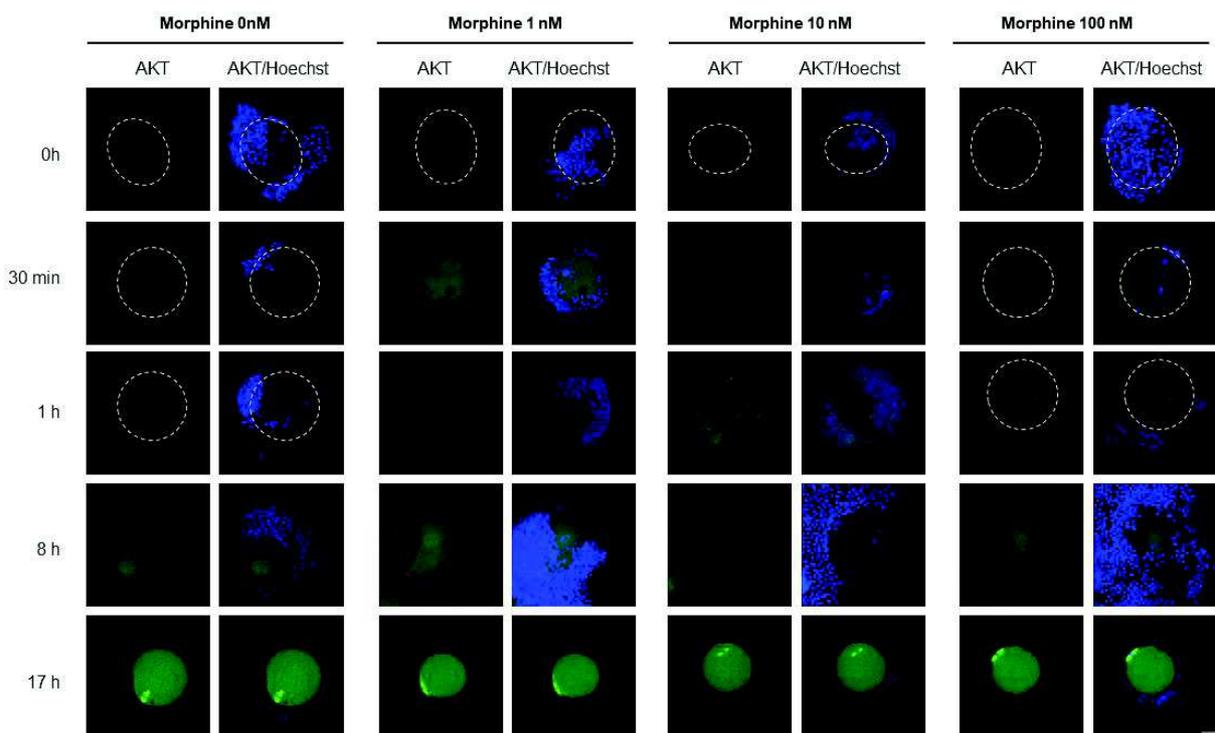


Figure 3. Activation of AKT signaling by morphine during mouse oocyte maturation. Immature oocytes were cultured in vitro during 17 h in presence of morphine (1, 10 and 100 nM) and phosphorylated AKT was observed at 0 h, 30 min, 1, 8 and 17 h. Representative microphotography showing the distribution of pAKT, in green, and hoechst-labelled DNA, in blue (n=3). Scale bar represents 50 μ m.

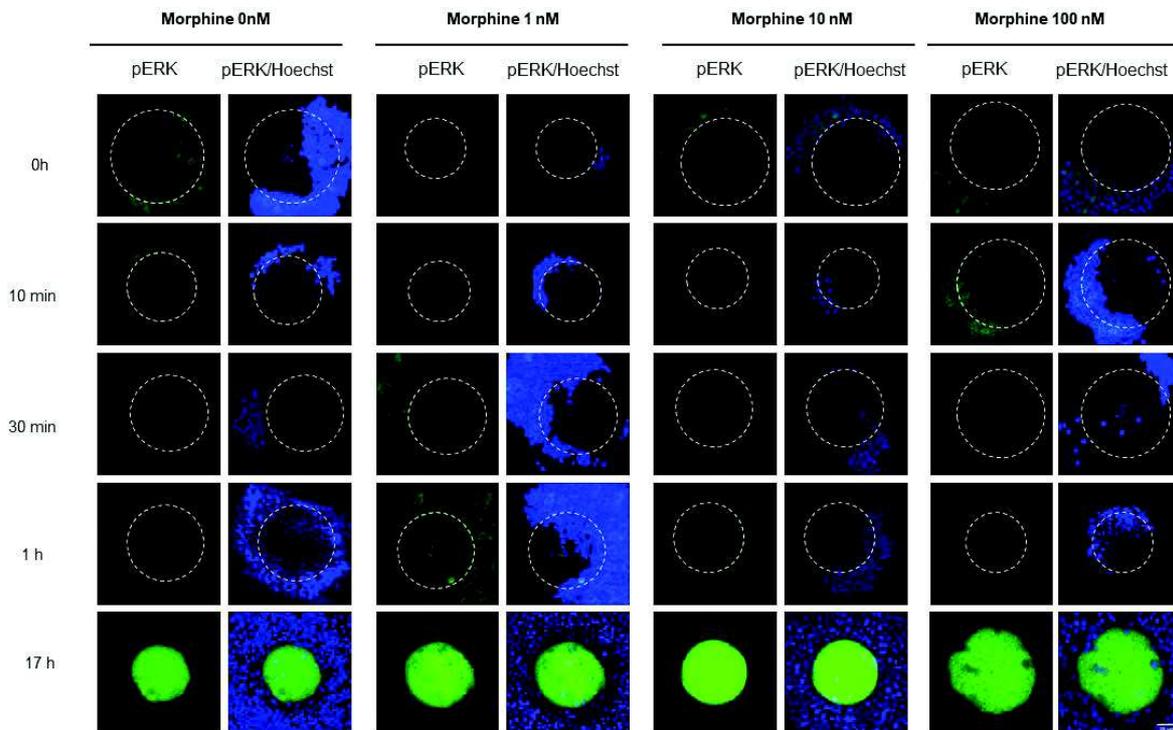


Figure 4. Activation of ERK1/2 by morphine during mouse oocyte maturation. Immature oocytes were cultured *in vitro* during 17 h in presence of morphine (1, 10 and 100 nM) and phosphorylated ERK1/2 was observed at 0 h, 10 min, 30 min, 1, and 17 h. Representative microphotography showing the distribution of pERK1/2, in green, and hoechst-labelled DNA, in blue. n=3. Scale bar represents 50 μ m.

Furthermore, in the presence of morphine 10 nM, this effect did not only affect the oocyte but also the granulosa cells, being phosphorylated at 1 hr. The incubation with morphine 100 nM did not present a variation in the phosphorylation pattern of AKT.

We also observed the effect of morphine on the modulation of ERK1/2 and, so that, we analyzed oocytes at different times (0hr, 10 min, 30 min, 1hr and 17hr) (Figure 4). We detected a variation in the phosphorylation pattern of ERK1/2 in the presence of morphine 1 and 10 nM. At the time of 30 min, in the control condition, the granulosa cells decreased the intensity of phosphorylated ERK1/2, whereas in the presence of the mentioned concentrations of morphine, this intensity maintained until 1 hr. In the presence of morphine 100 nM this effect was not observed.

Effect of opioid agonist morphine during oocyte maturation on in vitro fertilization and subsequent embryo development

After observing the modulation of AKT and ERK1/2 by morphine during oocyte maturation, we examined whether this effect observed in oocyte maturation could modify the *in vitro* fertilization (IVF) and the subsequent embryo development. We fertilized *in vitro* oocytes that had been incubated in the presence of increasing concentrations of morphine (0, 1, 10 and 100 nM) during the maturation process. Although there were not statistically significant differences at previous stages (metaphase II, zygote and two-cell-embryo), we observed an increase in the number of generated blastocysts when the oocytes had been matured in the presence of all the concentrations of morphine ($p < 0.05$; Figure 5).

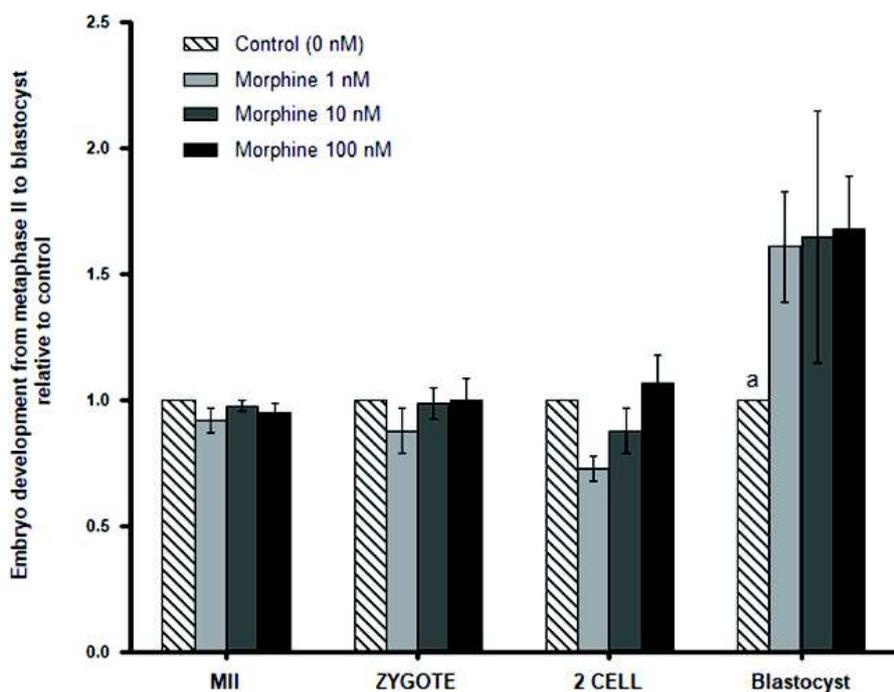


Figure 5. MII oocytes recovered from mice, fertilized oocytes (zygote), 2 cell-stage embryos and blastocysts after *in vitro* fertilization using oocytes that had been incubated with increased concentration of morphine (1nM, 10nM and 100nM). Relative results to control group (0 nM) are shown and results are the means \pm S.E.M. of 5 independent experiments. The different combinations of letters indicate significant differences between groups; $p < 0.05$ in all cases.

Effect of opioid antagonist naloxone during oocyte maturation on *in vitro* fertilization and subsequent embryo development

Finally, it was examined if the observed effect of morphine during oocyte maturation in the *in vitro* fertilization and subsequent embryo development could be blocked by the opioid antagonist naloxone. For this procedure we chose to antagonize the morphine concentration of 10 nM, as it was the concentration where it could be appreciated more changes in all the experiments previously mentioned. The procedure was the same as in experiments with agonists but, in this case, oocytes were also incubated with naloxone (10 μ M) and both naloxone (10 μ M) and morphine (10 nM). The effect of morphine 10 nM on the number of produced blastocysts was blocked by naloxone ($p < 0.05$) while the antagonist alone did not produce any change (Figure 6).

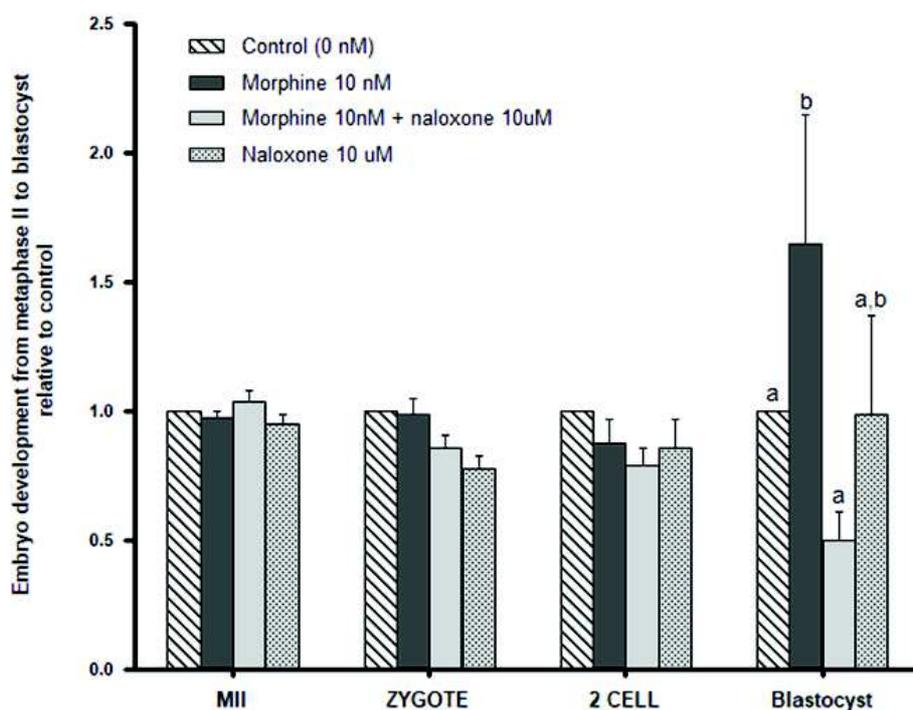


Figure 6. MII oocytes recovered from mice, fertilized oocytes (zygote), 2 cell-stage embryos and blastocysts after *in vitro* fertilization using oocytes that had been incubated with morphine (100nM), naloxone (10uM) and both together. Relative results to control group (0 nM) are shown and results are the means \pm S.E.M. of 5 independent experiments. The different combinations of letters indicate significant differences between groups; $p < 0.05$ in all cases.

DISCUSSION

In the present study, mu opioid receptor expression analysis was performed in mice oocytes and granulosa cells and, for the first time, it was evaluated the effect of mu opioid agonist and/or antagonist during oocyte maturation in the PI3K/Akt and MAPK pathways and subsequent fertilization and embryo culture.

During the evaluation of *Oprm1* gene and protein in mice oocytes, it was observed a different expression pattern depending on the maturation stage. The *Oprm1* transcript was present at GV stage and granulosa cells, whereas at MI and MII stages no signal was detected. This fact has been described previously for other transcripts (Agirregoitia *et al.* 2012; López-Cardona *et al.* 2016, 2017) since mRNA is selective degraded during oocyte maturation and transcription becomes silent from the resumption of meiosis until two-cell stage in mice (Picton *et al.* 1998; Gosden y Lee 2010). Mu opioid receptor transcript has also been detected in oocytes and granulosa cells from other species, such as bovine, equine, human or porcine (Dell'Aquila *et al.* 2002, 2008; Agirregoitia *et al.* 2012; Dang-Nguyen *et al.* 2013; Lunger *et al.* 2016). OPRM1 protein was detected in all maturation stages, changing its localization during maturation; from a homogenous location at GV stage to a peripheral location on mature oocyte. Although we did not detected mRNA at MI and MII, it is known that the timing and pattern of RNA synthesis in the oocyte may not necessarily coincide with translation into an active protein (Picton *et al.* 1998; Gosden y Lee 2010). According to its localization, given that G-coupled receptors need to reach the cell surface so as to act (Cahill *et al.* 2007), OPRM1 could become active from MI to MII stages, which suggests that opioid system, via mu opioid receptor, is a conserved mechanism during oocyte maturation. The protein expression pattern of OPRM1 during maturation has also been studied in human where the peripheral location was detected at GV and MI stages (Agirregoitia *et al.* 2012). In equines, nonetheless, the protein distribution was homogenous over the oocyte at all stages of maturation (Dell'Aquila *et al.* 2008). Taking into account these data, the protein expression pattern could vary depending on the specie. Even so, we must bear in mind that obtaining oocytes from experimental animals is much more controlled than obtaining human oocytes from the clinic, so it does not seem that the maturation stages from each species can be fully comparable.

For the purpose of elucidating if mu opioid receptor was indeed active during oocyte maturation, agonism experiments were performed to verify, among others, whether some components of

important maturation pathways, such as AKT and ERK (Schmitt y Nebreda 2002), varied their phosphorylation-pattern. It has been seen that AKT activation is crucial for successful MI/MII transition, polar body emission and spindle organization (Tomek y Smiljakovic 2005; Kalous *et al.* 2009; Cecconi *et al.* 2010). In our results, the oocyte AKT phosphorylation increased after 8 hours of *in vitro* maturation, coinciding with other studies (Chouzouris *et al.* 2017; Kumar *et al.* 2018). When the oocytes were incubated along with morphine 1 and 10 nM, an earlier AKT activation was detected in oocytes (at 30 min) and granulosa cells (at 1 h). Although there is no previous evidence of opioid action on AKT phosphorylation in oocytes, morphine is able to stimulate its phosphorylation in neuronal cells (Madishetti *et al.* 2014). Likewise, it has been described that the exposure to cannabinoids, very related to opioids due to their similar action mechanism, was able to accelerate the AKT activation both in granulosa cells and oocytes during maturation in bovine and mice (López-Cardona *et al.* 2016, 2017).

MAP kinase, also called extracellular-regulated kinase (ERK1/2), presents also an important role in oocyte maturation. ERK1/2 is necessary for meiotic resumption and it is involved, among others, in the regulation of microtubule organization, meiotic spindle assembly and pronuclear formation after fertilization (Fissore *et al.* 1996; Fan y Sun 2004). Our data showed a variation in the phosphorylation pattern of ERK1/2 when oocytes were matured with morphine 1 and 10 nM. The ERK1/2 phosphorylation in granulosa cells maintained until 1 h of incubation whereas, in the control group, the dephosphorylation began at 10 min. In preovulatory follicles, ERK1/2 is activated for a relatively short period of time (from 0.5 to 2 hours) in granulosa cells exposed to LH/hCG (Maizels *et al.* 1998; Fan *et al.* 2008; Panigone *et al.* 2008), and this brief window of activation is necessary and sufficient to reprogram preovulatory GCs to cease dividing and terminally differentiate (Fan *et al.* 2009). In fact, the inappropriate activation of ERK1/2 in granulosa cells of small growing follicles might disrupt normal follicular development (Fan *et al.* 2009). Thus, perhaps the maintenance of the ERK1/2 phosphorylation in the granulosa cells for a longer time, induced by the activation of the OPRM1, may explain that the improvement in the proportion of blastocysts achieved is due to a more adequate oocyte maturation compared to the control oocytes. Opioid-induced activation of ERK1/2 has been widely studied (Fukuda *et al.* 1996; Schulz *et al.* 2004), but there is only one previous study in bovine oocytes, where it was also seen that opioids could modulate this pathway, specifically, at high concentration of naloxone (1 mM) COCs presented a higher activity of ERK (Dell'Aquila *et al.* 2002).

Finally, it was interesting to observe if the activation of the mu opioid receptor during the oocyte maturation had any action in relation to the subsequent fertilization and embryo development. So that, oocytes were incubated with agonist and/or antagonist (morphine and naloxone) during its *in vitro* maturation. There were not differences on the maturation rates in any of the treatments done. Previous studies in other species showed how naloxone could reduce maturation rates at high concentrations and, in contrast, increase them at low concentrations, suggesting a dose-dependent effect (Dell'Aquila *et al.* 2002, 2008; Dang-Nguyen *et al.* 2013). However, in the only research continuing with the fertilization of those oocytes, naloxone did not affect the subsequent fertilization and the embryo culture, although it did increase the ICM ratio from blastocyst (Dang-Nguyen *et al.* 2013). Thus, we performed the IVF and the embryo culture with the experimental oocytes and it was observed a significant increase in the blastocyst yield reached on Day 4 after IVF when morphine (1 nM, 10 nM and 100 nM) was added to the maturation media. In addition, this effect was blocked by naloxone (10 μ m).

In conclusion, OPRM1 is present in mice oocytes and granulosa cells, changing the expression pattern depending on the maturation stage. Moreover, for the first time, it is showed that the OPRM1 agonist morphine, modulating PI3K/Akt and MAPK pathways involved in oocyte maturation, helped oocytes to reach blastocyst stage, which was blocked by the OPRM1 antagonist naloxone. These results propose the mu opioid receptor as a possible therapeutic target for IVM culture medium, since it could improve the blastocyst rates obtained in the actual reproduction assisted techniques. Nevertheless, more studies should be done to broaden the knowledge of its mechanism and check the quality of those produced blastocysts.

4.2

Mu opioid receptor expression and localisation in murine spermatozoa and its role in IVF

Expresión y localización del receptor mu opioide en espermatozoides murinos y su función en la fecundación *in vitro*

4.2 Mu opioid receptor expression and localisation in murine spermatozoa and its role in IVF

Estibaliz Olabarrieta, Lide Totorikaguena, Jon Romero-Aguirregomezorta, Naiara Agirregoitia and Ekaitz Agirregoitia

Department of Physiology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia

SUMMARY

The endogenous opioid peptides are reported to be involved in the regulation of reproductive physiology. Many of the studies conclude with statements on the harmful effect of opioids on male fertility but, in fact, there are no studies regarding the real fertilisation potential of spermatozoa that have been exposed to opioids. The aim of the present study was to examine if modulation of mu opioid receptor (OPRM1) in murine spermatozoa during capacitation influenced embryo production after IVF. The presence of OPRM1 in murine mature spermatozoa was analysed by reverse-transcription polymerase chain reaction and immunofluorescence. We analysed the involvement of OPRM1 on IVF and pre-implantational embryo development by incubating the spermatozoa with the agonist morphine and/or antagonist naloxone. We verified the presence of OPRM1 in murine mature spermatozoa, not only at the mRNA level but also at the protein level. Moreover, incubation of the spermatozoa with morphine, before IVF, had an effect on the fertilisation rate of spermatozoa and reduced the numbers of blastocysts, which was reversed by naloxone. Considering that opioids are widely used clinically, it is important to take into account their effect, via OPRM1, on the fertility of patients.

Key words: capacitation, embryo, *in vitro* fertilisation, oocyte, OPRM1.

INTRODUCTION

The endogenous opioid peptides (EOPs) are substances derived from proopiomelanocortin (POMC), proenkephalin (PENK) and prodynorphin (PDYN) precursors and they exert their effects by binding to the G-protein-coupled receptors δ -opioid receptor (OPRD1), κ -opioid receptor (OPRK1) and μ -opioid receptor (OPRM1) (Waldhoer *et al.* 2004). EOPs are involved in intercellular communication and it is known that they participate in the regulation of reproductive physiology at multiple sites (Fabbri *et al.* 1989). In fact, the opioid system has been described in many of the male and female reproductive tissues and it appears to be increasingly important in sperm cell function (Fraiooli *et al.* 1984; Ragni *et al.* 1988).

The study of the effect of opioids in sperm began when it was discovered that opium users had reduced sperm motility, a condition known as asthenozoospermia (Ragni *et al.* 1988). Thereafter, its relevance increased because opiates are widely used clinically to treat moderate to severe pain (van Amsterdam y van den Brink 2015) and the side effects on reproduction are not yet completely known. Very high concentrations of endorphins and enkephalins have been found in human semen and sperm cells (Foresta *et al.* 1986; Davidson *et al.* 1989; Kew *et al.* 1990). Thus, continuing those studies, the presence of the three opioid receptors in human spermatozoa was described (Agirregoitia *et al.* 2006; Albrizio *et al.* 2006), as well as the presence of mu and delta receptors in equine sperm cells (Albrizio *et al.* 2005, 2010). In those studies, the authors showed how some opioids, such as morphine, naloxone and naltrindole, were able to modify the sperm motility and capacitation. Furthermore, it seems that the opioid-degrading enzymes are involved in the control of sperm motility (Subirán *et al.* 2008, 2010, 2012). More recently, it has been described that β -endorphin stimulates the acrosome reaction in human spermatozoa (Urizar-Arenaza *et al.* 2016).

However, in addition to the effects on mature spermatozoa, a possible role in the regulation of murine spermatogenesis via opioid receptors has been suggested (Estomba *et al.* 2016; Takzare *et al.* 2016). Moreover, when the *Oprm1* gene is disrupted, mice show reduced sperm count and sperm motility (Tian *et al.* 1997). A possible effect of opiate exposure on epigenetics has been also proposed, because in opiate drug addicts the *Oprm1* gene promoter region in both blood cells and sperm cells is hypermethylated (Chorbov *et al.* 2011).

Several of the aforementioned studies conclude with statements about the harmful effect of opioids on male fertility but, in fact, although all data lead to that conclusion, there are no studies related to the real fertilisation potential of spermatozoa that have been in contact with opioids. Therefore, the goal of the present study was to determine whether modulation of OPRM1 in mice spermatozoa during capacitation affected embryo production after IVF.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Approval for this study was obtained from the Animal Research Ethical Committee of the University of the Basque Country (UPV/EHU CEEA reference number: M20-2015-016-027-028-173) and all the experiments were performed according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, endorsed by the Society for the Study of Reproduction and European legislation. Adult mice used in this study (C57BL6/J x DBA/2J) were kept in an animal house under controlled conditions of temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and photoperiod (light/dark cycle 14 h:10 h), with free access to water and food.

Reverse-transcription PCR

The 2-month-old male mice were killed by cervical dislocation and spermatozoa were removed from the epididymis in human tubal fluid (HTF) medium with the aid of a needle (30 gauge). After a 10-min centrifugation (room temperature, 600g), RNA from spermatozoa was isolated using the Dynabeads mRNA Direct Micro Kit (Ambion, Life Technologies AS). Immediately after extraction, the procedure for obtaining the cDNA was performed using the GoScript Reverse Transcription system (Promega), according to manufacturer's instructions. Positive control was performed using RNA from murine cerebral cortex.

Primers used for PCR were as follows: OPRM1, 5'-ATCCTCTCTTCTGCCATTGGT-3' and 5'-TGAAGGCGAAGATGAAGACA-3' (148-bp product; (Fu *et al.* 2014)) and mouse B-actin (ACTB), 5'-GCTTCTTTGCAGCTCCTTCG-3' and 5'-ACGGTTGGCCTTAGGGTTCA-3' (390-bp product) used as endogenous control. The primers were located on different exon of each respective gene (i.e., they spanned introns). Even so, we verified the possible carryover of genomic DNA during the extraction

process by performing PCR in the absence of reverse transcriptase. If genomic DNA were present, it would be amplified in subsequent PCR. PCRs were performed using the following parameters: 95°C for 2 min, 40 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 5 min. The mixture was electrophoretically separated on a 2% agarose gel.

Immunofluorescence

Isolated spermatozoa were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) and smeared onto a slide coated with poly-L-lysine. Samples were washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (Panreac) for 10 min at room temperature. The OPRM1 receptor was immunocytochemically detected in cells that had been treated in the presence or absence of 1% Triton X-100, in PBS with 10% fetal calf serum (FCS) for 1 h at room temperature, to detect the presence of intracellular receptor and surface expressed receptor, respectively. Afterwards, spermatozoa were incubated overnight at 4°C in PBS containing 10% FCS and 1:200 rabbit polyclonal antibody anti-OPRM1 (Millipore). Spermatozoa were washed three times in PBS and then incubated in PBS supplemented with 5% FCS serum and 1:500 goat polyclonal secondary antibody Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) for 2 h at room temperature. Next, spermatozoa were washed three times in PBS. In all cases, nuclei were stained with Hoechst 33342 (5 mg/ml) and finally, spermatozoa were mounted in microdrops with Fluoromount G (EMS) and examined by confocal microscopy (LSM 800; Zeiss). Negative controls were performed in the same way, except for omission of the primary antibody before secondary antibody addition.

Isolation and in vivo maturation of oocytes

In vivo matured oocytes, in MII, were collected from the oviducts 8- to 10-week-old female mice superovulated by intraperitoneal injections of 7.5 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; Folligon), followed, 48h later, by 7.5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG; Veterin Corion). Briefly, at 14 h after hCG administration, oviducts were removed from superovulated female mice and placed in a Petri dish containing M2 medium at room temperature. After washing, the collected oviducts were placed in fresh M2 medium and cumulus-oocyte complexes (COCs) were released from the ampulla with the aid of a needle and washed in new M2 medium until fertilisation.

In vitro fertilisation of oocytes

Spermatozoa from male mice (C57BL6/J x DBA/2J), of proven fertility, were incubated for 1 h in HTF medium under 5% CO₂ at 37°C for capacitation. During capacitation, spermatozoa were incubated with increased concentration of the main OPRM1 selective agonist morphine (1 nM, 10 nM or 100 nM) and/or the main antagonist naloxone (10 µM) (K_i: 1,4 and 1,78 nM, respectively). The morphine (Alcaliber) and naloxone (SIGMA) stock solutions were prepared in PBS-Polyvinyl alcohol (PVA) 0.1%. Spermatozoa containing the same amount of PBS-PVA 0.1% were used as an incubation control. After *in vivo* maturation, isolated COCs were transferred to 500µl equilibrated HTF drops and overlaid with mineral oil; a concentration of 1 x 10⁶ spermatozoa/mL was used to carry out the IVF.

At 5 h after IVF, presumptive zygotes were washed in HTF medium and cultured in 25µl drops of equilibrated culture medium KSOM overlaid with mineral oil at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ in air with maximum humidity. Embryos were cultured for 5 days, and cleavage rates were assessed on Day 1 (24 h after fertilisation) and blastocysts on Day 4 (96–100 h after fertilisation).

To assess whether adding morphine or naloxone affected rates of oocyte nucleus maturation and fertilisation, the presence of the first polar body and pronuclear formation were identified respectively at 24 h after fertilisation. The presumptive zygote that had not divided into two cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and then stained with Hoechst 33342 for observation with immunofluorescence microscopy (Axioskop, Zeiss) under UV light.

Statistical analysis

All statistical tests were performed by Graph Pad Prism 5 software and IBM SPSS Statistics 21.0. Cleavage rates and blastocyst yields between the different conditions were tested for the normality of distribution (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene test). The data were normally distributed and compared by two-way ANOVA. Bonferroni was used as a post hoc test. Significance was set at P<0.05.

RESULTS

Oprm1 mRNA expression in murine spermatozoa

The presence of the *Oprm1* was evaluated by RT-PCR. We studied the presence of the transcript for *Oprm1* in murine spermatozoa and compared it with the transcript for *Oprm1* in the murine cerebral cortex as a positive control. The expected 148 bp fragment was detected in both cerebral cortex and spermatozoa (Fig 1). To verify that the RNA extraction and the cDNA generation were correct, the housekeeping gene *Actb* was detected in both tissues at the expected 398 bp (Fig 1). The primers used were located on different exons to avoid the amplification of genomic DNA and the retrotranscriptase negative controls were performed to assure the absence of that genomic DNA (Fig 1).

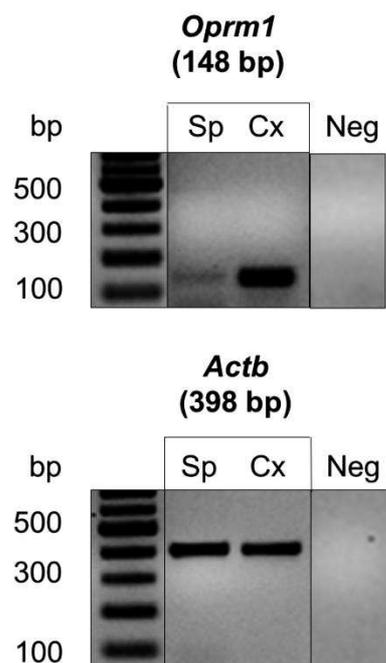


Figure 1. Expression of the mu opioid receptor gene *Oprm1* in mouse spermatozoa. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) products for *Oprm1* and β -actin (*Actb*) in murine spermatozoa (Sp) and cerebral cortex (Cx), used as positive control. -RT indicates the negative control obtained in the absence of reverse transcriptase. Base pairs are indicated on the left side, representative RT-PCR experiment is shown (n=3).

Immunolocalisation of OPRM1 in murine spermatozoa

Immunofluorescence analysis revealed that OPRM1 protein was present in murine sperm cells, under permeabilised (Fig 2A) and non-permeabilised (Fig 2B) conditions. Specifically, OPRM1 labeling was observed in the sperm head with more intensity at the acrosomal region and the tail. When primary anti-OPRM1 antibody was omitted before secondary antibody addition, the fluorescent staining pattern was not evident (Fig 2C).

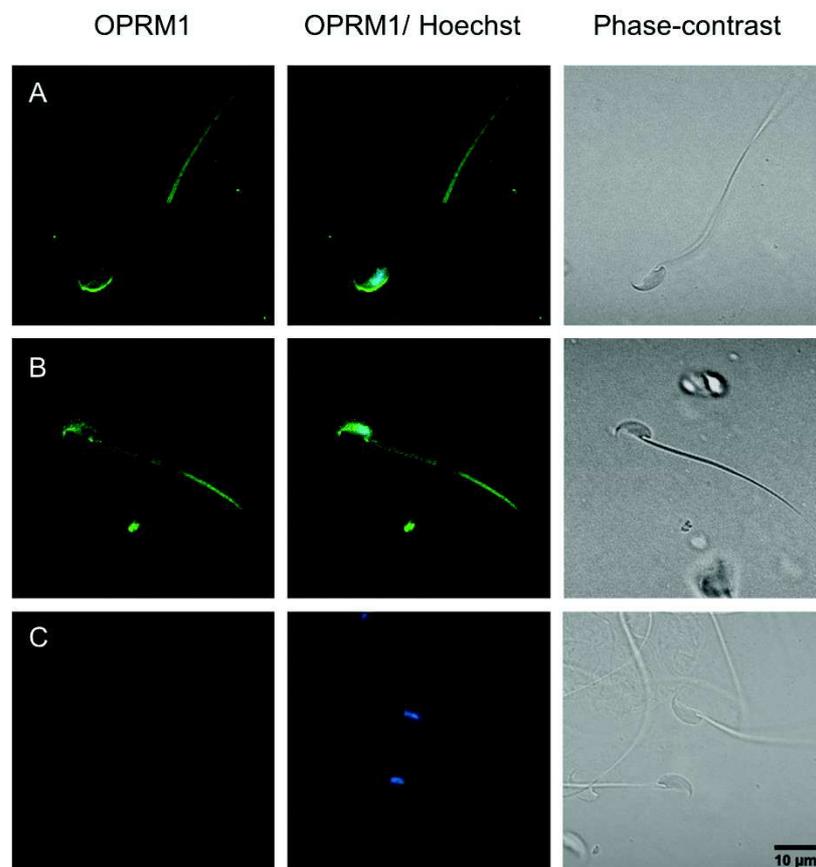


Figure 2. Immunolocalisation of mu opioid receptor protein OPRM1 in mouse spermatozoa under permeabilized (A) and non-permeabilized (B) conditions. Negative control without primary antibody is shown (C). Representative microphotography showing the distribution of OPRM1, in green, and hoechst-labelled DNA, in blue. It is also shown the phase-contrast image. n=3. Scale bar represents 10 μ m.

Effect of opioid agonist, morphine, during sperm capacitation on fertility and subsequent embryo development

We incubated murine spermatozoa with increasing concentration of the opioid agonist, morphine (0 nM, 1 nM, 10 nM and 100 nM) during the capacitation before IVF, and we used these spermatozoa to fertilise oocytes *in vitro*. We observed that when spermatozoa were incubated with morphine, both the IVF process and embryo development were impaired. This deleterious effect was dose-dependent, being higher with an increased concentration of morphine. Moreover, although the percentage of obtained oocytes in zygotes, 2-cell embryos and blastocysts was less in the experiments in which the spermatozoa had been capacitated in presence of morphine, we observed a significant difference ($p < 0.05$) in the blastocyst rate reached in the absence or presence of morphine at 100 nM (Fig 3).

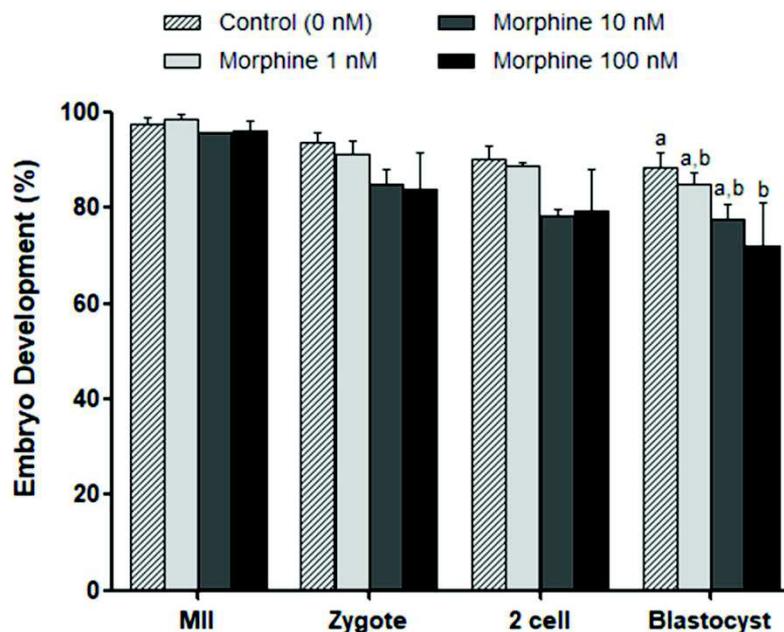


Figure 3. Embryo development from MII to blastocyst. Percentages of MII oocytes recovered from mice, fertilized oocytes (zygote), 2 cell-stage embryos and blastocysts after IVF using mice sperm incubated with increased concentration of morphine (0nM, 1nM, 10nM and 100nM). Results are the means \pm S.E.M. of 8 independent experiments. The different combinations of letters indicate significant differences between groups; $p < 0.05$ in all cases.

Effect of opioid antagonist, naloxone, during sperm capacitation on fertility and subsequent embryo development

We next examined whether the observed effect of morphine, specifically that produced by adding morphine 100 nM, during sperm capacitation could be blocked by naloxone. The procedure was the same as in experiments using the agonists but we also incubated the spermatozoa with naloxone (10 μ M). The incubation of spermatozoa only with naloxone did not generate any significant change in comparison with the control (Fig 4). However, sperm incubation with naloxone together with morphine 100 nM before IVF blocked ($p < 0.05$) the deleterious effect observed on the rate of 2 cell-embryos and blastocysts derived from spermatozoa incubated with morphine (Fig 4).

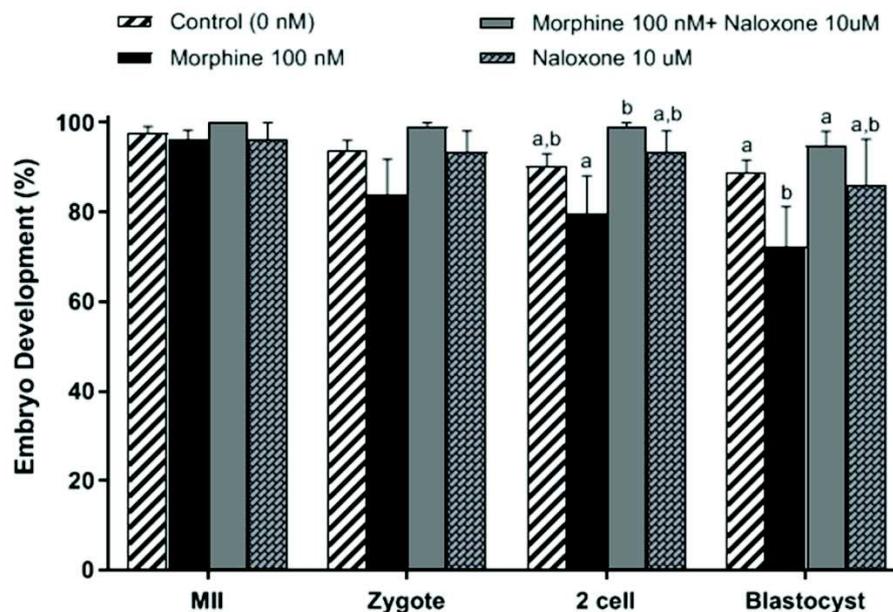


Figure 4. Embryo development from MII to blastocyst. Percentages of MII oocytes recovered from mice, fertilized oocytes (zygote), 2 cell-stage embryos and blastocysts after IVF using mice sperm incubated with morphine (100nM), naloxone (10uM) and both together. Results are the means \pm S.E.M. of 8 independent experiments. Significant differences between groups are indicated with different letters; $p < 0.05$ in all cases.

DISCUSSION

Since the presence of the endogenous opioids was described in the male reproductive system, several physiological roles have been suggested for these compounds and most studies have concluded that there is a harmful effect of opioids on male fertility (Drobnis y Nangia 2017). However, there are no studies regarding the real fertilisation potential of spermatozoa that have

been exposed to opioids. In our present work, we verified the presence of the OPRM1 in murine mature spermatozoa, not only at the mRNA level but also at the protein level. Moreover, we elucidated that spermatozoa incubated with the opioid agonist morphine, during the capacitation process, showed affected rates of fertilisation and decreased the numbers of embryos that reached blastocyst stage.

RT-PCR revealed the presence of *Oprm1* mRNA in murine spermatozoa, but less than in the cerebral cortex. The weak intensity of the mRNA band detected in our experiments could be related to the fact that there is a limited pool of RNAs stored from spermatogenesis that may have a role in early zygote development (Miller *et al.* 1999). However, it is widely accepted that mature spermatozoa do not perform transcription and translation processes because of scarcity of cytoplasm capable of supporting translation (Flesch y Gadella 2000). Moreover, in the final stages of spermatogenesis, the spermatozoa lose most of their cytoplasm, including most of the mRNA (Miller *et al.* 2005). Even so, mRNA of *Oprm1* has been previously detected in the murine spermatogenic cells (Estomba *et al.* 2016) and in human and equine mature spermatozoa (Albrizio *et al.* 2005; Agirreagoitia *et al.* 2006); which supports our findings.

Immunofluorescence analysis revealed the presence of the OPRM1 protein in the murine sperm head with more intensity at the acrosomal region, as described previously (Estomba *et al.* 2016), but also in the tail. The OPRM1 protein has been previously detected in other species: in the acrosomal region and tail of equine spermatozoa (Albrizio *et al.* 2005), in the acrosome, neck and principal piece of boar spermatozoa (Albrizio *et al.* 2005, 2014; Vicente-Carrillo *et al.* 2016) and, in human spermatozoa in equatorial/postacrosomal region and in the tail (Agirreagoitia *et al.* 2006), as well as in the acrosomal region and in the neck (Albrizio *et al.* 2006). Because of the highly polarised structure and function of spermatozoa, they require the compartmentalisation of particular metabolic and signaling pathways to specific regions (Aquila *et al.* 2004) and that is the reason why OPRM1 was first related to a possible function in the acrosome reaction and in motility. Today we know for certain that both the acrosome reaction (Urizar-Arenaza *et al.* 2016) and motility (Albrizio *et al.* 2005; Agirreagoitia *et al.* 2006; Vicente-Carrillo *et al.* 2016) can be modulated by OPRM1.

Even so, until now, we did not know the consequences of exposure of spermatozoa to opiates, in relation to their subsequent fertilisation capacity. Therefore, we examined the consequences of incubating murine spermatozoa with increasing concentration of morphine (0 nM, 1 nM, 10 nM and

100 nM) before IVF (during the capacitation process). We observed a dose-dependent downward trend in the rate of blastocysts formation when the spermatozoa had been in contact with morphine, becoming significant when spermatozoa were incubated in presence of 100 nM of morphine. On the other hand, co-incubation of spermatozoa with the opioid antagonist naloxone (10 μ M) with morphine blocked the deleterious effect of morphine (100 nM) on all studied stages of embryo development, being significant in the rates of forming 2 cell-embryos and blastocysts.

In summary, our data led us to hypothesise that OPRM1, modulating some sperm functions that occur during capacitation, could regulate the fertilisation process. Thus, enhancement of the acrosome reaction described by activation of spermatic OPRM1 (Urizar-Arenaza *et al.* 2016) and the decrease in sperm motility described by the activation of the same receptor (Agirregoitia, Subiran *et al.* 2012; Xu *et al.* 2013; Vicente-Carrillo *et al.* 2016), could, in reality, lead to a loss of the fertilising capacity of spermatozoa. In forthcoming studies, it could be interesting to check the quality of the embryos produced when spermatozoa are capacitated in the presence of morphine, in order to broaden our understanding of the mechanisms by which OPRM1 takes part in this process. These findings are of utmost importance considering that mu opioid agonists such as methadone, which is excreted in the semen and probably enters the vagina during sexual intercourse (Pichini *et al.* 1994), are widely used clinically (van Amsterdam y van den Brink 2015), as common analgesics and their effects on male fertility could be higher than previously thought.

4.3

Mu opioid receptor in the human endometrium: dynamics of its expression and localization during the menstrual cycle

Receptor mu opioide en el endometrio humano: dinámica de su expresión y localización a lo largo del ciclo menstrual

4.3 Mu opioid receptor in the human endometrium: dynamics of its expression and localization during the menstrual cycle

Lide Totorikaguena, B.S.,^{a†} Estibaliz Olabarrieta, B.S.,^{a†} Roberto Matorras, M.D., Ph.D.,^b Edurne Alonso, Ph.D.,^c Ekaitz Agirregoitia, Ph.D.,^{a*} and Naiara Agirregoitia, Ph.D.^{a*}

^a Department of Physiology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia; ^b Human Reproduction Unit, Cruces University Hospital, Biocruces, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia; and ^c Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia, Spain. [†] These authors should be considered similar in author order. * These authors should be considered similar in author order.

SUMMARY

Objective: To study the dynamics of expression and localization of the mu opioid receptor (MOR) in human endometrium throughout the menstrual cycle.

Design: Analysis of human endometrial samples from different menstrual cycle phases (menstrual, early/midproliferative, late proliferative/early secretory, midsecretory, and late secretory) by reverse transcription-polymerase chain reaction, Western blot and immunohistochemistry.

Setting: Academic research laboratory.

Patient(s): Women from the Human Reproduction Unit of the Cruces University Hospital, fulfilling the following criteria: normal uterine vaginal ultrasound; absence of endometriosis, polycystic ovary syndrome, implantation failure, or recurrent miscarriage; and no history of opioid drug use.

Intervention(s): Endometrial samples of 86 women categorized into groups for the menstrual cycle phases: 12 menstrual, 21 early/midproliferative, 16 late proliferative/early secretory, 17 midsecretory, and 20 latesecretory.

Main outcome measure(s): MOR gene and protein expression and localization in the different compartments of the human endometrium at different stages of the menstrual cycle.

Result(s): The expression of MOR mRNA and protein changed throughout the cycle in human endometrium. MOR expression increased during proliferative phase and decreased during the secretory one. Lower values were found at menstruation, and maximum values around the time of ovulation. Small variations for each endometrial compartment were found.

Conclusion(s): The presence of MOR in human endometrium and the dynamic changes during the menstrual cycle suggests a possible role of opioids in reproduction events related to the human endometrium or endometriosis.

Key words: mu opioid receptor, MOR, endometrium, menstrual cycle

INTRODUCTION

The endogenous opioid peptides (EOPs) are derived from proopiomelanocortin (POMC), proenkephalin (PENK) and prodynorphin (PDYN) precursors and exert their effects by binding to the G-protein coupled receptors δ -opioid receptor (DOR), κ -opioid receptor (KOR), and μ -opioid receptor (MOR) (Waldhoer *et al.* 2004). EOPs are known to participate in the regulation of reproductive physiology at multiple sites (Fabbri *et al.* 1989) since opioid peptides and their precursors and receptors have been described in many of the male and female reproductive tissues. One of the best-known effects of opioid peptides on the reproductive system is their inhibitory role in the secretion of GnRH at the hypothalamic level and the tonic inhibition of the release of LH (Mehmanesh *et al.* 1988; Yilmaz y Gilmore 1999; Kumru *et al.* 2001). But there is a growing body of evidence that indicates a participation of opioid peptides in the regulation of reproductive function through a direct local action within reproductive tissues (Jin *et al.* 1988).

One of the tissues where it is believed that the opioids are acting is the endometrium. Human endometrium is a complex tissue that regenerates and regresses with each menstrual cycle under hormonal control but also due to regulation by other factors like opioid peptides (Zoumakis *et al.* 1997). In fact, the three opioid peptide precursors mRNA has been described in endometrium: POMC in rat endometrial cells (Jin *et al.* 1988) and Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line (Gravanis *et al.* 1994; Makrigiannakis *et al.* 1995); PENK in endometrial cells of human (Borthwick *et al.* 2003), cow (Bauersachs *et al.* 2005), mouse (Rosen *et al.* 1990), rat (Jin *et al.* 1988) and primate (Low *et al.* 1989); and PDYN in human endometrial cells (Chatzaki *et al.* 2000) and Ishikawa human endometrial cells (Gravanis *et al.* 1994). Moreover, opioid peptides such as β -endorphin and met-enkephalin have been found in the uterine fluid of the human and cow (Petraglia *et al.* 1986), and dynorphins have been described in human and Ishikawa human endometrial cells (Chatzaki *et al.* 2000), where β -endorphin has also been detected (Makrigiannakis *et al.* 1992). Finally, DOR and KOR have been described in Ishikawa human endometrial cells, while MOR is absent (Hatzoglou *et al.* 1995; Chatzaki *et al.* 2000); in fact, MOR has been localized only in the uterine luminal epithelium cells of the pregnant mouse (Zhu y Pintar 1998) and in endometriosis stromal cells (Matsuzaki *et al.* 2005, 2006, 2007). It has been reported that specific agonists for KOR bind to epithelial and stromal primary endometrial cell cultures (Chatzaki *et al.* 2000, 2001).

The presence of all the compounds of the opioid system in the endometrium denotes a role of this system in any of the processes holding the endometrium. On the one hand, it has been described that dynorphin, via KOR, may participate in the apoptotic processes related to endometrial tissue remodeling during early pregnancy or menstruation (Chatzaki *et al.* 2001). On the other hand, it is known that estrogens and glucocorticoids suppress the secretion of endometrial β -endorphin, while the secretion of dynorphin is induced by GnRH, and that type-specific regulation of endometrial opioid suggests that each type of opioid peptide possesses a quite distinct physiological role within the uterine cavity (Gravanis *et al.* 1994). Regarding the possible role of opioid system in implantation, it has been hypothesized that some peptides coming from PENK could locally modulate the immune response since the mRNA of PENK was dramatically increased in the vicinity of the implantation site of the pregnant mice uterus (Rosen *et al.* 1990). Finally, the absence of β -endorphin and met-enkephalin in the uterine fluid of postmenopausal women but the presence of both peptides during the menstrual cycle (with higher concentrations in the secretory phase than in proliferative phase due perhaps to the stimulation by gonadal steroids) suggests a role of opioids during the menstrual cycle (Wahlstrom *et al.* 1985; Petraglia *et al.* 1986). Moreover, the transient expression of KOR and MOR and the presence of PENK in the mouse myometrium could regulate the myometrial contractibility (Zhu y Pintar 1998).

As can be seen, there is evidence to suggest that the opioid system is involved in some endometrial functions, but from our point of view there is a gap in the field, since to date there is no any detailed study about MOR in the mammalian endometrium during the menstrual cycle. Therefore, the aim of the present study was to analyze the dynamic of the expression of the MOR gene and protein, as well as the localization of MOR, in human endometrium throughout the menstrual cycle.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all participants at the time of tissue collection, and ethical approval was provided by the Clinic Research Ethics Committee of the Basque Health System in the Cruces University Hospital (Ethics approval number CEIC EI4/36,02/2015).

Human Endometrial Tissues

Endometrial tissues for this study were obtained by endometrial biopsy from 86 women aged 22-39 years with regular menstrual cycles (25–35 days) who had not undergone hormone treatment in the previous 3 months. Samples were collected from patients using a Cornier pipelle (Laboratoires CCD). All the participants were patients from the Human Reproduction Unit of the Cruces University Hospital, fulfilling the following criteria: normal uterine vaginal ultrasound; absence of endometriosis, polycystic ovary syndrome, implantation failure or recurrent miscarriage; and no history of opioid drug use. Prophylactic antibiotic were not used. There was no case of infection or other side effects. Endometrial dating was determined histologically by an experienced pathologist (L.A.) according to the criteria of Noyes *et al.* 1950.

These samples were categorized in groups for the different menstrual cycle phases: phase I, menstrual (days 1-5, n = 4); phase II, early to midproliferative (days 6-10, n = 7); phase III, late proliferative to early secretory (day 11-19, n = 9); phase IV, midsecretory (days 20-24, n = 7); and phase V, late secretory (days 25-28±, n = 8). Collected tissues were either snapfrozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for protein and mRNA extraction or fixed in buffered formalin (pH 7.4) and processed to paraffin wax blocks for immunohistochemistry (IHC).

Reverse transcription

RNA from endometrial tissue (obtained from some samples of each stage) and cerebral cortex (positive control) were isolated with the RNasy mRNA Purification Kit (Ambion). The procedure for obtaining the cDNA was performed with ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) according to manufacturer's instructions. Briefly, about 150 ng of RNA and random primers were heated at 65 °C for 10 minutes and chilled on ice for 5 minutes. Then, after adding the reverse transcription mix, the mixture was annealed at 25 °C for 5 minutes. A first-strand synthesis reaction was carried out at 55 °C for 60 minutes, and the reverse transcriptase was inactivated at 70 °C for 15 minutes.

Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis

Real-time quantitative reverse transcriptase (RT)-PCR was performed on 29 endometrial samples throughout the menstrual cycle; phase I (n= 5); phase II (n = 9); phase III (n = 3); phase IV (n = 6) and phase V (n=6). Quantitative PCR was performed in three replicates with the StepOne thermocycler using a TaqMan assay (Applied Biosystems), specifically designed for recognizing MOR (Hs01053957_m1). The thermal profile for this PCR consisted of a “holding stage” of 20 seconds at 95°C and 40 cycles with two steps: 1 second at 95°C and 20 seconds at 60°C. We used GAPDH (Hs99999903_m1) as the endogenous control gene. The quantitative amount of mRNA in each sample was determined by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using GAPDH as the reference gene. The average ΔCt of the cortex samples was used as the calibrator.

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)/PAGE and Immunoblotting

For the immunoblotting the following endometrial samples were used: from phase I, n= 3; phase II, n = 5; phase III, n =4; phase IV, n = 4; and phase V, n = 6. The endometrial tissue and human cerebral cortex was processed as described elsewhere (Peralta *et al.* 2011), and the membrane fraction was collected in the SDS sample buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol and 0.1% bromophenol blue). The sample of human brain cortex was kindly donated by Dr. Leyre Urigüen (University of the Basque Country, Leioa, Basque Country).

Proteins were heated at 100°C for 5 minutes and were loaded onto 12% resolving gels and separated by one-dimensional SDS/PAGE (20-30 μ g of endometrial tissue per lane; gray matter of the human prefrontal cerebral cortex, 30 μ g). Proteins were then transferred to PVDF membranes (Amersham Biosciences), using the Mini Trans-Blot electrophoretic transfer system (Bio-Rad Laboratories). Blotted membranes were incubated with a primary polyclonal rabbit anti-MOR antiserum (1:2500; Chemicon International), overnight at 4°C. The antibody was validated in a previous study by our research group (Agirregoitia *et al.* 2006; Agirregoitia *et al.* 2012). The membrane was incubated for 2 hours at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Affinity BioReagents) diluted 1:2500. Immunocomplexes were detected using enhanced chemiluminescence in a Chemi Doc system (Bio-Rad). To calculate the molecular weight of each band, the software Quantity One was used. To measure the changes along the menstrual cycle, results were normalized with the positive control ACTB (1:10000; Sigma-Aldrich).

Immunohistochemistry (IHC)

Samples (phase I, n = 4; phase II, n = 7; phase III, n = 9; phase IV, n = 7; and phase V, n = 8) were fixed in 4% neutral buffered formalin (pH 7.4) for 24-48 h and stored in ethanol 70% until they were embedded in paraffin wax, and 4µm sections were obtained with a Shandon AS 325 retraction microtome. For preliminary assessment of morphology, sections were stained with hematoxylin and eosin. On the basis on this assessment, samples were dated and grouped in one of the above described five phases.

Following deparafination and rehydration, sections were microwave heated in citrate buffer (10mM, pH 6) during 10 minutes for the antigen retrieval. Afterwards sections were incubated with 0.3% H₂O₂ in methanol (30 minutes) to block the endogenous peroxidase activity and with normal goat serum in PBS-0.1% Triton X 100 (10 minutes) to block nonspecific binding. Sections were then incubated in anti-MOR (Abcam; 1:1200, overnight, 4°C) followed by the biotinylated anti-rabbit (1 hour) used as the secondary antibody in conjunction with the Vectastain H Elite ABC kit (Vector Laboratories). Immunostaining was visualized with Vector Nova Red (Vector Laboratories; ±1 minute). Slices were dehydrated and mounted with Vectamount (Vector Laboratories). Negative controls were performed by omitting the primary antibody before addition of the secondary antibody. All images were examined and captured using Olympus BX50 optical microscopy (Olympus Optical Co.) connected to a digital color camera (Olympus XC50).

Evaluation of protein staining intensity and distribution was assessed using the semiquantitative histological score (HSCORE) system (Budwit-Novotny *et al.* 1986) and Digital-HSCORE, modified from Fuhrich *et al.* (2013). Briefly, for the manual HSCORE, the whole sample was analyzed under 100x magnification and the following formula was used: $HSCORE = \sum P_i \times (i + 1)$, where *i* is the intensity of staining and *P_i* the percentage of stained cells with this intensity. The staining intensity was classified by 3 independent observers into four arbitrary categories: no labelling (0), weak (1), moderate (2) and strong (3). The D-HSCORE was performed using the image J software, as described elsewhere (Fuhrich *et al.* 2013), but values of the arbitrary categories mentioned above in the range of color intensity (0–255) were established by three independent viewers (0: 255–235, 1: 234–174, 2:113–173, 3: 112–0). Low intraobserver (*r* = 0.983; *P* < 0.0001) and interobserver (*r* = 0.994; *P* < 0.0001) differences for HSCORE in uterine tissues have been previously reported using this technique (Budwit-Novotny *et al.* 1986).

Data analysis

To study the changes of the MOR receptor throughout the menstrual cycle, Graph Pad Prism 5 program was used. All the results were pooled by above-mentioned menstrual cycle phases (phase I, phase II, phase III, phase IV and phase V). The mRNA and protein expression was performed using the mean \pm SEM for the one-way analysis of variance (ANOVA) tests. The post hoc test was Bonferroni. Immunohistochemical expression of MOR was analyzed with two-way ANOVA, considering the different compartments (luminal epithelium, glands, endothelium and stroma) and different phases of the menstrual cycle. Bonferroni was used as a post hoc test. Significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Dynamic of MOR mRNA expression in human endometrium during the menstrual cycle

There was no expression of MOR mRNA during the first days of the menstrual cycle (phase I) but, during proliferative phase (phase II), the expression of MOR mRNA increased until the maximal MOR mRNA expression that was observed during the late proliferative phase (phase III). When the cycle continued to the secretory phase (phase IV), the expression of MOR mRNA decreased until almost the minimum in the last days of the cycle (phase V). The expression of MOR in phase III was significantly different in comparison with all other phases; moreover, the expression of MOR in phase I was significantly different ($p < 0.01$) in comparison with the expression in phase IV (Fig. 1).

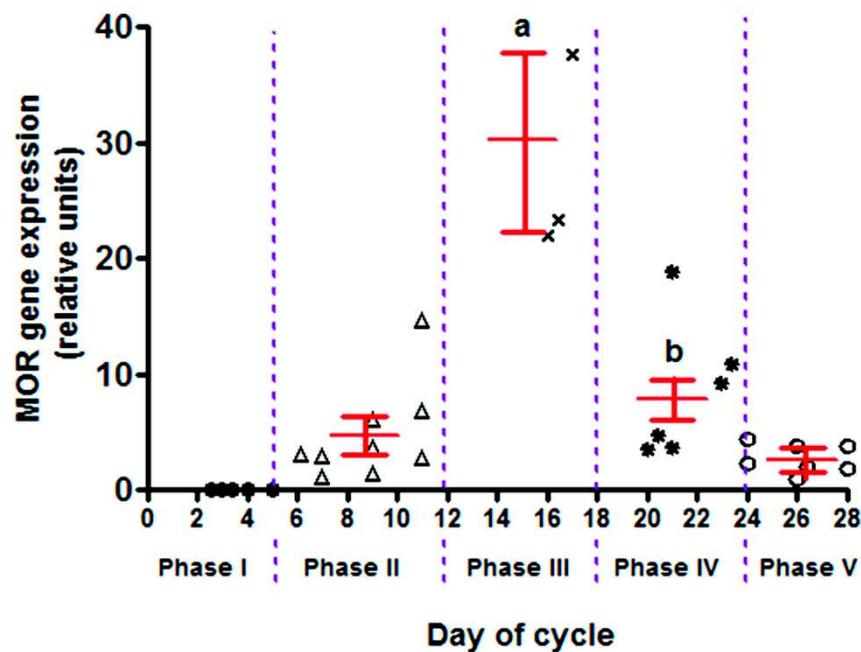


Figure 1. Expression values of MOR in human endometrium throughout the menstrual cycle by quantitative RT-PCR. Phase I: menstrual phase (days 1-5); phase II: early- and midproliferative phase (days 6-11); phase III: late-proliferative and early-secretory phase (days 12-17); phase IV: mid-secretory phase (days 18-23); phase V: late-secretory phase (days 24-28). Quantitative amount of mRNA in each sample was determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using GAPDH as the reference gene. The average ΔCt of the cortex samples was used as the calibrator. Each data in the graph belongs to one sample and the mean \pm S.E.M for each phase is shown in red. Significant differences between phases are indicated with different letters; ^a $p < 0.05$ vs. all other phases, ^b $p < 0.05$ vs. Phase I.

Dynamic of MOR protein expression in human endometrium during the menstrual cycle

Figure 2 shows representative Western blot using human endometrium at different days of the cycle. The anti-MOR polyclonal antiserum labeled a band about 70 kDa in endometrial tissue protein extracts, and we detected a band about 42 kDa using anti-ACTB antiserum. The expression of MOR protein was almost zero during the first days of the menstrual cycle (phase I) but, during proliferative phase (phase II), the immunodetection of MOR was significantly increased, reaching a peak around the late-proliferative and early-secretory phase (phase III). After that phase, in the midsecretory phase (phase IV), the immunodetection of MOR decreased significantly ($p < 0.01$) until it reached, in phase V, almost the value of the first phase.

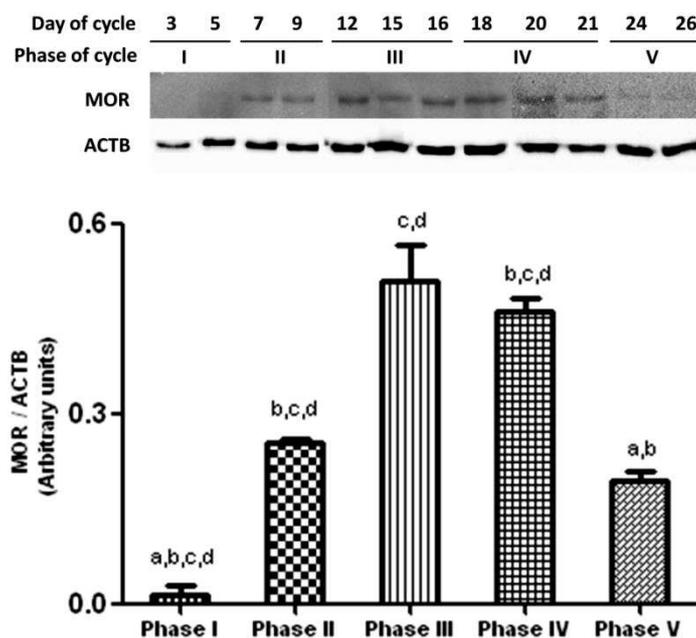


Figure 2. Expression of MOR in human endometrium throughout the menstrual cycle by western blot. Phase I: menstrual phase (days 1-5); phase II: early- and mid-proliferative phase (days 6-11); phase III: late-proliferative and early-secretory phase (days 12-17); phase IV: mid-secretory phase (days 18-23); phase V: late-secretory phase (days 24-28). To determine MOR protein abundance, the same extracts were reblotting with anti-ACTB. The histogram shows the MOR expression mean \pm S.E.M of 3 different experiments corrected by ACTB content. Significant differences between phases are indicated with different letters; $p < 0.01$ in all cases. Representative western blot is shown.

MOR immunoreactivity in human endometrium: Histomorphometric analyses

Specific endometrial MOR staining was observed in all phases of the menstrual cycle (Fig. 3.A). The lowest immunolabeling was detected both in the menstrual phase (phase I) and in the days before this phase, that is, in the late secretory phase (phase V). After the menstrual period, the expression of the protein increased significantly ($p < 0.001$, phase I vs phase II) and MOR protein immunoreaction showed high intensity during the proliferative phase. The most intense staining was present in the days near the ovulation (late proliferative to early secretory phases or phase III). Afterwards, in the secretory period, the immunolabeling intensity decreases until it reaches the values observed in the menstrual phase. In fact, the menstrual phase immunolabeling values show significance ($p < 0.01$) between all the phases except the late secretory one.

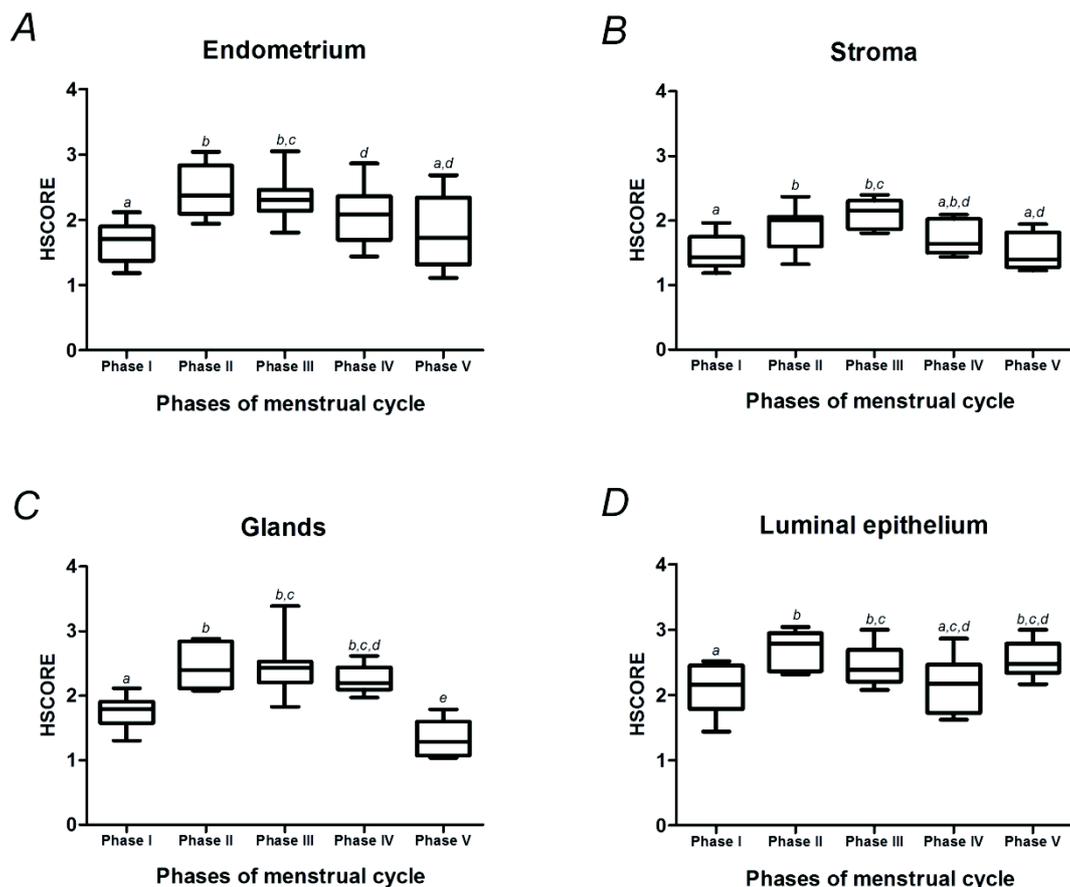


Figure 3. HSCORE values representing the immunoreactivity intensity of MOR protein staining in the whole endometrium (A), the stromal compartment (B), the epithelial glands (C) and the luminal surface of the endometrium (D). Box and whisker plots representing median, inter-quartile range and minima/maxima for phase I: menstrual phase (days 1-5) (n=4); phase II: early- and mid-proliferative phase (days 6-11) (n=7); phase III: late-proliferative and early-secretory phase (days 12-17) (n=9); phase IV: mid-secretory phase (days 18-23) (n=7); phase V: late-secretory phase (days 24-28) (n=8). The different combinations of letters indicate significant differences between phases; $p < 0.01$ in all cases.

All the studied endometrial regions (stroma, glands and luminal epithelium; Fig 3.B., 3.C. and 3.D.) were stained during the menstrual cycle, and the immunoreactive pattern that was shown for the whole endometrial tissue was maintained for all the studied areas, with some variations among them. In the stromal compartment (Fig 3.B.) the staining increased significantly after menstrual period, during the proliferative phase, reaching a nadir in the late-proliferative to early-secretory period ($p < 0.01$ between phase I and phase II and $p < 0.001$ between phase I and phase III). From that moment it showed a significant decline ($p < 0.01$ from phase III to IV and $p < 0.001$ from phase III to V). In the glands the maximum levels were reached already in the early proliferative (phase II) and maintained until the midsecretory phase (phase IV) (Fig 3.C.). From this moment, the staining was reduced significantly ($p < 0.001$) reaching the lowest observed values in late secretory phase (phase V). It is interesting to remark how in the late secretory phase the expression of the MOR protein

decrease is also significant with the values found in the menstrual phase ($p < 0.01$). Analyzing the luminal epithelium (Fig 3.D.), it can be observed that protein concentration was enhanced after menstruation, reaching maximum values at early proliferative phase ($p < 0.001$). Afterward, the decrease started ($p < 0.01$ between II and IV), but from midsecretory to late secretory a new increase was observed, showing a different trend compared with the other compartments.

Immunohistochemical localization of MOR in human endometrium

Figure 4 shows MOR distribution in the different menstrual cycle phases of the human endometrium.

Phase I - MOR expression in the menstrual endometrium (Fig 4. A.): Glands (arrows) and stroma (asterisk) near the basalis undergo collapse as the superficial tissue sloughs. Glands have tortuous shapes. MOR expression is weak, but it is a little bit more intense in the epithelial cells of the luminal surface of the endometrium (arrowheads) and gland epithelium (arrows). Epithelial expression is stronger in the apical region of the cells. In the glandular epithelium a light staining of some of the cells can also be observed. Most of the cells of the stromal compartment have no MOR protein expression, but those in which the staining appeared show higher intensity than the glandular ones.

Phase II - MOR expression in the early to midproliferative endometrium (Fig 4.B.): Glands are small and tubular, both epithelium and stroma are regenerating, and it is usual to see mitotic activity.

MOR expression is weak but it is stronger in the epithelium: in the luminal surface of the endometrium, gland epithelium (arrows) and endothelium (thin arrows). MOR expression in the gland epithelium appeared in the apical and basal region of the cells. The stromal compartment labeling reaches higher values than in the previous phase, but the increase is still higher in epithelia.

Phase III - MOR expression in the late-proliferative to early-secretory endometrium (Fig. 4. C.): Glands are tortuous with pseudostratified nuclei and sometimes subnuclear cytoplasmic vacuoles. Stroma is rather dense, fundamentally around the vessels, and shows moderate growth: small spiral arteries and thin-walled venules are present. MOR expression is very intense in the epithelial cells both in the luminal surface and glands. We can observe how some cells were deeply stained near the apical membrane, while others show stronger staining in the basal layer (we did not find immunostaining in the nucleus of the cells; Supplemental Fig. 1). Nevertheless, in this phase, the

staining in the epithelia does not seem to be higher, and in the luminal epithelium we can also appreciate a decrease compared with the previous phase. The endothelium is still highly stained. The stroma region around vessels has also strong staining, and it reaches its maximum MOR protein expression levels during the late proliferative phase, near the ovulation days.

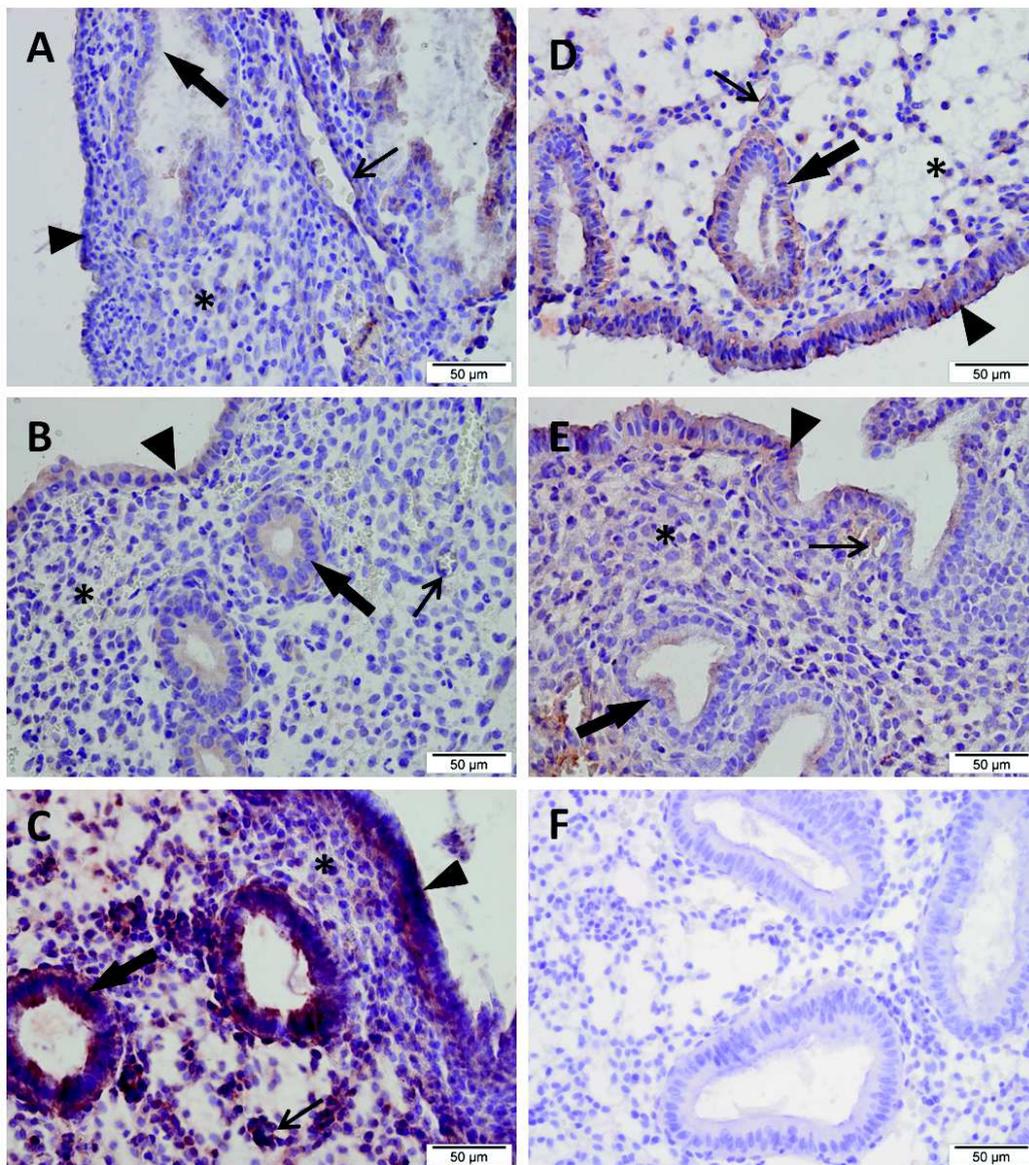
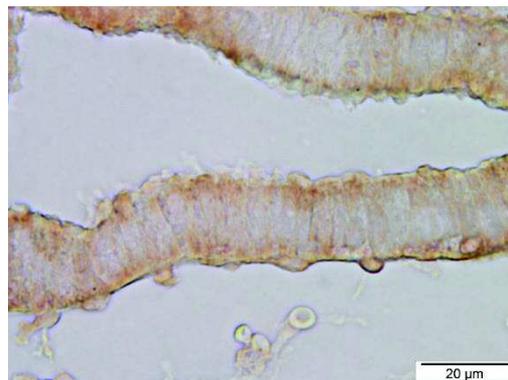


Figure 4. MOR localization in human endometrium during the menstrual cycle. Representative pictures of immunostaining with MOR antibody at menstrual phase, phase I (day 1, A); early-mid proliferative phase, phase II (day 6, B); late proliferative-early secretory phase, phase III (day 14, C); mid secretory phase, phase IV (day 20, D) and late secretory phase, phase V (day 28, E). MOR immunoreactivity varies during the cycle in all endometrium compartments: epithelial gland cells (arrows), luminal epithelium (arrowheads), stroma (asterisk) and endothelium (thin arrows). F (day 14); negative control by omitting the primary antibody before addition of the secondary antibody. Scale bar 50μm.

Phase IV - MOR expression in the midsecretory phase (Fig. 4.D.): Glands now are even more tortuous and show intraluminal secretion. Basal vacuoles moved to the apical region, and now nuclei are basally oriented. Stroma shows edema, which will be maximal at days 21-22. MOR immunoreactivity is quite intense at the epithelial cells and shows staining at apical and basal region of the epithelial gland cells (arrows). Endothelium (thin arrows) and stroma also showed MOR immunoreactivity.

Phase V - MOR expression in the late secretory phase (Fig 4. E.): After 20th day of the cycle, the stroma changes are more evident; nonetheless, the glands become more prominent. Predecidual stromal change is now evident around spiral arteries, with many interspersed leucocytes. MOR immunoreactivity is less intense at the gland epithelial cells and shows staining at apical region fundamentally (arrows). The luminal epithelium maintains intense staining. In the stroma, immunoreactivity is less intense, but endothelium staining is maintained (thin arrows).



Supplemental Figure 1. High magnification picture of MOR immunolocalization in human endometrium. Scale bar 20 μ m.

DISCUSSION

The presence of the endogenous opioid system (opioid peptides, their precursors and receptors) in the mammalian endometrium was described a few years ago, and since then, a number of physiological roles have been suggested (Zoumakis *et al.* 1997). With our present work, we have elucidated that MOR is expressed in human endometrium, not only at the mRNA level but also at the protein level, and, moreover, we have checked how the dynamics of expression and localization of

MOR changes throughout the menstrual cycle in a coordinated way in each region of the endometrium (luminal epithelium, glands and stroma).

To date, the unique evidence about the presence of MOR in the human endometrium has been produced in two works focused on endometriosis where the authors speak about the expression of MOR mRNA on eutopic endometrial stromal cells (Matsuzaki *et al.* 2005, 2006). Our data confirm that the mRNA of MOR is present in human endometrium, but we have also seen how that expression follows a cycle-dependent pattern where mRNA is absent in the first days of the menstrual cycle, increases its expression during the early proliferative phase to reach a maximum at the late proliferative phase and after, and it decreases again until almost its minimum levels throughout the secretory phase. This fact could explain why in previous works performed with eutopic endometrium some patients did not show expression of MOR (Matsuzaki *et al.* 2005, 2006), since the investigators only differentiated the patients' endometrium between the proliferative and the secretory phases without taking into account the day of the cycle, while important changes are detected within these two phases. In the present work, we also have validated the expression pattern of mRNA by the immunodetection of the MOR protein, which showed very similar pattern to that of mRNA using Western blot and IHC.

Our findings strongly contradict the widely accepted idea that MOR is not present in human endometrium, based on a study on Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cells (Hatzoglou *et al.* 1995). However, the aforementioned work did not include any experiment with normal endometrial cells. So, from our point of view, in comparing our data with those of that article, two hypotheses could be made: Ishikawa cells have the phenotype of endometrial cells at the beginning or the end of menstrual cycle or MOR certainly disappears in endometrial adenocarcinoma. In any case, it seems that the use of the Ishikawa cells would not be the best option to extrapolate the results obtained from a healthy endometrial tissue model for MOR.

The cyclic upregulation and downregulation observed on MOR lead us to hypothesize that MOR has a defined role throughout the menstrual cycle but especially during the period from the midproliferative to the midsecretory phase, where the expression of MOR is the largest of the entire cycle. That idea is reinforced with the data of the works that measured the presence of EOP in endometrium: in one work, β -endorphin was not detected in the human endometrium in the proliferative phase, while it appeared in secretory phase (Wahlstrom *et al.* 1985). In another work,

the investigators did not find many differences during the cycle in β -endorphin levels, but instead they detected significant higher concentrations of met-enkephalin in human uterine fluid during the secretory phase in comparison with the proliferative phase and, additionally, the concentration of met-enkephalin in the uterine fluid in superovulated cows was higher than that in control cows (Petraglia *et al.* 1986). Moreover, as it would be expected, it has been described that the transcript of the precursor of met-enkephalin (PENK) increased in the proliferative phase and decreased in the secretory phase of primate and human endometrium (Low *et al.* 1989; Borthwick *et al.* 2003). Thus, it seems that in the postovulatory period, the endometrium may secrete high levels of met-enkephalin and maybe β -endorphin and that the existence of MOR could be necessary for the function of those peptides. In addition, it has been hypothesized that those peptide-levels changes in the cycle could be regulated by steroid hormones. In this sense the influence of gonadal steroids on the synthesis and secretion of opioid peptides in the endometrium (Petraglia *et al.* 1986) has been suggested, and it has been also proposed that progesterone could induce the synthesis of opioid peptides in endometrial glandular cells (Wahlstrom *et al.* 1985). Otherwise, the absence of β -endorphin and met-enkephalin in the uterine fluid of postmenopausal women and the recovering of EOP levels after a steroid replacement (Petraglia *et al.* 1986) make clear the important role of the opioid system during the menstrual cycle and the necessity of the hormonal regulation of this system for it to work. Even so, a reduction in endogenous opioid tone as a trigger for initiating the LH surge in proestrus rats has been also proposed (Allen y Kalra 1986; Kumru *et al.* 2001).

Although the expression pattern of mRNA and the immunodetection of the MOR protein using Western blot and IHC for the whole endometrium showed a very similar pattern, there are some differences regarding the localization of the receptor in different compartments of the endometrial biopsies. The stromal compartment is the most representative area, and the expression of MOR follows the same pattern as that of the whole endometrium, increasing during the proliferative phase and decreasing in the mid-late secretory phases, but, for example, the expression pattern of MOR in luminal epithelium shows a new rise in the late secretory phase. It will be interesting to check where exactly the expression of MOR increases during the proliferative phase because it seems that this event is essential to inhibiting the inflammatory process occurring during menstruation, via inhibition of cAMP (Maybin y Critchley 2015). This kind of regulation has been described in other communication systems of endometrium, some of them very related to the opioid system as, for example, the cannabinoid system (Scotchie *et al.* 2015).

In conclusion, our data indicate that MOR is expressed in human endometrium and that its expression pattern changes during the menstrual cycle in a different manner in all the studied endometrial compartments. These findings suggest that MOR could have several functions in the complex remodeling process that endometrium undergoes every month and, therefore, in early events of reproduction. Even so, as the MOR knockout mice are able to have offspring (Cominski *et al.* 2014), it will be interesting to elucidate what is the real role of MOR in reproduction events since this issue has been not studied in depth to date.

5 DISCUSIÓN GENERAL

Los **opiáceos** se han utilizado desde la antigüedad para paliar el dolor y, a día de hoy, siguen siendo los fármacos más eficaces y más utilizados para este propósito (Rang *et al.* 2004). Sin embargo, su utilidad clínica está limitada por la tolerancia que se desarrolla y el riesgo de adicción (Williams *et al.* 2013) y, por ello, se encuentran de forma continua bajo estudio con el fin de optimizar su eficacia y evitar los efectos adversos que conllevan (Alvarez y Farré 2005; Chan *et al.* 2017). La mayor parte de los efectos clínicamente relevantes de los opiáceos actúan vía MOR, al igual que la morfina, ya que cuando este receptor se suprime desaparecían tanto los efectos analgésicos como el desarrollo de dependencias asociadas (Williams *et al.* 2013). Por este motivo, los múltiples estudios que se llevan a cabo para mejorar estos fármacos se centran en el receptor MOR y la síntesis de nuevos análogos de la morfina que minimicen estos riesgos (Chan *et al.* 2017).

Por otro lado, a pesar de que los efectos adversos más conocidos sean a nivel de sistema nervioso central, los opiáceos también afectan a otros sistemas, ya que alteran el sistema opioide endógeno, el cual está presente en distintos órganos periféricos (Bodnar 2013). Por tanto, la administración de estos fármacos podría estar alterando órganos lejanos a los que se pretende tratar y causando efectos adversos que no se están teniendo en cuenta.

Uno de los sistemas donde se ha observado una gran influencia del sistema opioide endógeno y que, por lo cual, podría estar siendo alterado durante el tratamiento con opiáceos, es el sistema reproductor. Los EOPs están implicados en diversos procesos del sistema reproductor en mamíferos (Makrigiannakis *et al.* 1995; Subiran *et al.* 2011; Böttcher *et al.* 2017) y MOR ha sido descrito en varios tejidos de este sistema (Seeber *et al.* 2019). De hecho, se ha observado que personas consumidoras de opiáceos presentan menor fertilidad (Kuczkowski 2007; Safarinejad *et al.* 2013) y, además, se ha relacionado el consumo de estos fármacos con casos de hipogonadismo hipogonadotrópico (Drobnis y Nangia 2017; Semet *et al.* 2017). Desde hace unas décadas, el estudio de estos efectos en el sistema reproductor ha aumentado considerablemente, no sólo por el consumo lúdico que se hace de esta droga, sino por el amplio uso terapéutico (van Amsterdam y van den Brink 2015). No obstante, aún se desconoce la función que ejerce en algunos puntos del sistema reproductor y la profundización en estos estudios podría aportar información para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas que prevengan la esterilidad en casos de consumo de fármacos o incluso en patologías propias del paciente en las cuales este sistema esté involucrado.

Por este motivo, en esta tesis se quiso hacer un estudio a nivel descriptivo y funcional para acercarnos un poco más a la implicación del receptor mu opioide en tres procesos clave de la reproducción: la maduración ovocitaria, la capacitación de los espermatozoides y el endometrio durante el ciclo menstrual. En todos estos procesos se ha constatado la presencia de este receptor, aunque en cada uno el papel que ejerce es distinto.

La morfina es capaz de modular a través del receptor mu opioide la maduración in vitro de ovocitos y conseguir así una mayor tasa de blastocistos post-IVF

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis ha realizado varios trabajos relacionados con la presencia del sistema opioide en el aparato reproductor. En esos estudios previos se observó la presencia de los tres receptores opioides en ovocitos humanos y se vio cómo la localización de éstos cambiaba dependiendo de la fase de maduración nuclear (GV, MI o MII) (Agirregoitia *et al.* 2012). Este hecho llevó a pensar que los opioides podrían tener una función en la maduración ovocitaria. Por este motivo, y siguiendo con esta hipótesis, se quiso observar si el sistema opioide, a través de MOR, era capaz de modular la IVM y si con ello se conseguiría una mayor o menor tasa de ovocitos maduros y producción de blastocistos post-IVF.

Dado que este tipo de experimentación no se puede realizar con ovocitos humanos, la investigación se trasladó al modelo murino. No obstante, antes de comenzar con los experimentos de IVM, se analizó la presencia de MOR en ovocitos de ratón para saber si éste se presentaba de igual forma que en humanos. Se observó la presencia de MOR en los ovocitos de esta especie en todas las fases de la maduración nuclear y en las células de la granulosa, cambiando, además, su localización. Es importante señalar la presencia de MOR en las granulosas, ya que, como indicamos en el apartado 1.2.1.3 de la introducción, el complejo cúmulo ovocito 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). Los experimentos de inmunolocalización revelaron la presencia de la proteína en todas las fases de la maduración de ovocito, pero, el mRNA, en cambio, solo se observó en GV. Este hecho puede ser debido a que existe una degradación selectiva de mRNA durante la maduración ovocitaria y la transcripción se vuelve inactiva desde el reinicio de la meiosis hasta el estadio de 2 células en ratón, mientras que la traducción en proteínas activas se ha visto que no depende de este patrón temporal (Gosden y Lee 2010). Esta pérdida selectiva de mRNA durante la maduración de ovocitos ya se ha observado anteriormente para otras proteínas (López-Cardona *et al.* 2016, 2017). En

ovocitos humanos, en cambio, el mRNA de MOR estaba presente en todas las fases de la maduración, aunque, en el caso del resto de receptores (DOR y KOR), ocurría lo mismo que en nuestros resultados, es decir, el mRNA no se encontraba presente y la proteína sí (Agirregoitia *et al.* 2012). Aun así, cabe decir que los ovocitos humanos se obtienen de clínicas de reproducción asistida y, por tanto, existe una mayor variabilidad en relación al estadio de maduración del ovocito que en el caso de la experimentación con ratones, en la cual las condiciones están mucho más controladas. Por esta razón, es posible que los resultados no sean del todo comparables entre ambas especies.

Por otro lado, aunque en ovocitos de ratón también observamos un cambio en la localización de MOR durante la maduración, esta variación no coincide con aquella observada en ovocitos humanos. En concreto, nuestros resultados revelaron cómo la localización de MOR variaba dinámicamente durante el proceso de reinicio de la meiosis. Ésta se volvía más periférica a medida que avanzaba la maduración nuclear, mientras que en humano ocurre lo contrario, MOR se encuentra en la periferia del ovocito en GV y, en cambio, alcanza una distribución más homogénea en MII (Agirregoitia *et al.* 2012). En la especie equina no se ha visto un cambio en la localización de MOR, ya que se mantiene distribuido homogéneamente durante todas las fases de la maduración (Dell'Aquila *et al.* 2008). Así pues, existe la posibilidad de que haya diferencias entre especies y que, como hemos comentado anteriormente, el estadio de maduración de los ovocitos de este trabajo no sea comparable con los estudios mencionados, en los cuales existía una mayor variabilidad. Retomando nuestros resultados y de acuerdo con la teoría clásica de los GPCRs donde se describe que el receptor necesita alcanzar la membrana celular para poder realizar su función (Cahill *et al.* 2007), la distribución más periférica de MOR encontrada durante la reanudación de la meiosis y, específicamente, en MII, podría indicar una posible función de este receptor en el proceso madurativo del ovocito.

Una vez finalizado el estudio descriptivo de MOR en las distintas etapas de maduración del ovocito y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, como primer paso para dilucidar la hipótesis comentada anteriormente, quisimos saber si éramos capaces de activar MOR mediante la observación de la modulación de diversas rutas de señalización implicadas en el proceso de maduración y que son moduladas por MOR en otros tipos celulares. Así pues, al hacer los ensayos de IVM en presencia de morfina, se vio que el patrón de fosforilación de las quinasas ERK1/2 y de AKT varió, lo que parecía señalar que sí éramos capaces de modular MOR. Pero, además, se sabe que tanto la vía de señalización ERK1/2 como la de PI3K/AKT modulan el proceso de meiosis y el desarrollo del ovocito competente y, por tanto, podrían ser unos buenos marcadores de la correcta

maduración del ovocito (Sun *et al.* 1999; Cecconi *et al.* 2010, 2012). Además, existen precedentes en los cuales se ha visto que la regulación de las vías MAPKs y PI3K/AKT, las cuales pueden ser activadas por los GPCRs, altera la maduración ovocitaria y provoca un efecto en la tasa de ovocitos maduros obtenidos en la IVM (López-Cardona *et al.* 2016, 2017; Song *et al.* 2018; Totorikaguena *et al.* 2019). La reanudación meiótica del ovocito requiere una drástica caída en los niveles de cAMP producida por la estimulación de la LH y, al mismo tiempo, la señalización dependiente de LH induce la activación y estimulación de las vías MAPKs y PI3K/AKT (Hoshino y Sato 2008). Existen evidencias de otras vías independientes al estímulo hormonal para disminuir los niveles de cAMP en el ovocito y reiniciar la meiosis (Mehlmann 2005), por lo que, viendo los resultados obtenidos, podríamos pensar que MOR realmente pudiera estar modulando la maduración ovocitaria influyendo en estas vías.

Así pues, teniendo en cuenta los resultados obtenidos se nos planteaba una última pregunta: ¿podría emplearse la morfina como complemento para la mejora de los medios de cultivo de IVM en reproducción asistida?

Como se ha mencionado en la introducción, la IVM se considera una técnica esperanzadora en reproducción asistida para casos en los cuales no es aconsejable administrar tratamiento hormonal (Mehta 2014). Sin embargo, en la actualidad, la eficiencia de esta técnica queda muy lejos de la esperada, representando tan solo el 0,02 % de los ciclos de reproducción asistida de 2017 en España y un 0,06 % en Europa (Kupka *et al.* 2016; Sociedad Española de Fertilidad (SEF) 2017).

Con el fin de profundizar en ello, se continuó con el estudio farmacológico de agonismo/antagonismo de MOR durante la maduración ovocitaria analizando la subsiguiente IVF y desarrollo embrionario preimplantacional. Al madurar los ovocitos, *in vitro*, en presencia de morfina, se obtuvo una mayor tasa de blastocistos tras la IVF, siendo este efecto bloqueado en presencia del antagonista naloxona. Cierto es que no se obtuvo una mayor tasa de ovocitos maduros al administrar morfina durante la IVM, pero sí que se vio que un mayor porcentaje de esos ovocitos alcanzaba el estadio de blastocisto tras la IVF. Estos resultados concuerdan con un estudio reciente en el que se observó una correlación positiva entre la concentración de β -endorfina en el líquido folicular y el número de ovocitos maduros obtenidos tras punción ovárica en humanos (Jaschke *et al.* 2018). También hay otros estudios donde se ha visto que la naloxona es capaz de mejorar la tasa de maduración ovocitaria en diversas especies distintas al ratón, aunque esta mejora sólo se daba en dosis bajas, ya que a dosis altas se veía el efecto contrario (Dell'Aquila *et al.* 2002, 2008; Iorga *et al.*

2009; Dang-Nguyen *et al.* 2013). Esos datos, junto con los presentados en esta tesis, indican una clara regulación opioide vía MOR de la IVM. Sin embargo, parece que esta regulación podría variar dependiendo de las dosis utilizadas tanto de agonista como de antagonista.

Actualmente se están llevando a cabo numerosos estudios con el fin de mejorar los medios de IVM. Algunos de éstos se están centrando en la adición de compuestos complementarios a los medios de maduración que participen en este proceso y que mejoren las tasas de ovocitos maduros tras la IVM (López-Cardona *et al.* 2016, 2017; Chouzouris *et al.* 2017; Fathi *et al.* 2018; Song *et al.* 2018; Totorikaguena *et al.* 2019). Ejemplo de ello son los compuestos del sistema cannabinoide, el cual está muy ligado al opioide por su similar mecanismo de acción, ya que se ha observado que al activar el receptor CB1 durante la IVM en ratones se obtenían mejores tasas de blastocisto tras realizar la IVF (López-Cardona *et al.* 2017; Totorikaguena *et al.* 2019).

Por lo tanto, parece que la morfina podría unirse a estos compuestos comentados abriendo una nueva vía de investigación en el sistema opioide como diana terapéutica para la mejora de los medios de IVM en las clínicas de reproducción asistida. En futuras investigaciones sería interesante profundizar en el mecanismo de acción de la morfina u otros opiáceos durante la maduración ovocitaria, en la posología y en la evaluación de la calidad de los embriones obtenidos.

La incubación de espermatozoides con morfina durante la capacitación in vitro disminuye la tasa de fecundación y afecta el desarrollo embrionario preimplantacional

El siguiente proceso clave en la reproducción estudiado en esta tesis es la capacitación de los espermatozoides, proceso que se da en el tracto femenino para que estos logren la capacidad de fecundación. El sistema opioide en espermatozoides ha sido ampliamente estudiado (Drobnis y Nangia 2017). En estudios *in vivo* en ratón, se observó que la administración crónica con morfina disminuía el número de espermatozoides, mientras que el tratamiento con naloxona no ejercía ningún efecto (Takzare *et al.* 2016). Esta exposición crónica también disminuye el tamaño de las glándulas accesorias y las tasas de embarazo tras cruzar a los machos con hembras (Cicero *et al.* 2002). De la misma forma, se observó un aumento de la mortalidad de las camadas (Cicero *et al.* 1995).

En estudios *in vitro* se ha visto que los receptores opioides están implicados en la modulación de varios procesos. Por ejemplo, se ha observado que su activación disminuye la movilidad del

espermatozoide, afecta negativamente a la reacción acrosómica, altera la espermatogénesis e influye en la calidad espermática (Kew *et al.* 1990; Albrizio *et al.* 2005, 2010; Agirregoitia *et al.* 2006; Subiran *et al.* 2012; Xu *et al.* 2013; Estomba *et al.* 2016; Urizar-Arenaza *et al.* 2016, 2019; Vicente-Carrillo *et al.* 2016; Farag *et al.* 2018). Por otro lado, también se ha observado que MOR induce la apoptosis de las células de Sertoli, llevando a una disfunción reproductiva (Soltanineghad *et al.* 2019). Debido a los resultados mencionados, en todos esos trabajos recién mencionados, los autores hablan de una posible reducción de la fertilidad debida a la acción opioide. Sin embargo, en ninguno de los anteriores estudios se ha analizado la capacidad de fecundar de los espermatozoides que han estado en contacto previamente con opioides. De hecho, es ese experimento el que nos permitiría observar el efecto directo de los opioides en la IVF y en el subsiguiente desarrollo embrionario para demostrar si los opiáceos causan, realmente, un efecto negativo en la fertilidad.

Por este motivo, la pregunta que se nos planteó fue si la exposición a uno de los opiáceos más comúnmente usado, como es la morfina, durante el proceso de capacitación, realmente podría disminuir la capacidad fecundante del espermatozoide.

Para responder a esta pregunta, seguimos con el modelo murino con el fin de evaluar el efecto de la activación de MOR durante la capacitación en la IVF. Para ello, primero realizamos un estudio descriptivo de MOR en espermatozoide de ratón. Aunque la presencia de MOR ya había sido descrita en espermatozoides extraídos del testículo (Estomba *et al.* 2016), no había estudios en los que analizaran la presencia de este receptor en espermatozoides de ratón maduros del epidídimo. En nuestros resultados verificamos la presencia de MOR en éstos, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico. Estos resultados concuerdan con los hallados en espermatozoides de otras especies (Albrizio *et al.* 2005; Agirregoitia *et al.* 2006; Vicente-Carrillo *et al.* 2016). Por tanto, teniendo en cuenta que MOR estaba presente en el espermatozoide maduro del ratón, continuamos analizando su involucración en la capacitación.

La capacitación del espermatozoide está regulada por numerosos factores. Como ya se ha mencionado en la introducción (apartado 1.2.2.4), el colesterol se considera uno de los factores más importantes y su disgregación del espermatozoide provoca una serie de eventos que conducen a la activación de AC y al aumento de cAMP, lo que provoca una serie de fosforilaciones de proteínas que son esenciales para la capacitación (Gilbert 2005). La morfina actúa inhibiendo la AC y disminuyendo el cAMP, por lo que podría ser que en este caso produjera una inhibición de la

capacitación y con ello la imposibilidad de fecundar. Pero, para poder elucidar si esto era realmente cierto, incubamos espermatozoides de ratón con morfina durante el proceso de capacitación *in vitro* (1 hora) y posteriormente realizamos la IVF. En efecto, se observó una bajada en la tasa de ovocitos fecundados que se hizo más evidente en los estadios más avanzados del desarrollo embrionario preimplantacional y en el número de blastocistos generados, lo cual era bloqueado por el antagonista naloxona.

Así pues, los resultados presentados confirman que el sistema opioide, vía MOR, afecta al proceso de capacitación de los espermatozoides, ya que la incubación con morfina durante este periodo disminuye la capacidad de fecundación (muy seguramente debido a todos esos efectos mencionados al principio de este apartado: disminución de la movilidad, inhibición de la reacción acrosómica...), viéndose afectada la fertilidad. Conocer este efecto, principalmente negativo, que ejerce el sistema opioide en la funcionalidad del espermatozoide es importante, ya que dicha célula puede estar expuesta a opioides exógenos durante la capacitación o en fases previas, como en el caso de opiáceos encontrados en tejidos reproductivos de la mujer (Soussis *et al.* 1995; Hall *et al.* 2018) o del hombre (Pichini *et al.* 1994) tras el uso de opiáceos con fines medicinales o lúdicos. Sería interesante, por tanto, que estos efectos se tuvieran en cuenta en la clínica a la hora de implementar un tratamiento crónico con analgésicos opiáceos.

El receptor mu opioide varía su expresión y localización a lo largo del ciclo menstrual en el endometrio humano

Por último, una vez estudiados procesos clave en el ovocito y en el espermatozoide, quisimos continuar observando la implicación de MOR en el ciclo endometrial mediante la descripción de su presencia en las distintas fases del ciclo menstrual del endometrio humano.

Anteriormente, en el único estudio sobre el sistema opioide realizado en endometrio humano, no se había detectado la presencia de MOR, aunque sí de KOR y DOR (Hatzoglou *et al.* 1995). Este estudio se realizó sobre células de Ishikawa de adenocarcinoma humano, el cual podría no ser el mejor modelo para extrapolar al endometrio sano. Por otro lado, en los únicos estudios en los que sí se ha descrito MOR en el endometrio humano son en casos de endometriosis, donde este receptor estaba sobreexpresado en el estroma de endometriosis ectópicas. Sin embargo, estos resultados no los

obtuvieron en todas las pacientes del estudio, lo que relacionaron con el bajo número de muestras analizadas (Matsuzaki *et al.* 2006, 2007).

Teniendo en cuenta estos estudios realizados anteriormente, no queda claro que MOR pudiera estar presente en el endometrio humano y, además, dado que utilizaron modelos en los cuales este tejido se mostraba alterado y el número de muestras era escaso, los resultados obtenidos no muestran total seguridad. Por lo que, la última pregunta que se nos planteó en esta tesis fue si MOR estaba presente en las distintas células del endometrio humano y si una variación en su expresión a lo largo del ciclo menstrual podría haber camuflado su presencia en los anteriores estudios.

El ciclo endometrial de la mujer es un proceso complejo que se compone de distintas fases en las cuales se producen eventos cíclicos de distinta naturaleza y regulados hormonalmente. Dicho esto, es posible que las diferencias observadas en esos estudios en la expresión de MOR fueran producidas por el momento en el que las muestras fueron recogidas. Para resolver estas dudas, en esta tesis realizamos un estudio descriptivo de MOR a nivel de mRNA y proteína en tejido endometrial de mujeres recogido en distintas fases del ciclo menstrual y estudiamos igualmente su localización en las diferentes células endometriales.

Tras los experimentos, describimos, por primera vez, la presencia de MOR en el endometrio humano, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico en todas las fases del ciclo endometrial. Además, nuestros resultados muestran una variación en el nivel de expresión de MOR a lo largo del ciclo, lo cual podría estar relacionado con un cambio de función dependiendo de la fase en la que se encuentre. En todas las pruebas realizadas, se obtuvo un mayor nivel de expresión en la fase proliferativa tardía, aproximadamente a mitad de ciclo, coincidiendo con el momento de la ovulación. Así pues, parece que, de manera cíclica, el receptor se empezara a expresar al principio del ciclo hasta llegar a un máximo, para después volver a niveles menores al finalizar éste. En los estudios mencionados sobre MOR y endometriosis, diferenciaron entre fase proliferativa y fase secretora, sin hacer referencia al día del ciclo menstrual (Matsuzaki *et al.* 2006, 2007), algo que parece importante teniendo en cuenta nuestros resultados, ya que podría marcar la diferencia entre presencia y/o ausencia del receptor y, de hecho, explicaría por qué en esos estudios no se observó la presencia de MOR.

Además, al hacer estudios de inmunolocalización, se vio cómo dicha localización cambiaba dependiendo de la fase del ciclo menstrual y el tipo celular, lo cual refuerza la hipótesis de que MOR

pueda regular distintos procesos durante el ciclo endometrial y que esta regulación se repita con el inicio de un nuevo ciclo. El ciclo endometrial, como ya se ha comentado en el apartado 1.2.5.2 de esta tesis, está principalmente regulado por las hormonas ováricas, aumentando los estrógenos en la fase proliferativa y, la progesterona, en cambio, en la fase secretora. En estudios previos, analizaron la concentración de péptidos opioides endógenos en la cavidad uterina, observando un aumento de β -endorfina, cuyo principal receptor es MOR, desde la fase folicular a la fase lútea (Petraglia *et al.* 1986). Además, se ha observado que la β -endorfina aumenta la concentración de receptores de estrógenos en el endometrio (Makrigrannakis *et al.* 1995), por lo que el aumento de MOR durante esta fase podría relacionarse con una posible función en el aumento de la sensibilidad a dicho péptido opioide.

Por otro lado, se ha descrito la presencia de MOR en células ciliadas del epitelio del oviducto de yegua, y ésta se relacionó con un posible efecto sobre la movilidad del espermatozoide (Desantis *et al.* 2008). Durante la fase proliferativa existe un proceso de ciliogénesis en el epitelio luminal del endometrio provocado por la secreción de estrógenos (Mazur y Kurman 2005). Teniendo en cuenta estas dos ideas, podría ser que MOR tuviera también un efecto en el tránsito del espermatozoide a través de la cavidad uterina durante la fase proliferativa tardía con el fin de propiciar que éste alcance al ovocito a tiempo en el lugar de fecundación: el útero.

El descenso en la expresión de MOR durante la fase secretora podría estar relacionado con los procesos de decidualización e implantación al final de esta fase. En la decidualización, que comienza en la fase secretora media, distintas moléculas inducen la acumulación de cAMP intracelular, lo que conlleva la síntesis de factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas esenciales para los procesos de diferenciación, implantación, reclutamiento de células del sistema inmune, etc. (Vinketova *et al.* 2016). Como ya se ha comentado, los péptidos opioides actúan inhibiendo la AC y disminuyendo así la concentración de cAMP (Mcnally y Akil 2002). Por este motivo, podría ser que los EOPs actúen inhibiendo este proceso de decidualización y, por ello, la presencia de MOR en la fase secretora disminuya con el fin de permitir una adecuada implantación. Esta hipótesis se ve apoyada por un estudio reciente en el que se demostró que la inducción de las vías de señalización opioides por administración de una sobredosis de morfina inhibía la proliferación y la diferenciación estromal, perjudicando así la receptividad del endometrio y, en consecuencia, la implantación (Tang *et al.* 2015). En estudios basados en los receptores cannabinoides, muy relacionados funcionalmente

con los receptores opioides, se observó también una menor expresión de sus receptores en la fase secretora cercana a la decidualización (Scotchie *et al.* 2015).

Así pues, estos resultados indican que el sistema opioide está ligado al desarrollo normal del ciclo en el endometrio humano, pudiendo tener diferentes funciones dependiendo de la fase del ciclo y el tipo celular en el que se encuentre el receptor, por lo que, una alteración de este sistema podría conducir a una disminución de la fertilidad. Al igual que en el caso del espermatozoide, estos datos deberían tenerse en cuenta en la clínica a la hora de administrar tratamientos crónicos con opiáceos, ya que se han encontrado restos de estos fármacos en el líquido folicular y en la cavidad uterina (Soussis *et al.* 1995; Hall *et al.* 2018).

Por último, es importante tener en cuenta que para realizar el estudio se han utilizado muestras provenientes de pacientes incluidas en el programa de reproducción asistida del Hospital Universitario de Cruces, por lo que, en algunos casos, los resultados podrían no representar a la población general. Partiendo de esta reflexión, creemos que sería interesante trasladar el estudio a un modelo animal para poder seguir profundizando en la función que ejerce MOR en cada fase del ciclo menstrual y estudiar si su modulación podría abrir nuevas puertas a la investigación en reproducción asistida. También sería interesante profundizar en el papel que MOR pudiera tener en el desarrollo de la endometriosis, por si pudiera ayudar a crear dianas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad que, a día de hoy, no tiene cura y afecta a casi un 10 % de las mujeres y a un 50 % de aquellas que presentan problemas de fertilidad (Greene *et al.* 2016; Sociedad Española de Fertilidad (SEF) 2018).

A modo de conclusión general, podríamos decir que el receptor mu opioide está presente e involucrado en la regulación de la maduración ovocitaria, la capacitación de espermatozoides y el endometrio, teniendo una función distinta dependiendo del tipo de proceso y del momento del ciclo reproductivo. Estos resultados muestran la vital importancia de profundizar en el estudio de este sistema en la reproducción, ya que, hoy en día, estamos expuestos a una gran cantidad de fármacos opiáceos y es importante conocer los efectos que ejercen más allá del sistema nervioso central. Además, conocer cómo el sistema opioide regula estos procesos podría permitir elucidar posibles causas de esterilidad, mejorar técnicas de reproducción asistida y desarrollar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de patologías en las cuales se ha visto la implicación de este sistema.

6 CONCLUSIONES

- 1.** El receptor mu opioide está presente en ovocitos y células de la granulosa provenientes del ovario de ratón. Los cambios de localización de MOR en el ovocito durante la maduración de ovocitos *in vitro*, pasando de una ubicación homogénea en el citoplasma en GV a una ubicación periférica en MI y MII, sugieren una función relacionada con la activación de proteínas de membrana durante el reinicio de la meiosis.
- 2.** La incubación con el agonista opioide morfina durante la maduración *in vitro* de ovocitos afecta al proceso de maduración ovocitaria a través de la regulación de las proteínas AKT y ERK1/2, implicadas en las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK.
- 3.** La adición de morfina al medio de maduración *in vitro* de ovocitos mejora la producción de blastocistos tras la realización de la fecundación *in vitro* en el modelo murino y este efecto es revertido en presencia del antagonista naloxona. Por tanto, el receptor mu opioide puede ser una diana terapéutica para la mejora de estos medios en la clínica.
- 4.** El receptor mu opioide se encuentra presente en espermatozoides maduros de ratón, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico. Se localiza principalmente distribuido en la cabeza del espermatozoide, con mayor intensidad en la región acrosómica, y en el flagelo.
- 5.** La capacitación *in vitro* en presencia de morfina provoca un descenso en la tasa de fecundación, lo cual se traslada a una menor tasa de blastocistos obtenidos. Además, este efecto es bloqueado por el antagonista naloxona.
- 6.** El receptor mu opioide está presente en el endometrio humano durante todas las fases del ciclo menstrual, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico. Su presencia es mayor en el epitelio superficial, seguido del epitelio glandular y el estroma.
- 7.** El nivel de expresión del receptor mu opioide varía a lo largo del ciclo menstrual humano. Alcanza un máximo en la fase proliferativa tardía, a mitad de ciclo, coincidiendo con el momento de la ovulación. Después, disminuye en la fase secretora, pasando a niveles bajos en el momento de la implantación. Esta dinámica de expresión sugiere una implicación del receptor mu en el ciclo endometrial humano.

7 BIBLIOGRAFÍA

A

- Adhikari D., y Liu K. (2014). The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 480-487. doi:10.1016/j.mce.2013.07.027
- Agirregoitia E. (2008). Opioide-hartzaileak (d, k, m) eta kannabinoide-hartzaileak (CB1, CB2) giza espermatozoideetan espresatzen dira eta haien mugikortasunean eragiten dute.
- Agirregoitia E., Peralta L., Mendoza R., Expósito A., Díaz Ereño E., Matorras R., y Agirregoitia N. (2012). Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* **24**, 550-557. doi:10.1016/j.rbmo.2012.02.007
- Agirregoitia E., Subiran N., Valdivia A., Gil J., Zubero J., y Irazusta J. (2012). Regulation of human sperm motility by opioid receptors. *Andrologia* **44**, 578-585. doi:10.1111/j.1439-0272.2011.01230.x
- Agirregoitia E., Valdivia A., Carracedo A., Casis L., Gil J., Subiran N., Ochoa C., y Irazusta J. (2006). Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 4969-75. doi:10.1210/jc.2006-0599
- Al-Hasani R., y Bruchas M. R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* **115**, 1363-1381. doi:10.1097/ALN.0b013e318238bba6
- Albertini D. F., Combelles C. M. H., Benecchi E., y Carabatsos M. J. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* **121**, 647-653. doi:10.1530/rep.0.1210647
- Albrizio M., Guaricci A. C., Calamita G., Zarrilli A., y Minoia P. (2006). Expression and immunolocalization of the mu-opioid receptor in human sperm cells. *Fertil. Steril.* **86**, 1776-1779. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.04.037
- Albrizio M., Guaricci A. C., Maritato F., Sciorsci R. L., Mari G., Calamita G., Lacalandra G. M., Aiudi G. G., Minoia R., Dell'Aquila M. E., y Minoia P. (2005). Expression and subcellular localization of the mu-opioid receptor in equine spermatozoa: evidence for its functional role. *Reproduction* **129**, 39-49. doi:10.1530/rep.1.00284
- Albrizio M., Guaricci A. C., Milano S., Macri F., y Aiudi G. (2014). Mu opioid receptor in spermatozoa, eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus Aurata*) and its involvement in stress related to aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.* **40**, 997-1009. doi:10.1007/s10695-013-9900-9

- Albrizio M., Lacalandra G. M., Micera E., Guaricci A. C., Nicassio M., y Zarrilli A. (2010). Delta opioid receptor on equine sperm cells: subcellular localization and involvement in sperm motility analyzed by computer assisted sperm analyzer (CASA). *Reprod. Biol. Endocrinol.* **8**, doi:10.1186/1477-7827-8-78
- Allen L. G., y Kalra S. P. (1986). Evidence that a decrease in opioid tone may evoke preovulatory luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* **118**, 2375-2381. doi:10.1210/endo-118-6-2375
- Alvarez Y., y Farré M. (2005). Farmacología de los opioides. *Adicciones* **17**, 21-40.
- van Amsterdam J., y van den Brink W. (2015). The Misuse of Prescription Opioids: A Threat for Europe? *Curr. Drug Abuse Rev.* **8**, 3-14. doi:10.2174/187447370801150611184218
- Aquila S., Sisci D., Gentile M., Middea E., Catalano S., Carpino A., Rago V., y Andò S. (2004). Estrogen receptor (ER) α and ER β are both expressed in human ejaculated spermatozoa: Evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 1443-1451. doi:10.1210/jc.2003-031681
- Armenian P., Vo K. T., Barr-Walker J., y Lynch K. L. (2018). Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. *Neuropharmacology* **134**, 121-132. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.10.016
- Ascoli M., Fanelli F., y Segaloff D. L. (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Structure* **23**, 141-174. doi:10.1210/edrv.23.2.0462

B

- Bajo Arenas J., y Coroleu Lletget B. (2009). «Fundamentos de reproducción.»
- Bauersachs S., Ulbrich S. E., Gross K., Schmidt S. E. M., Meyer H. H. D., Einspanier R., Wenigerkind H., Vermehren M., Blum H., Sinowatz F., y Wolf E. (2005). Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: Detection of molecular pathways involved in functional changes. *J. Mol. Endocrinol.* **34**, 889-908. doi:10.1677/jme.1.01799
- Bedzhov I., Graham S. J. L., Leung C. Y., y Zernicka-Goetz M. (2014). Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. *Philos. Trans. R. Soc.* **369**, 20130538. doi:http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0538
- Behringer R. (2014). «Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual.»

- Bhakta H. H., Refai F. H., y Avella M. A. (2019). The molecular mechanisms mediating mammalian fertilization. *Development* **146**, dev176966. doi:10.1242/dev.176966
- Bodnar R. J. (2013). Endogenous Opiates and Behavior: 2012. *Peptides* **50**, 55-95. doi:10.1016/j.peptides.2018.01.011
- Borthwick J. M., Charnock-Jones D. S., Tom B. D., Hull M. L., Teirney R., Phillips S. C., y Smith S. K. (2003). Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 19-33. doi:10.1093/humrep/gag004
- Böttcher B., Seeber B., Leyendecker G., y Wildt L. (2017). Impact of the opioid system on the reproductive axis. *Fertil. Steril.* **108**, 207-213. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.06.009
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brook K., Bennett J., y Desai S. P. (2017). The chemical history of morphine: an 8000-year journey, from resin to de-novo synthesis. *J. Anesth. Hist.* **3**, 50-55. doi: 10.1016/j.janh.2017.02.001.
- Bruce D. L., Hinkley R., y Norman P. F. (1985). Fentanyl does not inhibit fertilization or early development of sea urchin eggs. *Anesth. Analg.* **64**, 498-500.
- Budwit-Novotny D. A., McCarty K. S., Cox E. B., Soper J. T., Mutch D. G., Creasman W. T., Flowers J. L., y McCarty K. S. J. (1986). Immunohistochemical Analyses of Estrogen Receptor in Endometrial Adenocarcinoma Using a Monoclonal Antibody. *Cancer Res.* **46**, 5419-5425.

C

- Cahill C. M., Holdridge S. V., y Morinville A. (2007). Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 23-31. doi:10.1016/j.tips.2006.11.003
- Carlson B. M. (2014). «Embriología humana y biología del desarrollo.»
- Cecconi S., Mauro A., Cellini V., y Patacchiola F. (2012). The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 809-817. doi:10.1387/ijdb.120146sc
- Cecconi S., Rossi G., Santilli A., Di Stefano L., Hoshino Y., Sato E., Palmerini M. G., y Macchiarelli G. (2010). Akt expression in mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Reprod. Biomed. Online* **20**, 35-41. doi:10.1016/j.rbmo.2009.10.011

- Chan H. C. S., McCarthy D., Li J., Palczewski K., y Yuan S. (2017). Designing safer analgesics via mu-opioid receptor pathways. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 1016-1037. doi:10.1016/j.tips.2017.08.004.
- Chang E. M., Song H. S., Lee D. R., Lee W. S., y Yoon T. K. (2014). In vitro maturation of human oocytes: Its role in infertility treatment and new possibilities. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **41**, 41-46. doi:10.5653/cerm.2014.41.2.41
- Chatzaki E., Makrigiannakis A., Margioris A. N., Kouimtzooglou E., y Gravanis A. (2001). The Fas/FasL apoptotic pathway is involved in κ -opioid-induced apoptosis of human endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 867-74.
- Chatzaki E., Margioris A. N., Makrigiannakis A., Castanas E., Georgoulas V., y Gravanis A. (2000). Kappa opioids and TGF β 1 interact in human endometrial cells. *Mol. Hum. Reprod.* **6**, 602-9.
- Chen C.-L. C., Chang C.-C., Krieger D. T., y Bardin C. W. (1986). Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis. *Endocrinology* **118**, 2382-2389. doi:10.1210/endo-118-6-2382
- Chen Y., Kong S., Tang X., Fu Y., Wang B., Zhang S., y Wang H. (2014). Preimplantation Mouse Embryo Is a Target for Opioid Ligand-Receptor Signaling. *Biol. Reprod.* **91**, 1-9. doi:10.1095/biolreprod.114.118083
- Chorbov V. M., Todorov A. A., Lynskey M. T., y Cicero T. J. (2011). Elevated levels of DNA methylation at the OPRM1 promoter in blood and sperm from male opioid addicts. *J. Opioid Manag.* **7**, 258-64. doi:10.1177/0269881113503504
- Chouzouris T. M., Dovolou E., Krania F., Pappas I. S., Dafopoulos K., Messinis I. E., Anifandis G., y Amiridis G. S. (2017). Effects of ghrelin on activation of Akt1 and ERK1/2 pathways during in vitro maturation of bovine oocytes. *Zygote* **25**, 183-189. doi:10.1017/S096719941700003X
- Christians E., Boiani M., Garagna S., Dessy C., Redi C. A., Renard J. P., y Zuccotti M. (1999). Gene expression and chromatin organization during mouse oocyte growth. *Dev. Biol.* **207**, 76-85. doi:10.1006/dbio.1998.9157
- Cicero T. J., Davis L. A., LaRegina M. C., Meyer E. R., y Schlegel M. S. (2002). Chronic opiate exposure in the male rat adversely affects fertility. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **72**, 157-163. doi:10.1016/S0091-3057(01)00751-1
- Cicero T., Meyer E., Wiest W., Olney J., y Bell R. (1975). Effects of chronic morphine administration on the reproductive system of the male rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **192**, 542-548.

Cicero T. J., Nock B., O'Connor L., Adams M., y Meyer E. R. (1995). Adverse effects of paternal opiate exposure on offspring development and sensitivity to morphine-induced analgesia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **273**, 386-392.

Clarke H. J. (2018). Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **7**, 1-33. doi:10.1002/wdev.294.

Cominski T. P., Ansonoff M. A., Turchin C. E., y Pintar J. E. (2014). Loss of the mu opioid receptor induces strain-specific alterations in hippocampal neurogenesis and spatial learning. *Neuroscience* **278**, 11-19. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.039

Conti M., Hsieh M., Zamah A. M., y Oh J. S. (2012). Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell Endocrinol* **356**, 65-73. doi:10.1016/j.mce.2011.11.002

Crews C. M., y Erikson R. L. (1992). Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: Relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8205-8209. doi:10.1073/pnas.89.17.8205

Cummins J. M. (2004). The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **115**, 23-29. doi:10.1016/j.ejogrb.2004.01.011

Cunningham F. G., Leveno K. J., Bloom S. L., Hauth J. C., Rouse D. J., y Spong C. Y. (2011). «Williams Obstetricia 23th Edition.» (McGrawHill)

D

Dai X., Song H., Cui S., Wang T., Liu Q., y Wang R. (2010). The stimulative effects of endogenous opioids on endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **628**, 42-50. doi:10.1016/j.ejphar.2009.11.035

Dang-Nguyen T. Q., Viet Linh N., Minoia R., Kaneda M., Somfai T., Haraguchi S., Akagi S., Kikuchi K., Nakai M., Tajima A., y Nagai T. (2013). Naloxone increases maturation rate and ratio of inner cell mass to total cells in blastocysts in pigs. *Anim. Sci. J.* **84**, 765-773. doi:10.1111/asj.12071

Darszon A., Nishigaki T., Beltran C., y Treviño C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol. Rev.* **91**, 1305-1355. doi:10.1152/physrev.00028.2010

Davidson A., Vermesh M., Paulson R. J., Graczykowski J. W., y Lobo R. A. (1989). Presence of immunoreactive β -endorphin and calcitonin in human seminal plasma, and their relation to sperm physiology. *Fertil. Steril.* **51**, 878-880. doi:10.1016/S0015-0282(16)60684-2

Davison L. A., McManus C. J., y Fitzgerald B. P. (1998). Gonadotropin Response to Naloxone in the Mare: Effect of Time of Year and Reproductive Status. *Biol. Reprod.* **59**, 1195-1199. doi:10.1095/biolreprod59.5.1195

Dell'Aquila M. E., Albrizio M., Guaricci A. C., De Santis T., Maritato F., Tremoleda J. L., Colenbrander B., Guerra L., Casavola V., y Minoia P. (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. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 1229-1246. doi:10.1002/mrd.20869

Dell'Aquila M. E., Casavola V., Reshkin S. J., Albrizio M., Guerra L., Maritato F., y Minoia P. (2002). Effects of beta-endorphin and Naloxone on in vitro maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **63**, 210-222. doi:10.1002/mrd.10163

Desantis S., Albrizio M., Ventriglia G., Deflorio M., Guaricci A. C., Minoia R., y De Metrio G. (2008). The presence of the mu-opioid receptor in the isthmus of mare oviduct. *Histol. Histopathol.* **23**, 555-564. doi:10.14670/HH-23.555

Dobson H., y Smith R. F. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.* **60-61**, 743-752. doi:10.1016/S0378-4320(00)00080-4

Drobnis E., y Nangia A. (2017). Pain medications and male reproduction. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1034**, 39-57. doi:10.1007/978-3-319-69535-8_6

Duranthon V., y Renard J. P. (2001). The developmental competence of mammalian oocytes: A convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* **55**, 1277-1289. doi:10.1016/S0093-691X(01)00482-4

E

Edwards R. G. (1965). Maturation in Vitro of Human Ovarian Oocytes. *Lancet* **286**, 926-929. doi:10.1016/s0140-6736(65)92903-x

Elde R., Arvidsson U., Riedl M., Vulchanova L., Lee J.-H., Dado R., Nakano A., Chakrabarti S., Zhang X., Loh H. H., Law P. Y., Hokfelt T., y Wessendorf M. (1995). Distribution of Neuropeptide Receptors: New Views of Peptidergic Neurotransmission Made Possible by Antibodies to Opioid Receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **757**, 390-404. doi:10.1111/j.1749-6632.1995.tb17497.x

Eppig J. J., Wigglesworth K., y Chesnel F. (1993). Secretion of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes: Relationship to oocyte growth and competence to resume meiosis. *Developmental Biology* **158**, 400-409. doi:10.1006/dbio.1993.1198

Estomba H., Muñoa-Hoyos I., Gianzo M., Urizar-Arenaza I., Casis L., Irazusta J., y Subirán N. (2016). Expression and localization of opioid receptors in male germ cells and the implication for mouse spermatogenesis. *PLoS One* **11**, e0152162. doi:10.1371/journal.pone.0152162

F

Fabbri A., Jannini E. A., Gnessi L., Ulisse S., Moretti C., y Isidori A. (1989). Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J. Steroid Biochem.* **32**, 145-150. doi:10.1016/0022-4731(89)90155-6

Facchinetti F., Storchi A. R., Petraglia F., Volpe A., y Genazzani A. R. (1988). Expression of proopiomelanocortin-related peptides in human follicular fluid. *Peptides* **9**, 1089-1092. doi:10.1016/0196-9781(88)90094-0

Faletti A. G., Mohn C., Farina M., Lomniczi A., y Rettori V. (2003). Interaction among beta-endorphin, nitric oxide and prostaglandins during ovulation in rats. *Reproduction* **125**, 469-477. doi:10.1530/rep.0.1250469

Faletti A., Viggiano J. M., y Gimeno M. A. F. (1995). Beta-endorphin inhibits prostaglandin synthesis in rat ovaries and blocks induced ovulation. *Prostaglandins* **49**, 93-103. doi:10.1016/0090-6980(94)00006-1

Faller A., y Schunke M. (2006). «Estructura y función del cuerpo humano.»

Fan H.-Y., Liu Z., Shimada M., Sterneck E., Johnson P. F., Hedrick S. M., y Richards J. S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in Ovarian Granulosa Cells Are Essential for Female Fertility. *Science* (80-.). **324**, 938-942. doi:10.1126/science.1171396

Fan H.-Y., Shimada M., Liu Z., Cahill N., Noma N., Wu Y., Gossen J., y Richards J. S. (2008). Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development* **135**, 2127-2137. doi:10.1242/dev.020560

Fan H.-Y., y Sun Q.-Y. (2004). Involvement of mitogen-activated protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals1. *Biol. Reprod.* **70**, 535-547. doi:10.1095/biolreprod.103.022830

Farag A. G. A., Basha M. A., Amin S. A., Elnaidany N. F., Elhelbawy N. G., Mostafa M. M. T., Khodier S. A., Ibrahem R. A., y Mahfouz R. Z. (2018). Tramadol (opioid) abuse is associated with a dose- and time-dependent poor sperm quality and hyperprolactinaemia in young men. *Andrologia* **50**, e13026. doi:10.1111/and.13026

- Fathi M., Salama A., y Badr M. R. (2018). Improvement of the developmental competence of canine oocyte using caffeine supplementation during IVM at different maturation time. *Zygote* **26**, 162-167. doi:10.1017/S0967199418000059
- Fissore R. A., He C. L., y Vande Woude G. F. (1996). Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* **55**, 1261-70. doi:10.1095/biolreprod55.6.1261
- Flesch F. M., y Gadella B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1469**, 197-235. doi:10.1016/s0304-4157(00)00018-6
- Florez J., Armijo J. A., y Mediavilla A. (1998). «Farmacología humana.»
- Foresta C., Caretto A., Indino M., And C. B., y Scandellari C. (1986). Localization of met-enkephalin on human spermatozoa and evidence for its physiological role. *Arch. Androl.* **17**, 19-24. doi:10.3109/01485018608986952
- Fraioli F., Fabbri A., Gnessi L., Silvestroni L., Moretti C., Redi F., y Isidori A. (1984). Beta-endorphin, Met-enkephalin, and calcitonin in human semen: evidence for a possible role in human sperm motility. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **438**, 365-370. doi:10.1111/j.1749-6632.1984.tb38297.x
- Freudzon L., Norris R. P., Hand A. R., Tanaka S., Saeki Y., Jones T. L. Z., Rasenick M. M., Berlot C. H., Mehlmann L. M., y Jaffe L. A. (2005). Regulation of meiotic prophase arrest in mouse oocytes by GPR3, a constitutive activator of the Gs G protein. *J. Cell Biol.* **171**, 255-265. doi:10.1083/jcb.200506194
- Fu C. Y., Xia R. L., Zhang T. F., Lu Y., Zhang S. F., Yu Z. Q., Jin T., y Mou X. Z. (2014). Hemokinin-1(4-11)-induced analgesia selectively up-regulates δ -opioid receptor expression in mice. *PLoS One* **9**, e90446. doi:10.1371/journal.pone.0090446
- Fuhrich D. G., Lessey B. A., y Savaris R. F. (2013). Comparison of HSCORE assessment of endometrial β 3 integrin subunit expression with digital HSCORE using computerized image analysis (ImageJ). *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **35**, 210-216.
- Fukuda K., Kato S., Morikawa H., Shoda T., y Mori K. (1996). Functional coupling of the delta, mu and kappa opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and Arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J. Neurochem.* **67**, 1309-1316. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.67031309.x

G

- Gellersen B., y Brosens J. J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr. Rev.* **35**, 851-905. doi:10.1210/er.2014-1045
- Gellersen B., Brosens I. A., y Brosens J. J. (2007). Decidualization of the human endometrium: Mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin. Reprod. Med.* **25**, 445-453. doi:10.1055/s-2007-991042
- Gilbert S. F. (2005). «Biología del desarrollo.» (Editorial médica Panamericana)
- Gilchrist R. B., Luciano A. M., Richani D., Zeng H. T., Wang X., De Vos M., Sugimura S., Smitz J., Richard F. J., y Thompson J. G. (2016). Oocyte maturation and quality: Role of cyclic nucleotides. *Reproduction* **152**, R143-R157. doi:10.1530/REP-15-0606
- Gosden R., y Lee B. (2010). Portrait of an oocyte: Our obscure origin. *J. Clin. Invest.* **120**, 973-983. doi:10.1172/JCI41294
- Gravanis A., Makrigiannakis A., Chatzaki E., Zoumakis E., Tsatsanis C., y Margioris A. N. (2002). Stress neuropeptides in the human endometrium: paracrine effects on cell differentiation and apoptosis. *Hormones* **1**, 139-148. doi:10.14310/horm.2002.1161
- Gravanis A., Makrigiannakis A., Stournaras C., y Margioris A. N. (1994). Interaction between Steroid Hormones and Endometrial Opioids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **734**, 245-256. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb21754.x
- Greene A. D., Lang S. A., Kendzioriski J. A., Sroga-Rios J. M., Herzog T. J., y Burns K. A. (2016). Endometriosis: Where are we and where are we going? *Reproduction* **152**, R63-R78. doi:10.1530/REP-16-0052

H

- Hall J. E. (2012). «Guyton y Hall: Compendio de fisiología médica.»
- Hall E. S., Wexelblatt S. L., y Greenberg J. M. (2018). Surveillance of intrauterine opioid exposures using electronic health records. *Popul. Health Manag.* **21**, 486-492. doi:10.1089/pop.2017.0184
- Hamada H., Kishioka S., Yamoto M., y Nakano R. (1995). ³H]naloxone binding sites in porcine ovarian follicles and corpora lutea during the ovarian cycle. *Eur. J. Endocrinol.* **132**, 622-6. doi:10.1530/eje.0.1320622

Hatzoglou A., Gravanis A., Margioris A. N., Zoumakis E., y Castanas E. (1995). Identification and characterization of opioid-binding sites present in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 418-423. doi:10.1210/jcem.80.2.7852499

Hill R. W., Wyse G. A., y Anderson M. (2006). «Fisiología humana.»

Hinckley M., Vaccari S., Horner K., Chen R., y Conti M. (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. doi:10.1016/j.ydbio.2005.08.019

Horcajadas J. A., Díaz-Gimeno P., Pellicer A., y Simón C. (2007). Uterine receptivity and the ramifications of ovarian stimulation on endometrial function. *Semin. Reprod. Med.* **25**, 454-460. doi:10.1055/s-2007-991043

Hoshino Y., y Sato E. (2008). Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes. *Dev. Biol.* **314**, 215-223. doi:10.1016/j.ydbio.2007.12.005

Hunter M. (2000). Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod.* **5**, 122-130. doi:10.1530/ror.0.0050122

I

Iorga A. I., Valentini L., De Santis T., Ambruosi B., Albrizio M., Guaricci A. C., Caira M., y Dell'Aquila M. E. (2009). Expression of the mu opioid receptor and effects of the opioid antagonist naloxone on in vitro maturation of oocytes recovered from anoestrous bitches. *Reprod. Domest. Anim.* **44**, 263-268. doi:10.1111/j.1439-0531.2009.01423.x

J

Jaschke N., Lunger F., Wildt L., y Seeber B. (2018). Beta endorphin in serum and follicular fluid of PCOS- and non-PCOS women. *Arch. Gynecol. Obstet.* **298**, 217-222. doi:10.1007/s00404-018-4793-6

Jin D. F., Muffly K. E., Okulicz W. C., y Kilpatrick D. L. (1988). Estrous cycle- and pregnancy-related differences in expression of the proenkephalin and proopiomelanocortin genes in the ovary and uterus. *Endocrinology* **122**, 1466-1471. doi:10.1210/endo-122-4-1466

De Jonge C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Hum. Reprod. Update* **11**, 205-214. doi:10.1093/humupd/dmi010

Jose-Miller A. B., Boyden J. W., y Frey K. A. (2007). Infertility. *Am. Fam. Physician* **75**, 849-856.

K

Kalous J., Kubelka M., Šolc P., Šušor A., y Motlík J. (2009). AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction* **138**, 645-654. doi:10.1530/rep-08-0461

Kalous J., Solc P., Baran V., Kubelka M., Schultz R. M., y Motlik J. (2006). PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. *Biol. Cell* **98**, 111-123. doi:10.1042/bc20050020

Kaminski T., Siawrys G., Bogacka I., Okrasa S., y Przala J. (2003). The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells. *Anim. Reprod. Sci.* **78**, 71-84. doi:10.1016/S0378-4320(03)00042-3

Kew D., Muffly K. E., y Kilpatrick D. L. (1990). Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9143-9147. doi:10.1073/pnas.87.23.9143

Kidder G. M., y Vanderhyden B. C. (2010). Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: Ensuring oocyte developmental competence. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**, 399-413. doi:10.1139/Y10-009

Kikkawa F., Kajiyama H., Ino K., Watanabe Y., Ito M., Nomura S., Itakura A., Tsujimoto M., y Mizutani S. (2002). Possible involvement of placental peptidases that degrade gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the dynamic pattern of placental hCG secretion via GnRH degradation. *Placenta* **23**, 483-489. doi:10.1053/plac.2002.0794

Kuczkowski K. M. (2007). The effects of drug abuse on pregnancy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **19**, 578-585. doi:10.1097/GCO.0b013e3282f1bf17

Kumar M., Faraji M., Sarwalia P., Kumar S., Gohain M., De S., Kumar R., y Datta T. K. (2018). Propensity in low-grade oocytes for delayed germinal vesicle breakdown compromises the developmental ability of sub-optimal grade *Bubalus bubalis* oocytes. *Zygote* 1-7. doi:10.1017/S0967199418000321

Kumru S., Simsek M., Yilmaz B., Sapmaz E., Kutlu S., Sandal S., y Canpolat S. (2001). Differential regulation of preovulatory luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by opioids in the proestrous rat. *Physiol. Res.* **50**, 397-403.

Kupka M. S., D'Hooghe T., Ferraretti A. P., De Mouzon J., Erb K., Castilla J. A., Calhaz-Jorge C., De Geyter C., y Goossens V. (2016). Assisted reproductive technology in Europe, 2011: Results

generated from European registers by ESHRE. *Hum. Reprod.* **31**, 233-248. doi:10.1093/humrep/dev319

L

Laux-Biehlmann A., Mouheiche J., Vérièpe J., y Goumon Y. (2013). Endogenous morphine and its metabolites in mammals: History, synthesis, localization and perspectives. *Neuroscience* **233**, 95-117. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.013

Lawrence B. V., Lipton A., Harvey H. A., Santen R. J., Wells, Samuel A., Cox C. E., White D. S., y Smart E. K. (1980). Influence of estrogen receptor status on response of metastatic breast cancer to aminoglutethimide therapy. *Cancer* **45**, 786-791. doi: 10.1002/1097-0142(19800215)

Levy M. N., Stanton B. A., y Koeppen B. M. (2006). «Berne & Levy: Principles of physiology.»

Li W. I., Jiao S., Chen C. L., y Bazer F. W. (1993). Effects of Reproductive Status and Breed Pig Uterus : *J. Reprod. Fertil.* **99**, 253-258. doi:10.1530/jrf.0.0990253

Li S., y Winuthayanon W. (2017). Oviduct: Roles in fertilization and early embryo development. *J. Endocrinol.* **232**, R1-R26. doi:10.1530/JOE-16-0302

Listos J., Łupina M., Talarek S., Mazur A., Orzelska-Gorka J., y Kotlinska J. (2019). The mechanisms involved in morphine addiction: an overview. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4302. doi:10.3390/ijms20174302

Liu M. (2011). The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **9**, 1-17. doi:10.1186/1477-7827-9-149

Lonergan P., y Fair T. (2016). Maturation of Oocytes in Vitro. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **4**, 10.1-10.14. doi:10.1146/annurev-animal-022114-110822

López-Cardona A. P., Pérez-Cerezales S., Fernández-González R., Laguna-Barraza R., Pericuesta E., Agirregoitia N., Gutiérrez-Adán A., y Agirregoitia E. (2017). CB1cannabinoid receptor drives oocyte maturation and embryo development via PI3K/Akt and MAPK pathways. *FASEB J.* **31**, 3372-3382. doi:10.1096/fj.201601382RR

López-Cardona A. P., Sánchez-Calabuig M. J., Beltran-Breña P., Agirregoitia N., Rizos D., Agirregoitia E., y Gutierrez-Adán A. (2016). Exocannabinoids effect on in vitro bovine oocyte maturation via activation of AKT and ERK1/2. *Reproduction* **152**, 603-612. doi:10.1530/rep-16-0199

- Low K. G., Nielsen C. P., West N. B., Douglass J., Brenner R. M., Maslar I. A., y Melner M. H. (1989). Proenkephalin Gene Expression in the Primate Uterus: Regulation by Estradiol in the Endometrium. *Mol. Endocrinol.* **3**, 852-857. doi:10.1210/mend-3-5-852
- Lowther K. M., Nikolaev V. O., y Mehlmann L. M. (2011). Endocytosis in the mouse oocyte and its contribution to cAMP signaling during meiotic arrest. *Reproduction* **141**, 737-747. doi:10.1530/REP-10-0461
- Lunger F., Vehmas A. P., Fürnrrohr B. G., Sopper S., Wildt L., y Seeber B. (2016). Opiate receptor blockade on human granulosa cells inhibits VEGF release. *Reprod. Biomed. Online* **32**, 316-322. doi:10.1016/j.rbmo.2015.12.006

M

- Madishetti S., Schneble N., König C., Hirsch E., Schulz S., Müller J. P., y Wetzker R. (2014). PI3Ky integrates cAMP and Akt signalling of the μ -opioid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 3328-3337. doi:10.1111/bph.12698
- Maizels E. T., Cottom J., Jones J. C. R., y Hunzicker-Dunn M. (1998). Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **139**, 3353-3356. doi:10.1210/endo.139.7.6188
- Makrigiannakis A., Margioris A., Markogiannakis E., Stournaras C., y Gravanis A. (1992). Steroid hormones regulate the release of immunoreactive beta-endorphin from the Ishikawa human endometrial cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75**, 584-589.
- Makrigiannakis A., Margioris A. N., Stournams C., y Gravanis A. (1995). Opioid peptides in the female reproductive system: physiological implications. *Biomed. Rev.* **4**, 71-83.
- Manglik A., Kruse A. C., Kobilka T. S., Thian F. S., Mathiesen J. M., Sunahara R. K., Pardo L., Weis W. I., Kobilka B. K., y Granier S. (2012). Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **485**, 321-6. doi:10.1038/nature10954
- Manning B. D., y Toker A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381-405. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001
- Mansour A., Fox C. A., Thompson R. C., Akil H., y Watson S. J. (1994). μ -Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to μ -receptor binding. *Brain Res.* **643**, 245-265. doi:10.1016/0006-8993(94)90031-0

- Matsuzaki S., Canis M., Pouly J.-L., Botchorishvili R., Déchelotte P. J., y Mage G. (2006). Differential expression of genes in eutopic and ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis. *Fertil. Steril.* **86**, 548-53. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.02.093
- Matsuzaki S., Canis M., Pouly J.-L., Botchorishvili R., Déchelotte P. J., y Mage G. (2007). Both GnRH agonist and continuous oral progestin treatments reduce the expression of the tyrosine kinase receptor B and mu-opioid receptor in deep infiltrating endometriosis. *Hum. Reprod.* **22**, 124-8. doi:10.1093/humrep/del368
- Matsuzaki S., Canis M., Vaurs-Barrière C., Boespflug-Tanguy O., Dastugue B., y Mage G. (2005). DNA microarray analysis of gene expression in eutopic endometrium from patients with deep endometriosis using laser capture microdissection. *Fertil. Steril.* **84**, 1180-1190. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.04.041
- Maybin J. A., y Critchley H. O. D. (2015). Menstrual physiology: Implications for endometrial pathology and beyond. *Hum. Reprod. Update* **21**, 748-761. doi:10.1093/humupd/dmv038
- Mazur M. T., y Kurman R. J. (2005). Normal Endometrium and Infertility Evaluation. «Diagnosis of Endometrial Biopsies and Curettings». pp. 7-33
- McGee E. A., y Hsueh A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* **21**, 200-214. doi:10.1210/edrv.21.2.0394
- McGowen M. R., Erez O., Romero R., y Wildman D. E. (2014). The evolution of embryo implantation. *Int. J. Dev. Biol.* **58**, 155-161. doi:10.1387/ijdb.140020dw
- Mcnally G. P., y Akil H. (2002). Opioid peptides and their receptors: Overview and function in pain modulation. «Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress».
- 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. doi:10.1530/rep.1.00793
- Mehlmann L. M., Saeki Y., Tanaka S., Brennan T. J., Evsikov A. V., Pendola F. L., Knowles B. B., Eppig J. J., y Jaffe L. A. (2004). The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science (80-.)*. **306**, 1947-50. doi:10.1126/science.1103974
- Mehmanesh H., Almeida O. F. X., Nikolarakis K. E., y Herz a. (1988). Hypothalamic LH-RH release after acute and chronic treatment with morphine studied in a combined in vivo/in vitro model. *Brain Res.* **451**, 69-76. doi:10.1016/0006-8993(88)90750-0
- Mehta J. G. (2014). In Vitro Maturation. *Fertil. Sci. Res.* **1**, 7-15. doi:10.4103/2394-4285.146700

- Melner M. H., Young S. L., Czerwiec F. S., Lyn D., Puett D., Roberts J. L., y Koos R. D. (1986). The regulation of granulosa cell proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid by androgens and gonadotropins. *Endocrinology* **119**, 2082-2088. doi:10.1210/endo-119-5-2082
- Mendes S., Timóteo-Ferreira F., Almeida H., y Silva E. (2019). New insights into the process of placentation and the role of oxidative uterine microenvironment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **25**, 9174521. doi:10.1155/2019/9174521
- Merton J. S., De Roos A. P. W., Mullaart E., De Ruigh L., Kaal L., Vos P. L. A. M., y Dieleman S. J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* **59**, 651-674. doi:10.1016/S0093-691X(02)01246-3
- Mihajlović A. I., y Bruce A. W. (2017). The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: Integrating cell position and polarity. *Open Biol.* **7**, 170210. doi:10.1098/rsob.170210
- Miller D., Briggs D., Snowden H., Hamlington J., Rollinson S., Lilford R., y Krawetz S. A. (1999). A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: Implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene* **237**, 385-392. doi:10.1016/s0378-1119(99)00324-8
- Miller D., Ostermeier G. C., y Krawetz S. A. (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol. Med.* **11**, 156-163. doi:10.1016/j.molmed.2005.02.006
- Minami M., y Satoh M. (1995). Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* **23**, 121-145. doi:10.1016/0168-0102(95)00933-K
- Mollereau C., y Mouledous L. (2000). Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* **21**, 907-917.
- Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J. L., Moisand C., Chalon P., Caput D., Vassart G., y Meunier J. C. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* **341**, 33-38. doi:10.1016/0014-5793(94)80235-1
- Moor R. M., Smith M. W., y Dawson R. M. C. (1980). Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp. Cell Res.* **126**, 15-29. doi:10.1016/0014-4827(80)90466-8
- Moore K. L., y Persaud T. V. . (2008). «Embriología clínica.»

N

Namiki T., Ito J., y Kashiwazaki N. (2018). Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice. *Reprod. Med. Biol.* **17**, 331-342. doi:10.1002/rmb2.12103

Neto F. T. L., Bach P. V., Najari B. B., Li P. S., y Goldstein M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* **59**, 10-26. doi:10.1016/j.semcd.2016.04.009

Nishi Y., Takeshita T., Sato K., y Araki T. (2003). Change of the Mitochondrial Distribution in Mouse Ooplasm During In Vitro Maturation. *J. Nippon Med. Sch.* **70**, 408-415. doi:10.1272/jnms.70.408

Norwitz E. R., Schust D. J., y Fisher S. J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1400-1408.

Noyes R. W., Hertig A. T., y Rock J. (1950). Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.* **1**, [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378\(16\)33500-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378(16)33500-1)

O

Okrasa S., Skowronski M. T., Staszkiwicz J., Kotwica G., Łakomy M., y Ziecik A. J. (2003). The effects of estradiol on beta-endorphin, GnRH and galanin content in the oviduct and the uterus of ovariectomized gilts. *Reprod. Biol.* **3**, 63-80.

P

Panigone S., Hsieh M., Fu M., Persani L., y Conti M. (2008). Luteinizing Hormone Signaling in Preovulatory Follicles Involves Early Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor Pathway. *Mol. Endocrinol.* **22**, 924-936. doi:10.1210/me.2007-0246

Parvizi N. (2000). Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female. *Anim. Reprod. Sci.* **60-61**, 31-47. doi:10.1016/S0378-4320(00)00131-7

Peralta L., Agirregoitia E., Mendoza R., Expósito A., Casis L., Matorras R., y Agirregoitia N. (2011). Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes. *Reprod. Biomed. Online* **23**, 372-379. doi:10.1016/j.rbmo.2011.05.011

- Petraglia F., Facchinetti F., M'Futa K., Ruspa M., Bonavera J. J., Gandolfi F., y Genazzani A. R. (1986). Endogenous opioid peptides in uterine fluid. *Fertil. Steril.* **46**, 247-251. doi:10.1016/S0015-0282(16)49520-8
- Petraglia F., Segre A., Facchinetti F., Campanini D., Ruspa M., y Genazzani A. R. (1985). β -endorphin and met-enkephalin in peritoneal and ovarian follicular fluids of fertile and postmenopausal women. *Fertil. Steril.* **44**, 615-621. doi:10.1016/s0015-0282(16)48976-4
- Pichini S., Zuccaro P., y Pacifici R. (1994). Drugs in Semen. *Clin. Pharmacokinet.* **26**, 356-373. doi:10.2165/00003088-199426050-00004
- Picton H., Briggs D., y Gosden R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **145**, 27-37. doi:10.1016/S0303-7207(98)00166-X
- Pilapil C., Welner S., Magnan J., Gauthier S., y Quirion R. (1987). Autoradiographic distribution of multiple classes of opioid receptor binding sites in human forebrain. *Brain Res. Bull.* **19**, 611-615. doi:10.1016/0361-9230(87)90080-3
- du Plessis S. S., Kashou A. H., Benjamin D. J., Yadav S. P., y Agarwal A. (2011). Proteomics: A subcellular look at spermatozoa. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **9**,. doi:10.1186/1477-7827-9-36.
- Polisseni F., Faletti A. G., Pereira V. M., Reis A. M., Camargos A. F., y Reis F. M. (2005). Prolactin inhibits oocyte release after gonadotropin stimulation in the rat: Putative mechanism involving ovarian production of beta-endorphin and prostaglandin. *Fertil. Steril.* **83**, 1119-1124. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.07.981
- Prates E. G., Nunes J. T., y Pereira R. M. (2014). A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: Impact of lipid modulators to improve embryo production. *Mediators Inflamm.* **2014**, 692067. doi:10.1155/2014/692067

Q

- Quill T. A., y Garbers D. L. (2002). Sperm Motility Activation and Chemoattraction. «Fertilization». pp. 29-55 doi:10.1016/b978-012311629-1/50004-8

R

- Ragni G., De Lauretis L., Bestetti O., Sghedoni D., y Gambaro V. (1988). Gonadal function in male heroin and methadone addicts. *Int. J. Androl.* **11**, 93-100. doi:10.1111/j.1365-2605.1988.tb00984.x

- Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., y Moore P. K. (2004). «Farmacología.» (Elsevier)
- Relton J. M., Gee N. S., Matsas R., Turner A. J., y Kenny A. J. (1983). Purification of endopeptidase-24.11 ('enkephalinase') from pig brain by immunoabsorbent chromatography. *Biochem. J.* **215**, 519-523. doi:10.1042/bj2150519
- Rivière P. J. M. (2004). Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 1331-1334. doi:10.1038/sj.bjp.0705763
- Rodríguez K. F., y Farin C. E. (2004). Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* **16**, 55-67. doi:10.10371/RD03078
- Rosen H., Itin A., Schiff R., y Keshet E. (1990). Local Regulation within the Female Reproductive System and upon Embryonic Implantation: Identification of Cells Expressing Proenkephalin A. *Mol. Endocrinol.* **4**, 146-154. doi:10.1210/mend-4-1-146
- Rosenkrans C. F., y First N. L. (1994). Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J. Anim. Sci.* **72**, 434-437. doi:10.2527/1994.722434x
- Roskoski R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* **66**, 105-143. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005

S

- Sadler T. W. (2004). «Embriología médica.»
- Safarinejad M. R., Asgari S. A., Farshi A., Ghaedi G., Kolahi A. A., Irvani S., y Khoshdel A. R. (2013). The effects of opiate consumption on serum reproductive hormone levels, sperm parameters, seminal plasma antioxidant capacity and sperm DNA integrity. *Reprod. Toxicol.* **36**, 18-23. doi:10.1016/j.reprotox.2012.11.010
- Sakharkar A. J., Singru P. S., Mazumdar M., y Subhedar N. (2006). Reproduction phase-related expression of β -endorphin-like immunoreactivity in the nucleus lateralis tuberculi of the female Indian major carp *Cirrhinus mrigala*: Correlation with the luteinising hormone cells-ovary axis. *J. Neuroendocrinol.* **18**, 319-329. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01421.x
- Sanders S. L., Melner M. H., y Curry T. E. (1990). Cellular Localization of Ovarian Proopiomelanocortin Messenger RNA during Follicular and Luteal Development in the Rat. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1311-1319. doi:10.1210/mend-4-9-1311

- Schindler K. (2011). «Protein kinases and protein phosphatases that regulate meiotic maturation in mouse oocytes.»
- Schlafke S., y Enders A. C. (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.* **12**, 41-65.
- Schmitt A., y Nebreda A. R. (2002). Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J. Cell Sci.* **115**, 2457-2459.
- Schultz R. M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update* **8**, 323-331. doi:10.1093/humupd/8.4.323
- Schulz R., Eisinger D. A., y Wehmeyer A. (2004). Opioid control of MAP kinase cascade. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 487-497. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.010
- Scotchie J. G., Savaris R. F., Martin C. E., y Young S. L. (2015). Endocannabinoid regulation in human endometrium across the menstrual cycle. *Reprod Sci* **22**, 113-123. doi:10.1177/1933719114533730
- Seeber B., Bottcher B., D'Costa E., y Wildt L. (2019). Opioids and reproduction. *Vitam. Horm.* **111**, 247-279. doi:10.1016/bs.vh.2019.07.001
- Sela-Abramovich S., Chorev E., Galiani D., y Dekel N. (2005). Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology* **146**, 1236-1244. doi:10.1210/en.2004-1006
- Semet M., Paci M., Saiás-Magnan J., Metzler-Guillemain C., Boissier R., Lejeune H., y Perrin J. (2017). The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology* **5**, 640-663. doi:10.1111/andr.12366
- Shang Y., y Filizola M. (2015). Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. *Eur. J. Pharmacol.* **763**, 206-213. doi:10.1016/j.ejphar.2015.05.012
- Shapiro B. S., Daneshmand S. T., Garner F. C., Aguirre M., Hudson C., y Thomas S. (2011). Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: A prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil. Steril.* **96**, 344-348. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.05.050
- Shimada M., y Terada T. (2001). Phosphatidylinositol 3-Kinase in Cumulus Cells is Responsible for Activation of oocyte mitogen-activated protein kinase during Meiotic Progression beyond the meiosis I stage in pigs. *Biol. Reprod.* **64**, 1106-1114. doi:10.1095/biolreprod64.4.1106
- Simón C., Horcajadas J. A., García-Velasco J. A., y Pellicer A. (2009). «El Endometrio Humano: Desde la investigación a la clínica.»

- Sirard M. A., Parrish J. J., Ware C. B., Leibfried-Rutledge M. L., y First N. L. (1988). The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* **39**, 546-552. doi:10.1095/biolreprod39.3.546
- Słomczyńska M., Pierzchała-Koziec K., Gregoraszczyk E., Maderspach K., y Wierzchoś E. (1997). The kappa-opioid receptor is present in porcine ovaries: localization in granulosa cells. *Cytobios* **92**, 195-202.
- Smitz J. E. J., Thompson J. G., y Gilchrist R. B. (2011). The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. *Semin. Reprod. Med.* **29**, 24-37. doi:http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1268701
- Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (2012). Saber más sobre Fertilidad y Reproducción Asistida.
- Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (2016). Registro Nacional de Actividad 2016-Registro SEF. Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2016.
- Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (2017). «Registro Nacional de Actividad 2017-Registro SEF. Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2017.»
- Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (2018). «Manejo de la paciente con endometriosis durante la edad fértil.»
- Soltanineghad M., Roshan-Milani S., Saboory E., Kheradmand F., Pourheydar M., Pourheydar B., Motazakker M., y Chodari L. (2019). Opioid-mediated Sertoli cells apoptosis is involved in testicular homeostasis and/or reproductive dysfunction. *Bratisl Med J* **120**, 277-283. doi:10.4149/BLL_2019_041
- Song B.-S., Jeong P.-S., Lee J.-H., Lee M.-H., Yang H.-J., Choi S.-A., Lee H.-Y., Yoon S.-B., Park Y.-H., Jeong K.-J., Kim Y.-H., Bae Jin Y., Kim J.-S., Sim B.-W., Huh J.-W., Lee S.-R., Koo D.-B., Chang K.-T., y Kim S.-U. (2018). The effects of kinase modulation on in vitro maturation according to different cumulus-oocyte complex morphologies. *PLoS One* **13**, e0205495. doi:10.1371/journal.pone.0205495
- Soussis I., Boyd O., Paraschos T., Duffy S., Bower S., Troughton P., Lowe J., y Grounds R. (1995). Follicular fluid levels of midazolam, fentanyl, and alfentanil during transvaginal oocyte retrieval. *Fertil. Steril.* **64**, 1003-1007. doi:10.1016/S0015-0282(16)57919-9
- Sowińska N., Müller K., Niżański W., y Jewgenow K. (2017). Mitochondrial characteristics in oocytes of the domestic cat (*Felis catus*) after in vitro maturation and vitrification. *Reprod. Domest. Anim.* **52**, 806-813. doi:10.1111/rda.12982
- Speroff L., y Fritz M. (2006). «Endocrinología ginecológica clínica y esterilidad.»

- Staszkiwicz J., Skowronski M. T., Kaminski T., Siawrys G., Krazinski B. E., Kusmider M., Przala J., y Okrasa S. (2007). Expression of proopiomelanocortin, proenkephalin and prodynorphin genes in porcine theca and granulosa cells. *Anim. Reprod. Sci.* **101**, 97-112. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.09.003
- Stein C. (2016). Opioid Receptors. *Annu. Rev. Med.* **67**, 433-451. doi:10.1146/annurev-med-062613-093100
- Su Y. Q., Sugiura K., Woo Y., Wigglesworth K., Kamdar S., Affourtit J., y Eppig J. J. (2007). Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* **302**, 104-117. doi:10.1016/j.ydbio.2006.09.008
- Subirán N., Agirregoitia E., Valdivia A., Ochoa C., Casis L., y Irazusta J. (2008). Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil. Steril.* **89**, 1571-1577. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.056
- Subirán N., Candenás L., Pinto F. M., Cejudo-Roman A., Agirregoitia E., y Irazusta J. (2012). Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid peptide. *Fertil. Steril.* **98**, 617-625.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.05.036
- Subirán N., Casis L., y Irazusta J. (2011). Regulation of male fertility by the opioid system. *Mol. Med.* **17**, 846-853. doi:10.2119/molmed.2010.00268
- Subirán N., Pinto F. M., Agirregoitia E., Candenás L., y Irazusta J. (2010). Control of APN/CD13 and NEP/CD10 on sperm motility. *Asian J. Androl.* **12**, 899-902. doi:10.1038/aja.2010.82
- Sun Q. Y., Breitbart H., y Schatten H. (1999). Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod. Fertil. Dev.* **11**, 443-450. doi:10.1071/rd00014
- Sun Q., y Nagai T. (2003). Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.* **49**, 347-359. doi:10.1262/jrd.49.347

T

- Takzare N., Samizadeh E., Shoar S., Majidi Zolbin M., Naderan M., Lashkari A., y Bakhtiarian A. (2016). Impacts of morphine addiction on spermatogenesis in rats. *Int. J. Reprod. Biomed. (Yazd, Iran)* **14**, 303-8.
- Tam P. P., Ng T. B., y Mao K. R. (1988). Beta-endorphin levels in the preovulatory follicles and the outcome of in vitro fertilization. *J. Vitro. Fertil Embryo Transf.* **5**, 91-95. doi:10.1007/bf01130665

- Tang X., Chen Y., Ran H., Jiang Y., He B., Wang B., Kong S., y Wang H. (2015). Systemic morphine treatment derails normal uterine receptivity, leading to embryo implantation failure in mice. *Biol Reprod* **92**, 118,1-9. doi:10.1095/biolreprod.115.128686
- Themmen A. P. N., y Huhtaniemi I. T. (2000). Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: Elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr. Rev.* **21**, 551-583. doi:10.1210/edrv.21.5.0409
- Thompson J. G. (1996). Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* **45**, 27-40. doi:https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00352-9
- Tian B. M., Broxmeyer H. E., Fan Y., Lai Z., Zhang S., Aronica S., Cooper S., Bigsby R. M., Steinmetz R., Engle S. J., Mestek A., Pollock J. D., Lehman M. N., Jansen H. T., Ying M., Stambrook P. J., Tischfield J. a, y Yu L. (1997). Altered Hematopoiesis, Behavior, and Sexual Function in mu-Opioid Receptor-deficient Mice. *J. Exp. Med* **185**, 1517-1522. doi:10.1084/jem.185.8.1517
- Tomek W., y Smiljakovic T. (2005). Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction* **130**, 423-430. doi:10.1530/rep.1.00754
- Tong C., Heng Y. F., Da Y. C., Xiang F. S., Schatten H., y Sun Q. Y. (2003). Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes: Microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Res.* **13**, 375-383. doi:10.1038/sj.cr.7290183
- Tosti E., y Ménézo Y. (2016). Gamete activation: Basic knowledge and clinical applications. *Hum. Reprod. Update* **22**, 420-439. doi:10.1093/humupd/dmw014
- Totorikaguena L., Olabarrieta E., López-Cardona A. P., Agirregoitia N., y Agirregoitia E. (2019). Tetrahydrocannabinol modulates in vitro maturation of oocytes and improves the blastocyst rates after in vitro fertilization. *Cell. Physiol. Biochem.* **53**, 439-452. doi:10.33594/000000149
- Trounson A., Anderiesz C., y Jones G. (2001). Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* **121**, 51-75. doi:10.1530/rep.0.1210051

U

- Urbina M. T., y Lerner Biber J. (2008). «Fertilidad y reproducción asistida.»
- Urizar-Arenaza I., Estomba H., Muñoa-Hoyos I., Matorras R., Esposito A., Cadenas L., Pinto F. M., Valdivia A., Irazusta J., y Subirán N. (2016). The opioid peptide beta-endorphin stimulates acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrology* **4**, 143-151. doi:10.1111/andr.12133

Urizar-Arenaza I., Osinalde N., Akimov V., Puglia M., Candenaz L., Pinto F. M., Muñoa-Hoyos I., Gianzo M., Matorras R., Irazusta J., Blagoev B., Subiran N., y Kratchmarova I. (2019). Phosphoproteomic and functional analyses reveal sperm-specific protein changes downstream of kappa opioid receptor in human spermatozoa. *Mol Cell Proteomics* **15**, S118-S131. doi:10.1074/mcp.RA118.001133

V

Valentino R. J., y Volkow N. D. (2018). Untangling the complexity of opioid receptor function. *Neuropsychopharmacology* **43**, 2514-2520. doi:10.1038/s41386-018-0225-3

Veitch G. I., Gittens J. E. I., Shao Q., Laird D. W., y Kidder G. M. (2004). Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface. *J. Cell Sci.* **117**, 2699-2707. doi:10.1242/jcs.01124

Vicente-Carrillo A., Álvarez-Rodríguez M., y Rodríguez-Martínez H. (2016). The mu (μ) and delta (δ) opioid receptors modulate boar sperm motility. *Mol. Reprod. Dev.* **83**, 724-734. doi:10.1002/mrd.22675

Vinketova K., Mourdjeva M., y Oreshkova T. (2016). Human decidual stromal cells as a component of the implantation niche and a modulator of maternal immunity. *J. Pregnancy* **2016**, 8689436. doi:10.1155/2016/8689436

W

Wahlstrom T., Laatikainen T., Salminen K., y Leppaluoto J. (1985). Immunoreactive Beta-Endorphin is demonstrable in the secretory but not in the proliferative endometrium. *Life Sci.* **36**, 987-90.

Wai-sum O. (1990). The effect of beta-endorphin on rat oocyte maturation in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* **68**, 181-185. doi:10.1016/0303-7207(90)90191-a

Wakai T., Zhang N., Vangheluwe P., y Fissore R. A. (2013). Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ oscillations in mammalian eggs. *J. Cell Sci.* **126**, 5714-5724. doi:10.1242/jcs.136549

Waksman G., Bouboutou R., Devin J., Bourgoin S., Cesselin F., Hamon M., Fournie-Zaluski M., y Roques B. (1985). In vitro and in vivo effects of ketatorphan on enkephalin metabolism in rodent brain. *Eur J Pharmacol* **117**, 233-243.

Waldhoer M., Bartlett S. E., y Whistler J. L. (2004). Opioid Receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 953-990. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940

Wick M. J., Minnerath S. R., Lin X., Elde R., Law P. Y., y Loh H. H. (1994). Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned μ , δ , and κ opioid receptors. *Mol. Brain Res.* **27**, 37-44. doi:10.1016/0169-328X(94)90181-3

Williams J. T., Ingram S. L., Henderson G., Chavkin C., Zastrow M. von, Schulz S., Koch T., Evans C. J., y Christie M. J. (2013). Regulation of mu-Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance. *Pharmacol. Rev.* **65**, 223-254. doi:10.1124/pr.112.005942

Wu W., Kong S., Wang B., Chen Y., y Wang H. (2016). Spatiotemporal expression of endogenous opioid processing enzymes in mouse uterus at peri-implantation. *Cell Tissue Res.* **363**, 555-565. doi:10.1007/s00441-015-2259-8

X

Xu B., Wang Z.-P., Wang Y.-J., Lu P.-H., Wang L.-J., y Wang X.-H. (2013). The toxic effect of opioid analgesics on human sperm motility in vitro. *Drug Chem. Toxicol.* **36**, 205-8. doi:10.3109/01480545.2012.710621

Y

Yamamizu K., Hamada Y., y Narita M. (2015). κ Opioid receptor ligands regulate angiogenesis in development and in tumours. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 268-276. doi:10.1111/bph.12573

Yilmaz B., y Gilmore D. P. (1999). Opioid modulation of hypothalamic catecholaminergic neurotransmission and the pre-ovulatory LH surge in the rat. *Neuroendocrinol. Lett.* **20**, 115-121.

Z

Zhang W., y Liu H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **12**, 9-18. doi:10.1038/sj.cr.7290105

Zhang Y. L., Liu X. M., Ji S. Y., Sha Q. Q., Zhang J., y Fan H. Y. (2015). ERK1/2 activities are dispensable for oocyte growth but are required for meiotic maturation and pronuclear formation in mouse. *J. Genet. Genomics* **42**, 477-485. doi:10.1016/j.jgg.2015.07.004

Zhu Y., y Pintar J. E. (1998). Expression of opioid receptors and ligands in pregnant mouse uterus and placenta. *Biol Reprod* **59**, 925-932. doi:10.1095/biolreprod59.4.925

Zoumakis E., Margioris A. N., Makrigiannakis A., Stournaras C., y Gravanis A. (1997). Human endometrium as a neuroendocrine tissue : Expression , regulation and biological roles of endometrial corticotropin- releasing hormone (CRH) and opioid peptides. *J. Endocrinol. Invest.* **20**, 158-167. doi:10.1007/BF03346896

8 ANEXO: Artículos derivados de la Tesis Doctoral

RESEARCH ARTICLE

Implication of mu opioid receptor in the in vitro maturation of oocytes and its effects on subsequent fertilization and embryo development in mice

Estibaliz Olabarrieta  | Lide Totorikaguena  | Naiara Agirregoitia  | Ekaitz Agirregoitia 

Department of Physiology, Faculty of Medicine and Nursing, UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain

Correspondence

Ekaitz Agirregoitia, Dept. of Physiology, Faculty of Medicine and Nursing, UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain.
Email: e.agirregoitia@ehu.eus

Funding information

Euskal Herriko Unibertsitatea, Grant/Award Numbers: PGA18/01, PIF15/149

Abstract

Oocyte maturation is the process by which immature oocytes acquire all the necessary characteristics for successful fertilization. The endogenous opioid peptides have been suggested to have a role modulating this process. However, little is known about its implication and the effect of exposing oocyte maturation to opioids on the subsequent fertilization and embryo development. Hence, in the present work, we focused on elucidating the function of the mu opioid receptor (OPRM1) in the modulation of the oocyte maturation. We analyzed the expression and localization of OPRM1 in mice oocytes and granulosa cells by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry. To observe the activity of the OPRM1, immature oocytes were incubated with morphine agonist and/or naloxone antagonist and we evaluated the PI3K/Akt and MAPK pathways, as well as the effect on the subsequent fertilization and embryo development. OPRM1 was present in mice oocytes and granulosa cells, changing its expression pattern depending on the maturation stage. Moreover, morphine, modulating PI3K/Akt and MAPK pathways, helped oocytes to reach blastocyst stage, which was reverted by naloxone. These results propose the OPRM1 as a possible therapeutic target for in vitro maturation culture medium, as it could improve the blastocyst rates obtained in the actual reproduction assisted techniques.

KEYWORDS

embryo, in vitro fertilization, in vitro maturation, oocyte, opioids

1 | INTRODUCTION

Oocyte in vitro maturation (IVM) is the process by which immature oocytes acquire, in vitro, all the characteristics required for successful fertilization (Lonergan & Fair, 2016). This technique has been proposed as an alternative to the current methods used in assisted reproduction clinics, since a high dose of hormones would not be necessary for the patient, thus avoiding several side effects (Mehta, 2014). However, it only represents the 0.04% of the assisted reproduction techniques (Sociedad Española de Fertilidad (SEF), 2016) due to its poor efficiency (Data collected from Spanish clinics).

The molecular mechanisms responsible for oocyte maturation are not completely understood and different molecules have been reported to be implicated as modulators of this process (Conti, Hsieh, Zamah, & Oh, 2012). Among these molecules, the endogenous opioid peptides could be interesting candidates because they are involved in the regulation of reproductive physiology at multiple sites (Fabbri et al., 1989). Endogenous opioid peptides (EOPs) exert their effects by binding to the G-protein-coupled receptors: δ -opioid receptor (OPRD1), κ -opioid receptor (OPRK1), and μ -opioid receptor (OPRM1; Waldhoer, Bartlett, & Whistler, 2004). When those receptors are activated, among other effects, the adenylyl

cyclase is inhibited, thus reducing cyclic AMP and blocking PKA (Madishetti et al., 2014; Mehlmann, 2005). Moreover, opioids are also able to activate both PI3K/Akt and MAPK signaling pathways (Bodnar, 2013).

It is well studied the inhibitory role of the opioid peptides in the secretion of GnRH at the hypothalamic level and the inhibition of the release of LH (Mehmanesh, Almeida, Nikolarakis, & Herz, 1988; Yilmaz & Gilmore, 1999). However, the role of opioid system has also been described in the reproductive axis and appears to have a direct local action in gonads (Makrigrannakis, Margioris, Stournams, & Gravani, 1995). Opioid peptides such as β -endorphin, met-enkephalin, and α -neoendorphin have been found in human and porcine follicular fluid (Petraglia et al., 1985; Słomczyńska, Pierzchała-Koziec, Gregoraszczyk, Maderspach, & Wierzchoś, 1997) and an increased concentration of β -endorphin was related with follicle maturation (Facchinetti, Storchi, Petraglia, Volpe, & Genazzani, 1988; Petraglia et al., 1985).

Opioid receptors have been described in oocytes and granulosa cells from various species at the different maturation stages (Agirregoitia et al., 2012; Dang-Nguyen et al., 2013; Dell'Aquila et al., 2008; Iorga et al., 2009; Lunger et al., 2016). In mammals, oocytes are arrested at germinal vesicle stage (GV) and during meiotic resumption they evolve to mature oocytes at metaphase II (MII). Several studies have been carried on to determine the function of opioid peptides during this event. The opioid antagonist naloxone appeared to modify the canine and porcine oocyte in vitro maturation, obtaining higher maturation rates when oocytes were matured in culture medium supplemented with low concentrations of naloxone (Dang-Nguyen et al., 2013; Iorga et al., 2009). Besides, the addition of β -endorphin to the IVM culture resulted in an inhibition of the maturation rates in rats, bovine and equine oocytes (Dell'Aquila et al., 2008, 2002; Wai-sum, 1990). However, little is known about the effect of maturing oocytes with opioids on the fertilization and subsequent preimplantation embryo development. The oocyte preincubation with naloxone in bovine did not result in an improvement of the fertilization rate or blastocyst yield, but the inner cell mass from blastocysts increased (Dang-Nguyen et al., 2013). On the contrary, more recently, it has been seen that in patients with higher levels of β -endorphin, more matured oocytes were collected in assisted reproductive cycles (Jaschke, Lunger, Wildt, & Seeber, 2018), which would contradict the previous results obtained in other species.

As we have been able to verify, there are evidence suggesting a role for opioids during oocyte maturation, in fact, it is interesting to note that the signaling exerted by opioids is similar to that necessary for the meiosis resumption (Freudzon et al., 2005; Mehlmann et al., 2004). Even so, it is still unclear what could be the role of opioids in the maturation of oocytes. So that, in this study, we focused on elucidating the function of the mu opioid receptor to clarify the role of the opioid system in the modulation of the oocyte maturation. On one hand, we studied the expression and location-pattern of mu opioid receptor during oocyte maturation. On the other hand, we observed the mu receptor activity through agonism/antagonism

(morphine/naloxone) experiments to determine if that receptor could modify some processes involved in oocyte maturation (as PI3K/Akt and MAPK pathways), as well as, the subsequent in vitro fertilization and in vitro embryo development in mice.

2 | RESULTS

2.1 | Oprm1 mRNA expression in mouse oocytes and granulosa cells

We evaluated by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) the presence of the transcript for *Oprm1* gene in the different stages of the mouse oocyte's maturation, as well as in the granulosa cells at the moment of the extraction from the ovary. The obtained transcript was compared with the transcript for *Oprm1* of mouse cerebral cortex as a positive control. The expected 148 bp fragment was detected in the germinal vesicle stage and in granulosa cells, whereas in MI and MII stage the signal was missing (Figure 1). To verify that the complementary DNA (cDNA) generation was correct, the housekeeping gene *Actb* was detected in all cases at the expected 398 bp (Figure 1). The primers used were located on different exons to avoid the amplification of genomic DNA and the retrotranscriptase negative controls were performed to assure the absence of that genomic DNA (data not shown).

2.2 | Immunolocalization of OPRM1 in mouse oocytes and granulosa cells

Immunofluorescence analysis revealed that OPRM1 protein was present in mouse oocytes (Figure 2); but, its localization differed at the different stages of the maturation process. At the germinal

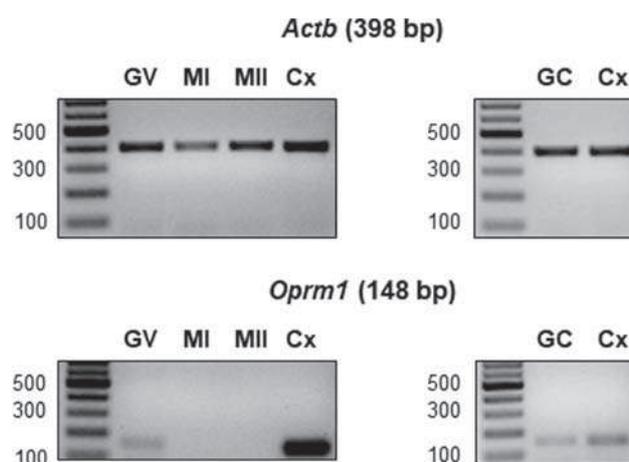


FIGURE 1 Reverse-transcription PCR products for *Oprm1* and β -actin (*Actb*) in each maturation stage of mouse oocytes (GV, germinal vesicle, MI, metaphase I, and MII, metaphase II), granulosa cells (GC), and cerebral cortex (Cx), used as positive control. Base pairs are indicated on the left side. Representative RT-PCR experiment is shown ($n = 3$)

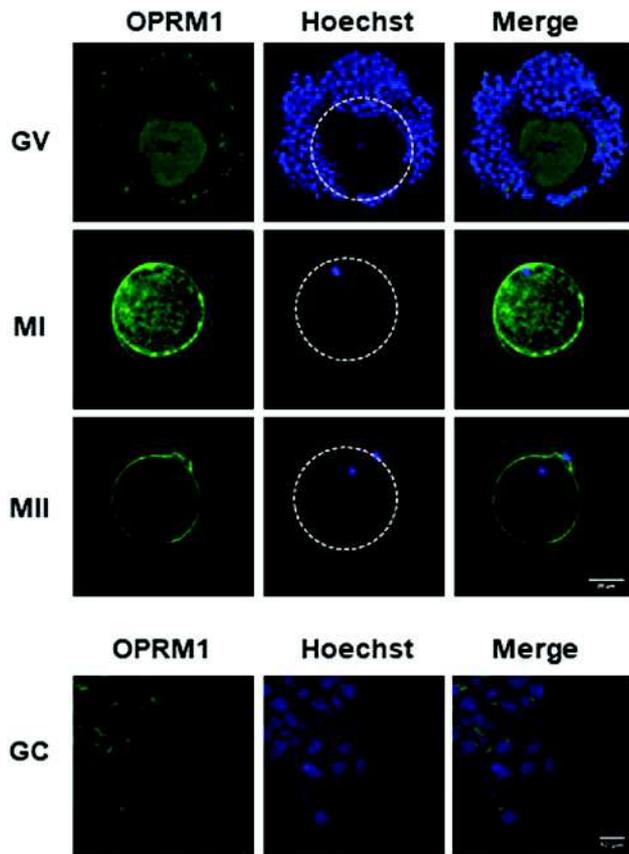


FIGURE 2 Immunolocalization of mu opioid receptor (OPRM1) in mouse oocytes in each maturation stage (GV, germinal vesicle, MI, metaphase I, and MII, metaphase II) and granulosa cells (GC). Representative microphotography showing the distribution of OPRM1, in green, and hoechst-labeled DNA, in blue ($n = 3$). Scale bar represents 25 μm in oocytes images and 10 μm in granulosa cells image [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

vesicle stage (GV) the OPRM1 protein was detected homogeneous over the oocyte. Then, it was more externalized at MI stage, while finally it was identified in a peripheral location at the mature oocyte (MII). The OPRM1 protein was also found in a granulosa pool (GC) extracted directly from the ovary. When primary anti-OPRM1 antibody was omitted before secondary antibody addition, the fluorescent staining pattern was not evident (data not shown).

2.3 | Modulation of AKT and ERK1/2 signaling by opioid agonist morphine during mouse oocyte maturation

To further understand the physiologic relevance of opioid signaling during oocyte maturation process, we analyzed the modulation of AKT and ERK1/2 proteins by the selective mu opioid agonist morphine. Immature oocytes were collected from ovaries of super-ovulated female mice and we incubated them for 17 hr with increased concentration of morphine (0 nM, 1 nM, 10 nM, and 100 nM).

To see the modulation of AKT, we analyzed oocytes at different times (0 hr, 30 min, 1 hr, 8 hr, and 17 hr). As it is observed in Figure 3, in the presence of morphine 1 and 10 nM, the signaling for phosphorylated AKT increased in the oocyte by the time of 30 min, while in the case of control, it did not until 8 hr. Furthermore, in the presence of morphine 10 nM, this effect did not only affect the oocyte but also the granulosa cells, being phosphorylated at 1 hr. The incubation with morphine 100 nM did not present a variation in the phosphorylation pattern of AKT.

We also observed the effect of morphine on the modulation of ERK1/2 and, so that, we analyzed oocytes at different times (0 hr, 10 min, 30 min, 1 hr, and 17 hr; Figure 4). We detected a variation in the phosphorylation pattern of ERK1/2 in the presence of morphine 1 and 10 nM. At the time of 30 min, in the control condition, the granulosa cells decreased the intensity of phosphorylated ERK1/2, whereas in the presence of the mentioned concentrations of morphine, this intensity maintained until 1 hr. In the presence of morphine 100 nM this effect was not observed.

2.4 | Effect of opioid agonist morphine during oocyte maturation on in vitro fertilization and subsequent embryo development

After observing the modulation of AKT and ERK1/2 by morphine during oocyte maturation, we examined whether this effect observed in oocyte maturation could modify the in vitro fertilization (IVF) and the subsequent embryo development. We fertilized in vitro oocytes that had been incubated in the presence of increasing concentrations of morphine (0, 1, 10, and 100 nM) during the maturation process. Although there were not statistically significant differences at previous stages (metaphase II, zygote, and two-cell-embryo), we observed an increase in the number of generated blastocysts when the oocytes had been matured in the presence of all the concentrations of morphine ($p < .05$; Figure 5).

2.5 | Effect of opioid antagonist naloxone during oocyte maturation on in vitro fertilization and subsequent embryo development

Finally, it was examined if the observed effect of morphine during oocyte maturation in the in vitro fertilization and subsequent embryo development could be blocked by the opioid antagonist naloxone. For this procedure we chose to antagonize the morphine concentration of 10 nM, as it was the concentration where it could be appreciated more changes in all the experiments previously mentioned. The procedure was the same as in experiments with agonists but, in this case, oocytes were also incubated with naloxone (10 μM) and both naloxone (10 μM) and morphine (10 nM). The effect of morphine 10 nM on the number of produced blastocysts was blocked by naloxone ($p < .05$) while the antagonist alone did not produce any change (Figure 6).

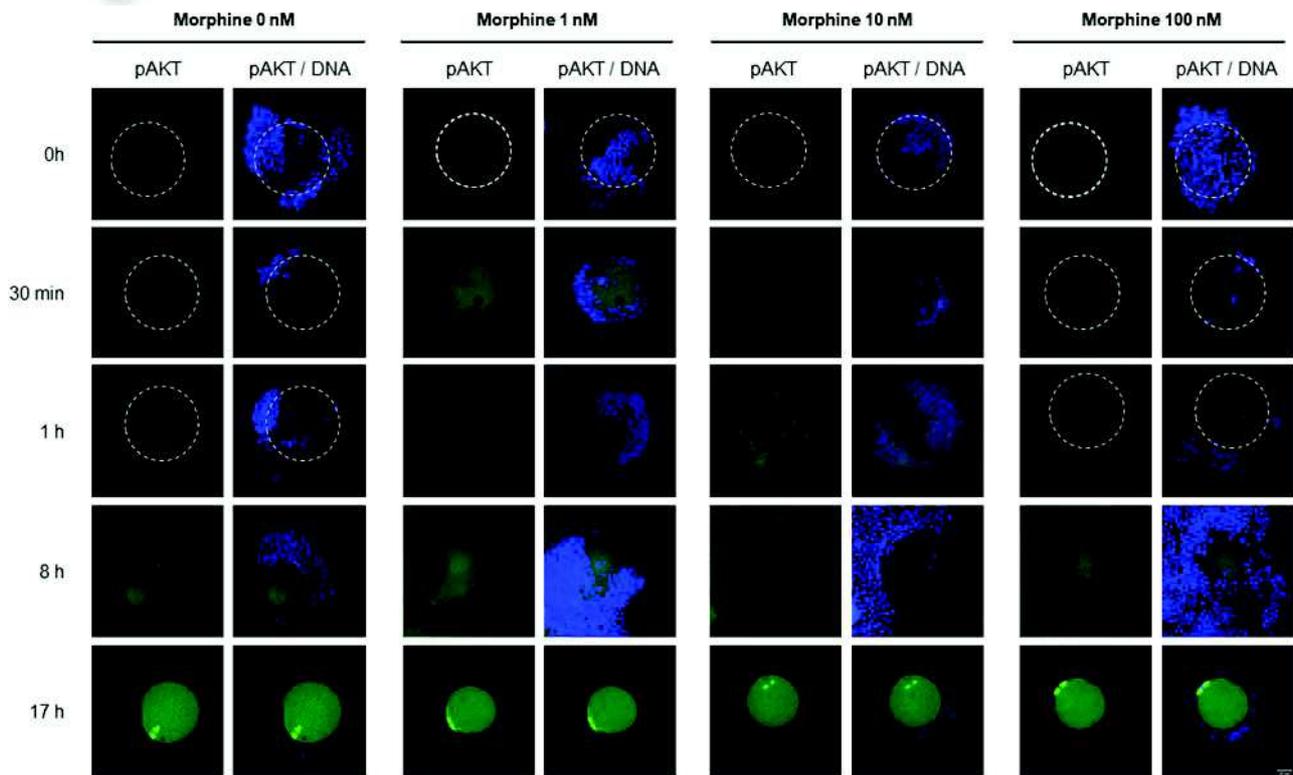


FIGURE 3 Activation of AKT signaling by morphine during mouse oocyte maturation. Immature oocytes were cultured in vitro during 17 hr in the presence of morphine (1, 10, and 100 nM) and phosphorylated AKT was observed at 0 hr, 30 min, 1, 8, and 17 hr. Representative microphotography showing the distribution of pAKT, in green, and hoechst-labeled DNA, in blue ($n = 3$). Scale bar represents 50 μm [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

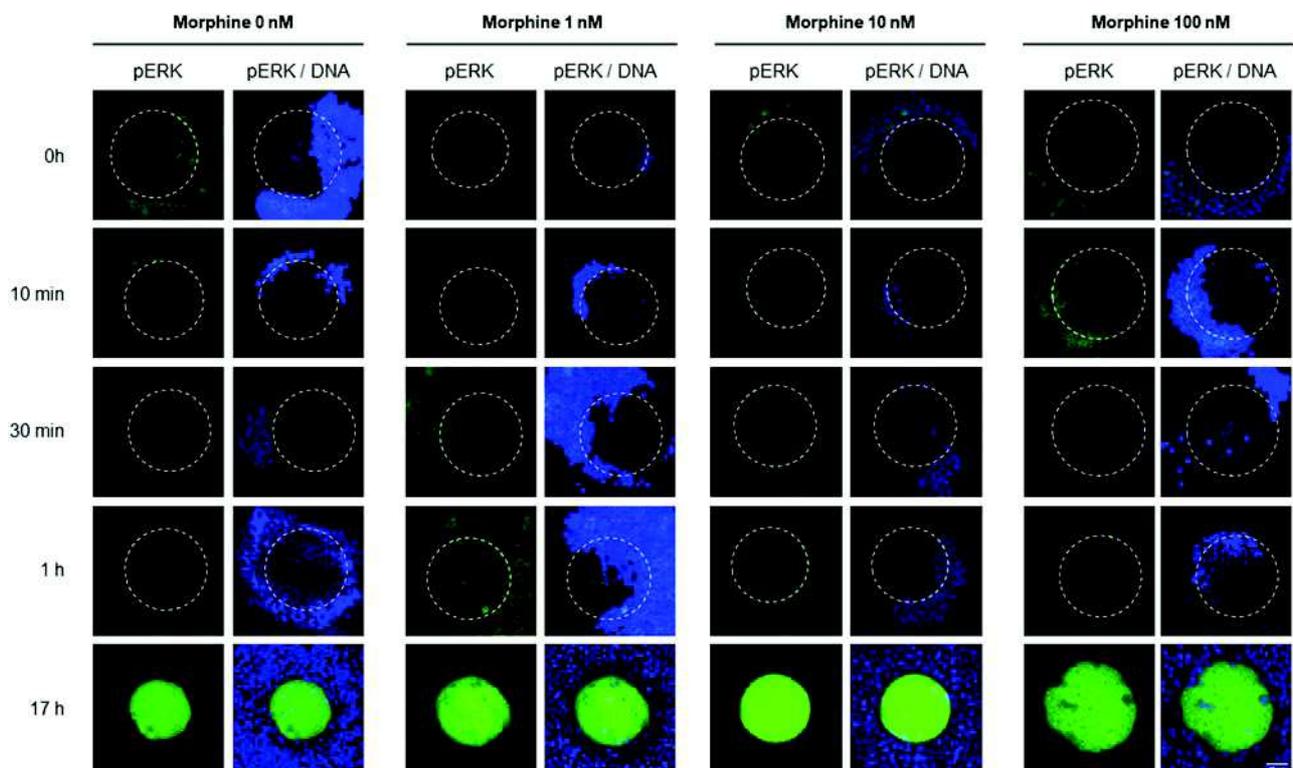


FIGURE 4 Activation of ERK1/2 by morphine during mouse oocyte maturation. Immature oocytes were cultured in vitro during 17 hr in presence of morphine (1, 10, and 100 nM) and phosphorylated ERK1/2 was observed at 0 hr, 10 min, 30 min, 1, and 17 hr. Representative microphotography showing the distribution of pERK1/2, in green, and hoechst-labeled DNA, in blue. $n = 3$. Scale bar represents 50 μm [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

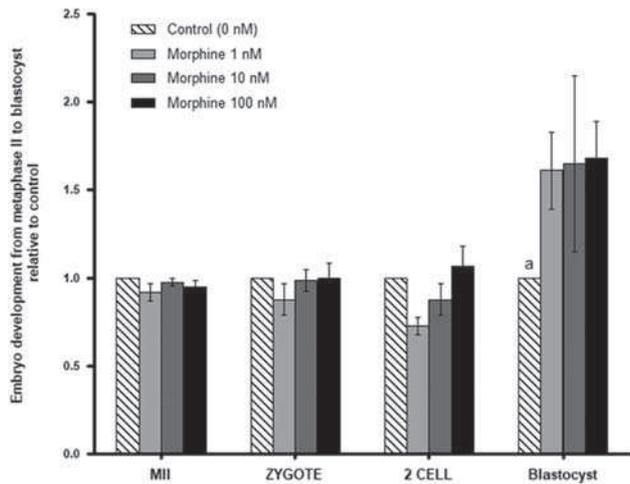


FIGURE 5 MII oocytes recovered from mice, fertilized oocytes (zygote), two-cell-stage embryos, and blastocysts after in vitro fertilization using oocytes that had been incubated with increased concentration of morphine (1 nM, 10 nM, and 100 nM). Relative results to control group (0 nM) are shown and results are the means \pm SEM of five independent experiments. The different combinations of letters indicate significant differences between groups; $p < .05$ in all cases

3 | DISCUSSION

In the present study, mu opioid receptor expression analysis was performed in mice oocytes and granulosa cells and, for the first time, it was evaluated the effect of mu opioid agonist and/or antagonist during oocyte maturation in the PI3K/Akt and MAPK pathways and subsequent fertilization and embryo culture.

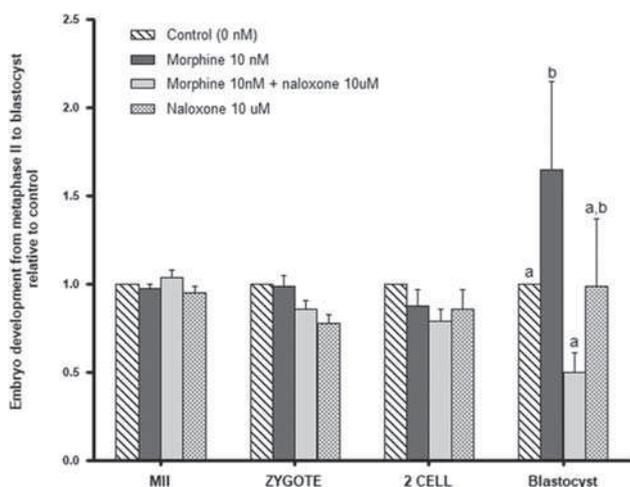


FIGURE 6 MII oocytes recovered from mice, fertilized oocytes (zygote), two-cell-stage embryos and blastocysts after in vitro fertilization using oocytes that had been incubated with morphine (100 nM), naloxone (10 μ M), and both together. Relative results to control group (0 nM) are shown and results are the means \pm SEM of five independent experiments. The different combinations of letters indicate significant differences between groups; $p < .05$ in all cases

During the evaluation of *Oprm1* gene and protein in mice oocytes, it was observed a different expression pattern depending on the maturation stage. The *Oprm1* transcript was present at GV stage and granulosa cells, whereas at MI and MII stages no signal was detected. This fact has been described previously for other transcripts (Agirregoitia et al., 2012; López-Cardona et al., 2017, 2016) since mRNA is selective degraded during oocyte maturation and transcription becomes silent from the resumption of meiosis until two-cell stage in mice (Gosden & Lee, 2010; Picton, Briggs, & Gosden, 1998). Mu opioid receptor transcript has also been detected in oocytes and granulosa cells from other species, such as bovine, equine, human, or porcine (Agirregoitia et al., 2012; Dang-Nguyen et al., 2013; Dell'Aquila et al., 2008, 2002; Lunger et al., 2016). OPRM1 protein was detected in all maturation stages, changing its localization during maturation; from a homogenous location at GV stage to a peripheral location on mature oocyte. Although we did not detect mRNA at MI and MII, it is known that the timing and pattern of RNA synthesis in the oocyte may not necessarily coincide with translation into an active protein (Gosden & Lee, 2010; Picton et al., 1998). According to its localization, given that G-coupled receptors need to reach the cell surface so as to act (Cahill, Holdridge, & Morinville, 2007), OPRM1 could become active from MI to MII stages, which suggests that opioid system, via mu opioid receptor, is a conserved mechanism during oocyte maturation. The protein expression pattern of OPRM1 during maturation has also been studied in human where the peripheral location was detected at GV and MI stages (Agirregoitia et al., 2012). In equines, nonetheless, the protein distribution was homogenous over the oocyte at all stages of maturation (Dell'Aquila et al., 2008). Taking into account these data, the protein expression pattern could vary depending on the specie. Even so, we must bear in mind that obtaining oocytes from experimental animals is much more controlled than obtaining human oocytes from the clinic, so it does not seem that the maturation stages from each species can be fully comparable.

For the purpose of elucidating if mu opioid receptor was indeed active during oocyte maturation, agonism experiments were performed to verify, among others, whether some components of important maturation pathways, such as AKT and ERK (Schmitt & Nebreda, 2002), varied their phosphorylation-pattern. It has been seen that AKT activation is crucial for successful MI/MII transition, polar body emission, and spindle organization (Cecconi, Mauro, Cellini, & Patacchiola, 2012; Kalous, Kubelka, Šolc, Šušor, & Motlík, 2009; Tomek & Smiljakovic, 2005). In our results, the oocyte AKT phosphorylation increased after 8 hr of in vitro maturation, coinciding with other studies (Chouzouris et al., 2017; Kumar et al., 2018). When the oocytes were incubated along with morphine 1 and 10 nM, an earlier AKT activation was detected in oocytes (at 30 min) and granulosa cells (at 1 hr). Although there is no previous evidence of opioid action on AKT phosphorylation in oocytes, morphine is able to stimulate its phosphorylation in neuronal cells (Madishetti et al., 2014). Likewise, it has been described that the exposure to

cannabinoids, very related to opioids due to their similar action mechanism, was able to accelerate the AKT activation both in granulosa cells and oocytes during maturation in bovine and mice (López-Cardona et al., 2017, 2016).

MAP kinase, also called extracellular-regulated kinase (ERK1/2), presents also an important role in oocyte maturation. ERK1/2 is necessary for meiotic resumption and it is involved, among others, in the regulation of microtubule organization, meiotic spindle assembly, and pronuclear formation after fertilization (Fan & Sun, 2004; Fissore, He, & Vande Woude, 1996). Our data showed a variation in the phosphorylation pattern of ERK1/2 when oocytes were matured with morphine 1 and 10 nM. The ERK1/2 phosphorylation in granulosa cells maintained until 1 hr of incubation whereas, in the control group, the dephosphorylation began at 10 min. In preovulatory follicles, ERK1/2 is activated for a relatively short period of time (from 0.5 to 2 hr) in granulosa cells exposed to LH/hCG (Fan et al., 2008; Maizels, Cottom, Jones, & Hunzicker-Dunn, 1998; Panigone, Hsieh, Fu, Persani, & Conti, 2008), and this brief window of activation is necessary and sufficient to reprogram preovulatory GCs to cease dividing and terminally differentiate (Fan et al., 2009). In fact, the inappropriate activation of ERK1/2 in granulosa cells of small growing follicles might disrupt normal follicular development (Fan et al., 2009). Thus, the maintenance of the ERK1/2 phosphorylation in the granulosa cells for a longer period of time, could be beneficial for oocytes maturation and explain the increase in the proportion of blastocysts achieved after the activation of the OPRM1. Opioid-induced activation of ERK1/2 has been widely studied (Fukuda, Kato, Morikawa, Shoda, & Mori, 1996; Schulz, Eisinger, & Wehmeyer, 2004), but there is only one previous study in bovine oocytes, where it was also seen that opioids could modulate this pathway, specifically, at high concentration of naloxone (1 mM) COCs presented a higher activity of ERK (Dell'Aquila et al., 2002).

Finally, it was interesting to observe if the activation of the mu opioid receptor during the oocyte maturation had any action in relation to the subsequent fertilization and embryo development. So that, oocytes were incubated with agonist and/or antagonist (morphine and naloxone) during its *in vitro* maturation. There were not differences on the maturation rates in any of the treatments done. Previous studies in other species showed how naloxone could reduce maturation rates at high concentrations and, in contrast, increase them at low concentrations, suggesting a dose-dependent effect (Dang-Nguyen et al., 2013; Dell'Aquila et al., 2008, 2002). However, in the only research continuing with the fertilization of those oocytes, naloxone did not affect the subsequent fertilization and the embryo culture, although it did increase the ICM ratio from blastocyst (Dang-Nguyen et al., 2013). Thus, we performed the IVF and the embryo culture with the experimental oocytes and it was observed a significant increase in the blastocyst yield reached on Day 4 after IVF when morphine (1 nM, 10 nM and 100 nM) was added to the maturation media. In addition, this effect was blocked by naloxone (10 μ M).

In conclusion, OPRM1 is present in mice oocytes and granulosa cells, changing the expression pattern depending on the maturation

stage. Moreover, for the first time, it is showed that the OPRM1 agonist morphine, modulating PI3K/Akt and MAPK pathways involved in oocyte maturation, helped oocytes to reach blastocyst stage, which was blocked by the OPRM1 antagonist naloxone. These results propose the mu opioid receptor as a possible therapeutic target for IVM culture medium, since it could improve the blastocyst rates obtained in the actual reproduction assisted techniques. Nevertheless, more studies should be done to broaden the knowledge of its mechanism and check the quality of those produced blastocysts.

4 | MATERIALS AND METHODS

4.1 | Experimental animals and drugs

Adult mice used in this study (C57BL/6J x DBA/2J) were kept in an animal house under controlled conditions of temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and photoperiod (light/dark cycle 14 hr:10 hr). Animals were given free access to water and food. Approval for this study was obtained from the Animal Research Ethical Committee of the University of the Basque Country (UPV/EHU CEEA reference number: M20-2015-016-027-028-173) and all the experiments were performed according to the Guide for Care and use of Laboratory Animals, endorsed by the Society for the Study of Reproduction and European legislation.

All the morphine (Alcaliber, S.A. Spain) and naloxone (SIGMA, UK) stock solutions used in this experimentation were prepared in phosphate-buffered saline-polyvinyl alcohol (PBS-PVA) 0.1%.

4.2 | Isolation and *in vitro* maturation of cumulus-oocyte complexes (COCs)

Immature oocytes, in germinal vesicle (GV), were collected from 8 to 10-week-old ovaries of female mice superovulated by intraperitoneal injections of 7.5 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; Folligon, Intervet, Castle Hill, Australia) 48 hr earlier. Ovaries were placed in M2 medium and COCs were collected with the aid of a needle. Only COCs with three compact cumulus were used. COCs were matured for 17 hr in TCM-199 supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS, SIGMA, Spain) and 10 ng/ml epidermal growth factor (SIGMA) at 37°C under an atmosphere of 5% CO_2 in air with maximum humidity. For some experiments that are described later, during this maturation, COCs were incubated with increased concentration of the OPRM1 selective agonist morphine (1 nM, 10 nM, or 100 nM) and/or antagonist naloxone (10 μ M). COCs containing the same amount of PBS-PVA 0.1% were used as an incubation control.

4.3 | Reverse-transcription and PCR analysis

RNA from 20 oocytes of each maturation stage (GV, metaphase I -MI-, and metaphase II -MII-) and granulosa cells ($n = 3$) was isolated using the Dynabeads mRNA Direct Micro Kit (Ambion, Life Technologies AS, Oslo, Norway) according to the manufacturer's

instructions. Immediately after extraction, the procedure for obtaining the cDNA was performed using the GoScript Reverse-Transcription system (Promega, Madison, WI). Positive control was performed using RNA from mice cerebral cortex.

Primers used for PCR were as follows: Oprm1, 5'-ATCCTCTCTTCTGCCATTGGT-3' and 5'-TGAAGGCGAAGATGAAGACA-3' (148-bp product; (Fu et al., 2014)) and mouse β -actin (ACTB), 5'-GCTTCTTTCGAGCTCCTTCG-3' and 5'-ACGGTTGGCCTTAGGGTTCA-3' (390-bp product) used as endogenous control. PCRs were performed using the following parameters: 95°C for 2 min, 40 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 5 min. The mixture was electrophoretically separated on a 2% agarose gel.

4.4 | Immunofluorescence

Twenty oocytes of each maturation stage (GV, MI, and MII) and granulosa cells were suspended in PBS-PVA 0.1% ($n = 3$). Samples were washed in PBS-PVA 0.1% and fixed in 4% paraformaldehyde (Panreac, Barcelona, Spain) for 10 min at room temperature. They were then permeabilized by incubation in PBS-PVA 0.1% with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% Triton X-100 for 1 hr at room temperature. Afterwards, samples were incubated overnight at 4°C in PBS-PVA 0.1% containing 10% FCS and 1:200 rabbit polyclonal antibody anti-mu opioid receptor (Millipore, UK). Samples were washed three times in PBS-PVA 0.1% and then incubated in PBS-PVA 0.1% supplemented with 5% FCS serum and 1:500 goat polyclonal secondary antibody Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) for 2 hr at room temperature. Next, samples were washed three times in PBS-PVA 0.1%. In all cases, nuclei were stained with Hoechst 33342 (5 mg/ml) and finally, they were mounted in microdrops with Fluoromount G (EMS, Hatfield, United Kingdom) and examined by confocal microscopy (ApoTome.2; Zeiss). Negative controls were performed in the same way, except for omission of the primary antibody before secondary antibody addition.

4.5 | pAKT and pERK1/2 signaling evaluation

To evaluate the activation of phosphorylated AKT and phosphorylated ERK1/2 signaling during oocyte in vitro maturation process, COCs were incubated with increased concentration of the OPRM1 selective agonist morphine (1 nM, 10 nM, or 100 nM), and the same procedure as the previous section was followed with oocytes (20, $n = 3$) collected at different times of the maturation process (0 hr, 30 min, 1, 8, and 17 hr for AKT and 0 hr, 10 min, 30 min, and 17 hr, for ERK1/2). In this case, samples were incubated overnight at 4°C in PBS-PVA 0.1% containing 10% FCS and 1:200 rabbit phospho-Akt (Ser473) or 1:400 rabbit polyclonal phospho-ERK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

4.6 | In vitro fertilization of oocytes and culture of embryos

Using COCs matured in presence of OPRM1 agonist and/or antagonist we performed the in vitro fertilization (IVF) and the culture of the embryos achieved. Sperm from male mice (C57BL6/J x DBA/2J), and of proven fertility, were incubated for 1 hr in HTF medium under 5% CO₂ at 37°C for capacitation. Isolated COCs were transferred to 500 μ l equilibrated HTF drops and were overlaid with mineral oil and a concentration of 1×10^{-6} spermatozoa/ml was used to carry out the in vitro fertilization (IVF) ($n = 5$).

Five hours after IVF, presumptive zygotes were washed in HTF medium and cultured in 25 μ l drops of equilibrated culture medium KSOM overlaid with mineral oil at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ in air with maximum humidity. Embryos were cultured for 24 hr, and cleavage rates were assessed 24 hr after fertilization.

To assess whether adding morphine or naloxone affected rates of oocyte nucleus maturation and fertilization, the presence of the first polar body and pronuclear formation were identified respectively at 24 hr after fertilization. The presumptive zygote that had not divided into two cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and then stained with Hoechst 33342 for observation with immunofluorescence microscope (Axioskop, Zeiss) under UV light.

4.7 | In vivo maturation and isolation of oocytes

To verify that the in vitro fertilization process was correctly done, we performed a control condition with oocytes matured in vivo. In vivo matured oocytes (mostly on MII), were collected from 8- to 10-week-old oviducts of female mice superovulated by intraperitoneal injections of 7.5 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; Folligon, Intervet, Castle Hill, Australia), followed, 48 hr later, by 7.5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG; Veterin Corion; Divasa-Farmavic S.A., Spain). Briefly, at 14 hr after hCG administration, oviducts were removed from superovulated female mice and placed in a Petri dish containing M2 medium at room temperature. After washing, collected oviducts were placed in fresh M2 medium and COCs were released from the ampulla with the aid of a needle and washed in new M2 medium until fertilization.

4.8 | Statistical analysis

All statistical tests were performed by Graph Pad Prism 5 software and IBM SPSS Statistics 21.0. MII, zygote and cleavage rates between the different conditions were normalized as a fold over control group and tested for normality of the distribution (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene test). The data were normally distributed and compared by two-way analysis of variance (ANOVA). Bonferroni was used as a post hoc test. Significance was set at $p < .05$.

ACKNOWLEDGMENTS

This study received financial support from the University of the Basque Country (Grant PPGA18/01). E.O. has carried out all the experimentation without any public or private financial help. L.T. acknowledges the financial support given by University of the Basque Country (PIF15/149). The authors thank SGiker (UPV/EHU) for personal and technical support and particularly Ricardo Andrade and Alejandro Díez for his assistance with the confocal microscopy analysis.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

ORCID

Estibaliz Olabarrieta  <http://orcid.org/0000-0001-7842-3298>

Lide Totorikaguena  <http://orcid.org/0000-0002-8315-4608>

Naiara Agirregoitia  <http://orcid.org/0000-0002-8552-6989>

Ekaitz Agirregoitia  <http://orcid.org/0000-0001-7987-4963>

REFERENCES

- Agirregoitia, E., Peralta, L., Mendoza, R., Expósito, A., Ereño, E. D., Matorras, R., & Agirregoitia, N. (2012). Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 24, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.007>
- Bodnar, R. J. (2013). Endogenous opiates and behavior: 2016. *Peptides*, 50, 55–95. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.01.011>
- Cahill, C. M., Holdridge, S. V., & Morinville, A. (2007). Trafficking of δ -opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: Implications for pain and analgesia. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.11.003>
- Cecconi, S., Mauro, A., Cellini, V., & Patacchiola, F. (2012). The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *The International Journal of Developmental Biology*, 56, 809–817. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120146sc>
- Chouzouris, T. M., Dovolou, E., Krania, F., Pappas, I. S., Dafopoulos, K., Messinis, I. E., ... Amiridis, G. S. (2017). Effects of ghrelin on activation of Akt1 and ERK1/2 pathways during in vitro maturation of bovine oocytes. *Zygote*, 25, 183–189. <https://doi.org/10.1017/S096719941700003X>
- Conti, M., Hsieh, M., Musa zamah, A., & Oh, J. S. (2012). Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356(0), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.002>. Novel
- Dang-Nguyen, T. Q., Viet Linh, N., Minoia, R., Kaneda, M., Somfai, T., Haraguchi, S., ... Nagai, T. (2013). Naloxone increases maturation rate and ratio of inner cell mass to total cells in blastocysts in pigs. *Animal Science Journal*, 84, 765–773. <https://doi.org/10.1111/asj.12071>
- Dell'aquila, M. E., Albrizio, M., Guaricci, A. C., De Santis, T., Maritato, F., Tremoleda, J. L., ... Minoia, P. (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. <https://doi.org/10.1002/mrd.20869>
- Dell'aquila, M. E., Casavola, V., Reshkin, S. J., Albrizio, M., Guerra, L., Maritato, F., & Minoia, P. (2002). Effects of μ -endorphin and Naloxone on in vitro maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 63, 210–222. <https://doi.org/10.1002/mrd.10163>
- Fabbri, A., Jannini, E. a, Gnassi, L., Ulisse, S., Moretti, C., & Isidori, A. (1989). Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *Journal of Steroid Biochemistry*, 32(1), 145–150
- Facchinetti, F., Storchi, A. R., Petraglia, F., Volpe, A., & Genazzani, A. R. (1988). Expression of proopiomelanocortin-related peptides in human follicular fluid. *Peptides*, 9, 1089–1092. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(88\)90094-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(88)90094-0)
- Fan, H. -Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P. F., Hedrick, S. M., & Richards, J. S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science*, 324, 938–941
- Fan, H. -Y., Shimada, M., Liu, Z., Cahill, N., Noma, N., Wu, Y., ... Richards, J. S. (2008). Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development*, 135(12), 2127–2137. <https://doi.org/10.1242/dev.020560>. Selective
- Fan, H. -Y., & Sun, Q. -Y. (2004). Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals1. *Biology of Reproduction*, 70, 535–547. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022830>
- Fissore, R. a, He, C. L., & Vande Woude, G. F. (1996). Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 55, 1261–1270. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1261>
- Freudzon, L., Norris, R. P., Hand, A. R., Tanaka, S., Saeki, Y., Jones, T. L. Z., ... Jaffe, L. A. (2005). Regulation of meiotic prophase arrest in mouse oocytes by GPR3, a constitutive activator of the Gs G protein. *The Journal of Cell Biology*, 171, 255–265. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506194>
- Fu, C. Y., Xia, R. L., Zhang, T. F., Lu, Y., Zhang, S. F., Yu, Z. Q., ... Mou, X. Z. (2014). Hemokinin-1(4-11)-induced analgesia selectively up-regulates δ -opioid receptor expression in mice. *PLoS One*, 9(2):e90446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090446>
- Fukuda, K., Kato, S., Morikawa, H., Shoda, T., & Mori, K. (1996). Functional coupling of the δ -, μ -, and κ -opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Neurochemistry*, 67, 1309–1316. <https://doi.org/10.1042/bj3160081>
- Gosden, R., & Lee, B. (2010). Portrait of an oocyte: Our obscure origin. *Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 973–983. <https://doi.org/10.1172/JCI41294>
- Iorga, A., Valentini, L., De Santis, T., Ambruosi, B., Albrizio, M., Guaricci, A., ... Dell'Aquila, M. (2009). Expression of the μ opioid receptor and effects of the opioid antagonist naloxone on in vitro maturation of oocytes recovered from anovulatory bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 263–268. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01423.x>
- Jaschke, N., Lunger, F., Wildt, L., & Seeber, B. (2018). Beta endorphin in serum and follicular fluid of PCOS- and non-PCOS women. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 298, 217–222. <https://doi.org/10.1007/s00404-018-4793-6>
- Kalous, J., Kubelka, M., Šolc, P., Šušor, A., & Motlík, J. (2009). AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction*, 138, 645–654. <https://doi.org/10.1530/rep-08-0461>
- Kumar, M., Faraji, M., Sarwalia, P., Kumar, S., Gohain, M., De, S., & Datta, T. K. (2018). Propensity in low-grade oocytes for delayed germinal vesicle breakdown compromises the developmental ability of sub-optimal grade *Bubalus bubalis* oocytes. *Zygote*, 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0967199418000321>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(October), <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>. 10.1-10.14.

- Lunger, F., Vehmas, A. P., Furnrohr, B. G., Sopper, S., Wildt, L., & Seeber, B. (2016). Opiate receptor blockade on human granulosa cells inhibits VEGF release. *Reproductive BioMedicine Online*, 32(3), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.12.006>
- López-Cardona, A. P., Pérez-Cerezales, S., Fernández-González, R., Laguna-Barraza, R., Pericuesta, E., Agirregoitia, N., ... Agirregoitia, E. (2017). CB1cannabinoid receptor drives oocyte maturation and embryo development via PI3K/Akt and MAPK pathways. *The FASEB Journal*, 31(8), 3372–3382. <https://doi.org/10.1096/fj.201601382RR>
- López-Cardona, A. P., Sánchez-Calabuig, M. J., Beltran-Brea, P., Agirregoitia, N., Rizos, D., Agirregoitia, E., & Gutierrez-Adán, A. (2016). Exocannabinoids effect on in vitro bovine oocyte maturation via activation of AKT and ERK1/2. *Reproduction*, 152, 603–612. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0199>
- Madishetti, S., Schneble, N., König, C., Hirsch, E., Schulz, S., Mller, J. P., & Wetzker, R. (2014). PI3K γ integrates cAMP and Akt signalling of the μ -opioid receptor. *British Journal of Pharmacology*, 171, 3328–3337. <https://doi.org/10.1111/bph.12698>
- Maizels, E. T., Cottom, J., Jones, J. C. R., & Hunzicker-Dunn, M. (1998). Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 139(7), 3353–3356.
- Makrigiannakis, A., Margioris, A. N., Stournams, C., & Gravanis, A. (1995). Opioid peptides in the female reproductive system: Physiological implications. *Biomedical Reviews*, 4, 71–83.
- Mehlmann, L. M. (2004). The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science*, 306, 1947–1950. <https://doi.org/10.1126/science.1103974>
- 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. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00793>
- Mehmanesh, H., Almeida, O. F. X., Nikolarakis, K. E., & Herz, A. (1988). Hypothalamic LH-RH release after acute and chronic treatment with morphine studied in a combined in vivo/in vitro model. *Brain Research*, 451, 69–76. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90750-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90750-0)
- Mehta, J. G. (2014). In vitro maturation. *Fertility Science and Research*, 1(1), 7–15. <https://doi.org/10.4103/2394-4285.146700>
- Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., & Conti, M. (2008). Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Molecular Endocrinology*, 22(4), 924–936. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0246>
- Petraglia, F., Segre, A., Facchinetti, F., Campanini, D., Ruspa, M., & Genazzani, A. R. (1985). β -endorphin and met-enkephalin in peritoneal and ovarian follicular fluids of fertile and postmenopausal women. *Fertility and Sterility*, 44(5), 615–621. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)48976-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48976-4)
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145, 27–37. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00166-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00166-X)
- Schmitt, A., & Nebreda, A. R. (2002). Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *Journal of Cell Science*, 115, 2457–2459. <http://jcs.biologists.org/content/joces/115/12/2457.full.pdf>
- Schulz, R., Eisinger, D. a. & Wehmeyer, A. (2004). Opioid control of MAP kinase cascade. *European Journal of Pharmacology*, 500, 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.010>
- Sociedad Española de Fertilidad (SEF). (2016). Registro Nacional de Actividad 2016-Registro SEF. Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2016. Retrieved from https://www.registrosef.com/public/docs/sef2016_IAFIVm.pdf
- Smoczyńska, M., Pierzchała-Koziec, K., Gregoraszczyk, E., Maderspach, K., & Wierzchoś, E. (1997). The kappa-opioid receptor is present in porcine ovaries: Localization in granulosa cells. *Cytobios*, 92, 195–202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9693886>
- Tomek, W., & Smiljakovic, T. (2005). Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction*, 130, 423–430. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00754>
- Wai-sum, O. (1990). The effect of β -endorphin on rat oocyte maturation in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 68, 181–185. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540401>
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 953–990. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940>
- Yilmaz, B., & Gilmore, D. P. (1999). Opioid modulation of hypothalamic catecholaminergic neurotransmission and the pre-ovulatory LH surge in the rat. *Neuroendocrinology Letters*, 20(February 1999), 115–121.

How to cite this article: Olabarrieta E, Totorikaguena L, Agirregoitia N, Agirregoitia E. Implication of mu opioid receptor in the in vitro maturation of oocytes and its effects on subsequent fertilization and embryo development in mice. *Mol Reprod Dev.* 2019;1–9. <https://doi.org/10.1002/mrd.23248>

Mu opioid receptor expression and localisation in murine spermatozoa and its role in IVF

Estibaliz Olabarrieta^A, Lide Totorikaguena^A, Jon Romero-Aguirregomezcorta^A,
Naiara Agirregoitia^A and Ekaitz Agirregoitia^{A,B} 

^ADepartment of Physiology, Faculty of Medicine and Nursing, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 48940 Leioa, Bizkaia, Spain.

^BCorresponding author. Email: e.agirregoitia@ehu.eus

Abstract. The endogenous opioid peptides are reported to be involved in the regulation of reproductive physiology. Many of the studies conclude with statements on the harmful effect of opioids on male fertility but, in fact, there are no studies regarding the real fertilisation potential of spermatozoa that have been exposed to opioids. The aim of the present study was to examine if modulation of mu opioid receptor (OPRM1) in murine spermatozoa during capacitation influenced embryo production after IVF. The presence of OPRM1 in murine mature spermatozoa was analysed by reverse transcription–polymerase chain reaction and immunofluorescence. We analysed the involvement of OPRM1 on IVF and pre-implantational embryo development by incubating the spermatozoa with the opioid agonist morphine and/or antagonist naloxone. We verified the presence of OPRM1 in murine mature spermatozoa, not only at the mRNA level but also the protein level. Moreover, incubation of the spermatozoa with morphine, before IVF, had an effect on the fertilisation rate of the spermatozoa and reduced the numbers of blastocysts, which was reversed by naloxone. Considering that opioids are widely used clinically, it is important to take into account their effect, via OPRM1, on the fertility of patients.

Additional keywords: capacitation, embryo, *in vitro* fertilisation, oocyte, OPRM1.

Received 26 February 2019, accepted 1 July 2019, published online 13 November 2019

Introduction

The endogenous opioid peptides (EOPs) are substances derived from proopiomelanocortin (POMC), proenkephalin (PENK) and prodynorphin (PDYN) precursors and they exert their effects by binding to the G-protein-coupled receptors δ -opioid receptor (OPRD1), the κ -opioid receptor (OPRK1) and the mu opioid receptor (OPRM1) (Waldhoer *et al.* 2004). EOPs are involved in intercellular communication and it is known that they participate in the regulation of reproductive physiology at multiple sites (Fabbri *et al.* 1989). In fact, the opioid system has been described in many of the male and female reproductive tissues and it appears to be increasingly important in sperm cell function (Fraïoli *et al.* 1984; Ragni *et al.* 1988).

The study of the effect of opioids in spermatozoa began when it was discovered that opium users had reduced sperm motility, a condition known as asthenozoospermia (Ragni *et al.* 1988). Thereafter, its relevance increased because opiates are widely used clinically to treat moderate to severe pain (van Amsterdam and van den Brink 2015) and the side effects on reproduction are not yet completely known. Very high concentrations of endorphins and enkephalins have been found in human semen and sperm cells (Foresta *et al.* 1986; Davidson *et al.* 1989; Kew *et al.*

1990). Thus, continuing those studies, the presence of the three opioid receptors in human spermatozoa was described (Agirregoitia *et al.* 2006; Albrizio *et al.* 2006), as well as the presence of mu and delta receptors in equine sperm cells (Albrizio *et al.* 2005, 2010). In those studies, the authors showed how some opioids, such as morphine, naloxone and naltrindole, were able to modify sperm motility and capacitation. Furthermore, it seems that the opioid-degrading enzymes are involved in the control of sperm motility (Subirán *et al.* 2008, 2010, 2012). More recently, it has been described that β -endorphin stimulates the acrosome reaction in human spermatozoa (Urizar-Arenaza *et al.* 2016).

However, in addition to the effects on mature spermatozoa, a possible role in the regulation of murine spermatogenesis via opioid receptors has been suggested (Estomba *et al.* 2016; Takzare *et al.* 2016). Moreover, when the *Oprm1* gene is disrupted, mice show reduced sperm count and sperm motility (Tian *et al.* 1997). A possible effect of opiate exposure on epigenetics has been also proposed, because in opiate drug addicts the *Oprm1* gene promoter region in both blood cells and sperm cells is hypermethylated (Chorbov *et al.* 2011).

Several of the aforementioned studies conclude with statements about the harmful effect of opioids on male fertility but, in fact, although all data lead to that conclusion, there are no studies related to the real fertilisation potential of spermatozoa that have been in contact with opioids. Therefore, the goal of the present study was to determine whether modulation of OPRM1 in mice spermatozoa during capacitation affected embryo production after IVF.

Materials and methods

Experimental animals

Approval for this study was given by the Animal Research Ethical Committee of the University of the Basque Country (UPV/EHU CEEA reference no. M20-2015-016-027-028-173) and all experiments were performed according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, endorsed by the Society for the Study of Reproduction and European legislation. Adult mice used in this study (C57BL6/J × DBA/2J) were kept in an animal house under controlled conditions of temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and photoperiod (light/dark cycle 14 : 10 h), with free access to water and food.

Reverse transcription–polymerase chain reaction

The 2-month-old male mice were killed by cervical dislocation and spermatozoa were removed from the epididymis in human tubal fluid (HTF) medium with the aid of a needle (30 gauge). After a 10-min centrifugation (room temperature, 600g), RNA from the spermatozoa was isolated using the Dynabeads mRNA Direct Micro Kit (Ambion, Life Technologies). Immediately after extraction, the procedure for obtaining the cDNA was performed using the GoScript Reverse Transcription system (Promega), according to manufacturer's instructions. Positive control was performed using RNA from murine cerebral cortex.

Primers used for PCR were as follows: OPRM1, 5'-ATCCTCTCTTCTGCCATTGGT-3' and 5'-TGAAGGC-GAAGATGAAGACA-3' (148-bp product; *Fu et al.* 2014) and murine B-actin (ACTB), 5'-GCTTCTTTGCAGCTCCTTCG-3' and 5'-ACGGTTGGCCTTAGGGTTCA-3' (390-bp product) used as endogenous control. The primers were located on different exons of each respective gene (i.e. they spanned introns). Even so, we verified the possible carryover of genomic DNA during the extraction process by performing PCR in the absence of reverse transcriptase. If genomic DNA were present, it would be amplified in subsequent PCR. PCR was performed using the following parameters: 95°C for 2 min, 40 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 5 min. The mixture was electrophoretically separated on a 2% agarose gel.

Immunofluorescence

Isolated spermatozoa were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) and smeared onto a slide coated with poly-L-lysine. Samples were washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (Panreac) for 10 min at room temperature. The OPRM1 receptor was immunocytochemically detected in cells that had been treated in the presence or absence of 1% Triton X-100, in PBS with 10% fetal calf serum (FCS) for 1 h at room

temperature, to detect the presence of intracellular and surface expressed receptors respectively. Afterwards, spermatozoa were incubated overnight at 4°C in PBS containing 10% FCS and 1 : 200 rabbit polyclonal antibody anti-OPRM1 (Millipore). Spermatozoa were washed three times in PBS and then incubated in PBS supplemented with 5% FCS serum and 1 : 500 goat polyclonal secondary antibody Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) for 2 h at room temperature. Next, spermatozoa were washed three times in PBS. In all cases, nuclei were stained with Hoechst 33342 (5 mg mL^{-1}) and finally, the spermatozoa were mounted in microdrops with Fluoromount G (EMS) and examined by confocal microscopy (LSM 800; Zeiss). Negative controls were performed in the same way, with omission of the primary antibody before secondary antibody addition.

Isolation and in vivo maturation of oocytes

In vivo matured oocytes, in MII, were collected from the oviducts of 8- to 10-week-old female mice superovulated by intraperitoneal injections of 7.5 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; Folligon), followed, 48 h later, by 7.5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG; Veterin Corion). Briefly, at 14 h after hCG administration, the oviducts were removed from the superovulated female mice and placed in a Petri dish containing M2 medium at room temperature. After washing, the collected oviducts were placed in fresh M2 medium and cumulus–oocyte complexes (COCs) were released from the ampulla with the aid of a needle and washed in new M2 medium until fertilisation.

In vitro fertilisation of oocytes

Spermatozoa from male mice (C57BL6/J × DBA/2J), of proven fertility, were incubated for 1 h in HTF medium under 5% CO_2 at 37°C for capacitation. During capacitation, spermatozoa were incubated with increasing concentrations of the main OPRM1 selective agonist morphine (1 nM, 10 nM and 100 nM) and/or the main antagonist naloxone (10 μM) (K_i : 1.4 and 1.78 nM, respectively). The morphine (Alcaliber) and naloxone (Sigma) stock solutions were prepared in PBS–Polyvinyl alcohol (PVA) 0.1%. Spermatozoa containing the same amount of PBS–PVA 0.1% were used as an incubation control. After *in vivo* maturation, isolated COCs were transferred to 500 μL equilibrated HTF drops and overlaid with mineral oil; a concentration of 1×10^6 spermatozoa mL^{-1} was used to carry out the IVF.

At 5 h after IVF, presumptive zygotes were washed in HTF medium and cultured in 25- μL drops of equilibrated culture medium KSOM overlaid with mineral oil at 37°C under an atmosphere of 5% CO_2 in air with maximum humidity. Embryos were cultured for 5 days and cleavage rates were assessed on Day 1 (24 h after fertilisation) and blastocysts on Day 4 (96–100 h after fertilisation).

To assess whether adding morphine or naloxone affected the rates of oocyte nucleus maturation and fertilisation, the presence of the first polar body and pronuclear formation were identified respectively at 24 h after fertilisation. The presumptive zygotes that had not divided into two cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and then stained with Hoechst 33342 for observation with immunofluorescence microscopy (Axioskop, Zeiss) under UV light.

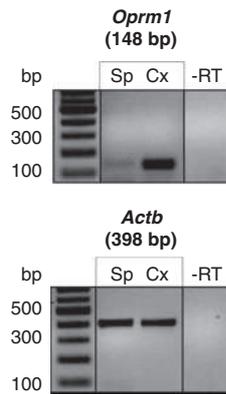


Fig. 1. Expression of the mu opioid receptor gene *Oprm1* in mouse spermatozoa. Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) products for *Oprm1* and β -actin (*Actb*) in murine spermatozoa (Sp) and cerebral cortex (Cx), which was used as the positive control. -RT indicates the negative control obtained in the absence of reverse transcriptase. Base pairs are indicated on the left side, representative RT-PCR experiments are shown ($n = 3$).

Statistical analysis

All statistical tests were performed with Graph Pad Prism 5 software and IBM SPSS Statistics 21.0. Cleavage rates and blastocyst yields under the different conditions were tested for the normality of distribution (Kolmogorov–Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene test). The data were normally distributed and compared by two-way ANOVA. Bonferroni was used as a post hoc test. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Oprm1 mRNA expression in murine spermatozoa

The presence of *Oprm1* was evaluated by RT-PCR. We studied the presence of the transcript for *Oprm1* in murine spermatozoa and compared it with the transcript for *Oprm1* in the murine cerebral cortex as a positive control. The expected 148-bp fragment was detected in both the cerebral cortex and spermatozoa (Fig. 1). To verify that RNA extraction and cDNA generation were correct, the housekeeping gene *Actb* was detected in both tissues at the expected 398 bp (Fig. 1). The primers used were located on different exons to avoid amplification of genomic DNA and the retrotranscriptase negative controls were performed to assure the absence of that genomic DNA (Fig. 1).

Immunolocalisation of OPRM1 in murine spermatozoa

Immunofluorescence analysis revealed that OPRM1 protein was present in murine sperm cells, under permeabilised (Fig. 2a) and non-permeabilised (Fig. 2b) conditions. Specifically, OPRM1 labelling was observed in the sperm head with more intensity in the acrosomal region and the tail. When primary anti-OPRM1 antibody was omitted before secondary antibody addition, the fluorescent staining pattern was not evident (Fig. 2c).

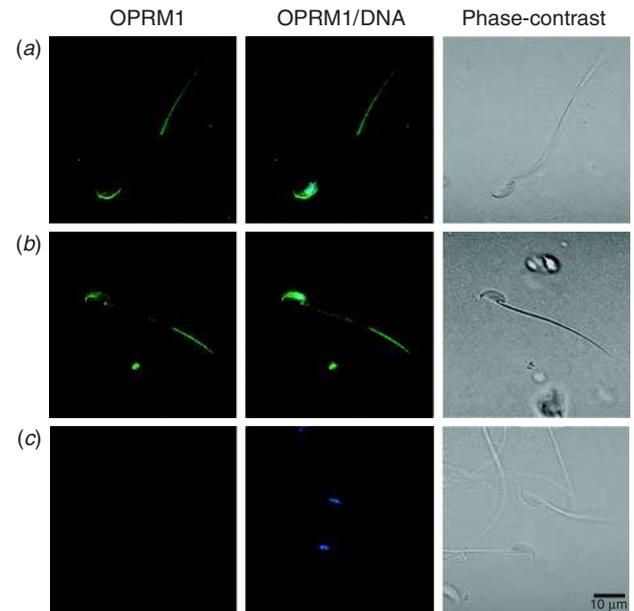


Fig. 2. Immunolocalisation of mu opioid receptor protein OPRM1 in mouse spermatozoa under permeabilised (a) and non-permeabilised (b) conditions. Negative control without primary antibody is shown (c). Representative microphotography showing the distribution of OPRM1, in green, and Hoechst-labelled DNA, in blue. The phase-contrast image is also shown ($n = 3$).

Effect of opioid agonist, morphine, during sperm capacitation on fertility and subsequent embryo development

We incubated murine spermatozoa with increasing concentrations of the opioid agonist, morphine (0 nM, 1 nM, 10 nM and 100 nM), during capacitation before IVF, and we used these spermatozoa to fertilise oocytes *in vitro*. We observed that when spermatozoa were incubated with morphine, both the IVF process and embryo development were impaired. This deleterious effect was dose-dependent, being higher with an increased concentration of morphine. Moreover, although the percentage of obtained oocytes in zygotes, 2-cell embryos and blastocysts was less in the experiments in which the spermatozoa had been capacitated in the presence of morphine, we observed a significant difference ($P < 0.05$) in the blastocyst rate reached in the absence or presence of morphine at 100 nM (Fig. 3).

Effect of opioid antagonist, naloxone, during sperm capacitation on fertility and subsequent embryo development

We next examined whether the observed effect of morphine, specifically that produced by adding 100 nM morphine, during sperm capacitation could be blocked by naloxone. The procedure was the same as in the experiments using the agonists but we also incubated the spermatozoa with naloxone (10 μ M). The incubation of spermatozoa only with naloxone did not generate any significant change in comparison with the control (Fig. 4). However, sperm incubation with naloxone together with

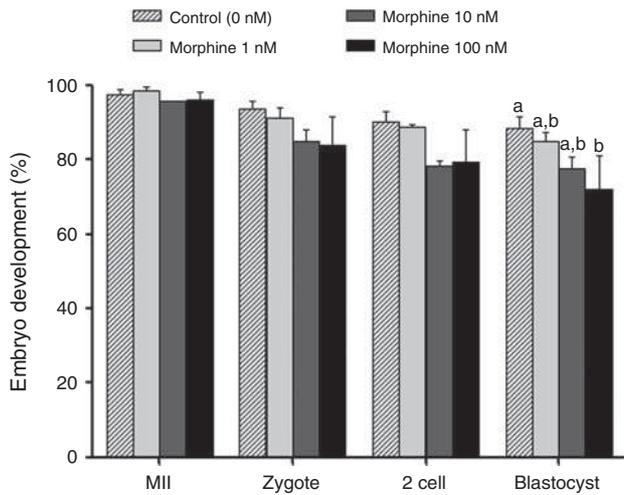


Fig. 3. Embryo development from MII to blastocyst. Percentages of MII oocytes recovered from mice, fertilised oocytes (zygote), 2-cell-stage embryos and blastocysts after IVF using murine spermatozoa incubated with increasing concentrations of morphine (0 nM, 1 nM, 10 nM and 100 nM). Results are the mean \pm s.e.m. of eight independent experiments. The different combinations of letters indicate significant differences between groups; $P < 0.05$ in all cases.

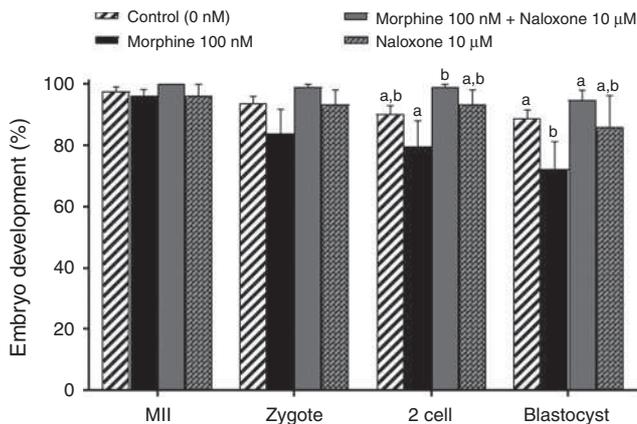


Fig. 4. Embryo development from MII to blastocyst. Percentages of MII oocytes recovered from mice, fertilised oocytes (zygote), 2-cell-stage embryos and blastocysts after IVF using murine spermatozoa incubated with morphine (100 nM), naloxone (10 μ M) or both. Results are the mean \pm s.e.m. of eight independent experiments. Significant differences between groups are indicated with different letters; $P < 0.05$ in all cases.

morphine 100 nM before IVF blocked ($P < 0.05$) the deleterious effect observed on the rate of 2-cell embryos and blastocysts derived from spermatozoa incubated with morphine (Fig. 4).

Discussion

Since the presence of endogenous opioids was described in the male reproductive system, several physiological roles have been suggested for these compounds and most studies have concluded that there is a harmful effect of opioids on male fertility (Drobnis

and Nangia 2017). However, there are no studies regarding the real fertilisation potential of spermatozoa that have been exposed to opioids. In our present work, we verified the presence of OPRM1 in murine mature spermatozoa, not only at the mRNA level but also the protein level. Moreover, we elucidated that spermatozoa incubated with the opioid agonist morphine, during the capacitation process, showed affected rates of fertilisation and decreased the numbers of embryos that reached the blastocyst stage.

RT-PCR revealed the presence of *Oprm1* mRNA in murine spermatozoa, but less than in the cerebral cortex. The weak intensity of the mRNA band detected in our experiments could be related to the limited pool of RNA stored from spermatogenesis that has a role in early zygote development (Miller *et al.* 1999). However, it is widely accepted that mature spermatozoa do not perform transcription and translation processes because of scarcity of cytoplasm capable of supporting translation (Flesch and Gadella 2000). Moreover, in the final stages of spermatogenesis, the spermatozoa lose most of their cytoplasm, including most of the mRNA (Miller *et al.* 2005). Even so, mRNA of *Oprm1* has been previously detected in murine spermatogenic cells (Estomba *et al.* 2016) and in human and equine mature spermatozoa (Albrizio *et al.* 2005; Agirregoitia *et al.* 2006); which supports our findings.

Immunofluorescence analysis revealed the presence of OPRM1 protein in the murine sperm head with more intensity in the acrosomal region, as described previously (Estomba *et al.* 2016), but also in the tail. The OPRM1 protein has been previously detected in other species: in the acrosomal region and tail of equine spermatozoa (Albrizio *et al.* 2005), in the acrosome, neck and principal piece of porcine spermatozoa (Albrizio *et al.* 2005, 2014; Vicente-Carrillo *et al.* 2016) and in human spermatozoa in the equatorial/postacrosomal region and in the tail (Agirregoitia *et al.* 2006), as well as in the acrosomal region and in the neck (Albrizio *et al.* 2006). Because of the highly polarised structure and function of spermatozoa, they require compartmentalisation of particular metabolic and signalling pathways to specific regions (Aquila *et al.* 2004) and that is the reason why OPRM1 was first related to a possible function in the acrosome reaction and in motility. Today we know for certain that both the acrosome reaction (Urizar-Arenaza *et al.* 2016) and motility (Albrizio *et al.* 2005; Agirregoitia *et al.* 2006; Vicente-Carrillo *et al.* 2016) are modulated by OPRM1.

Even so, until now, we did not know the consequences of exposure of spermatozoa to opiates, in relation to their subsequent fertilisation capacity. Therefore, we examined the consequences of incubating murine spermatozoa with increasing concentrations of morphine (0 nM, 1 nM, 10 nM and 100 nM) before IVF (during the capacitation process). We observed a dose-dependent downward trend in the rate of blastocyst formation when the spermatozoa had been in contact with morphine, becoming significant when spermatozoa were incubated in the presence of 100 nM of morphine. On the other hand, co-incubation of spermatozoa with the opioid antagonist naloxone (10 μ M) with morphine blocked the deleterious effect of morphine (100 nM) on all studied stages of embryo development, being significant in the rates of forming 2-cell embryos and blastocysts.

In summary, our data led us to hypothesise that OPRM1, modulating some sperm functions that occur during capacitation, could regulate the fertilisation process. Thus, enhancement of the acrosome reaction described by activation of spermatic OPRM1 (Urizar-Arenaza *et al.* 2016) and the decrease in sperm motility described by activation of the same receptor (Agirregoitia *et al.* 2012; Xu *et al.* 2013; Vicente-Carrillo *et al.* 2016), could, in reality, lead to a loss of the fertilising capacity of spermatozoa. In forthcoming studies, it could be interesting to check the quality of the embryos produced when spermatozoa are capacitated in the presence of morphine, in order to broaden our understanding of the mechanisms by which OPRM1 takes part in this process. These findings are of the utmost importance considering that mu opioid agonists such as methadone, which is excreted in the semen and probably enters the vagina during sexual intercourse (Pichini *et al.* 1994), are widely used clinically (van Amsterdam and van den Brink 2015) as common analgesics and their effects on male fertility could be higher than previously thought.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work received financial support from the University of the Basque Country (Grant GIU14/26) and Basque Government (KK-2016/00026). E.O. carried out all experimentation without any public or private financial help. L.T. and J.R. acknowledge the financial support given by University of the Basque Country (PIF15/149; ESPDOC17/33, respectively). The authors thank SGiker (UPV/EHU) for personal and technical support and particularly Ricardo Andrade and Alejandro Díez for assistance with the confocal microscopy analysis.

References

- Agirregoitia, E., Valdivia, A., Carracedo, A., Casis, L., Gil, J., Subiran, N., Ochoa, C., and Irazusta, J. (2006). Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 4969–4975. doi:10.1210/JC.2006-0599
- Agirregoitia, E., Subiran, N., Valdivia, A., Gil, J., Zubero, J., and Irazusta, J. (2012). Regulation of human sperm motility by opioid receptors. *Andrologia* **44**, 578–585. doi:10.1111/J.1439-0272.2011.01230.X
- Albrizio, M., Guaricci, A. C., Maritato, F., Sciorsci, R. L., Mari, G., Calamita, G., Lacalandra, G. M., Aiudi, G. G., Minoia, R., Dell'Aquila, M. E., and Minoia, P. (2005). Expression and subcellular localization of the mu-opioid receptor in equine spermatozoa: evidence for its functional role. *Reproduction* **129**, 39–49. doi:10.1530/REP.1.00284
- Albrizio, M., Guaricci, A. C., Calamita, G., Zarrilli, A., and Minoia, P. (2006). Expression and immunolocalization of the mu-opioid receptor in human sperm cells. *Fertil. Steril.* **86**, 1776–1779. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2006.04.037
- Albrizio, M., Lacalandra, G. M., Micera, E., Guaricci, A. C., Nicassio, M., and Zarrilli, A. (2010). Delta opioid receptor on equine sperm cells: subcellular localization and involvement in sperm motility analyzed by computer assisted sperm analyzer (CASA). *Reprod. Biol. Endocrinol.* **8**, 78. doi:10.1186/1477-7827-8-78
- Albrizio, M., Guaricci, A. C., Milano, S., Macri, F., and Aiudi, G. (2014). Mu opioid receptor in spermatozoa, eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and its involvement in stress related to aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.* **40**, 997–1009. doi:10.1007/S10695-013-9900-9
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Carpino, A., Rago, V., and Andò, S. (2004). Estrogen receptor (ER) α and ER β are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 1443–1451. doi:10.1210/JC.2003-031681
- Chorbov, V. M., Todorov, A. A., Lynskey, M. T., and Cicero, T. J. (2011). Elevated levels of DNA methylation at the OPRM1 promoter in blood and sperm from male opioid addicts. *J. Opioid. Manag.* **7**, 258–264. doi:10.5055/JOM.2011.0067
- Davidson, A., Vermesh, M., Paulson, R. J., Graczykowski, J. W., and Lobo, R. A. (1989). Presence of immunoreactive β -endorphin and calcitonin in human seminal plasma, and their relation to sperm physiology. *Fertil. Steril.* **51**, 878–880. doi:10.1016/S0015-0282(16)60684-2
- Drobnis, E. Z., and Nangia, A. K. (2017). Pain medications and male reproduction. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1034**, 39–57. doi:10.1007/978-3-319-69535-8_6
- Estomba, H., Muñoa-Hoyos, I., Gianzo, M., Urizar-Arenaza, I., Casis, L., Irazusta, J., and Subirán, N. (2016). Expression and localization of opioid receptors in male germ cells and the implication for mouse spermatogenesis. *PLoS One* **11**, e0152162. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0152162
- Fabrizi, A., Jannini, E. A., Gnassi, L., Ullisse, S., Moretti, C., and Isidori, A. (1989). Neuroendocrine control of male reproductive function: the opioid system as a model of control at multiple sites. *J. Steroid Biochem.* **32**, 145–150. doi:10.1016/0022-4731(89)90155-6
- Flesch, F. M., and Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 197–235. doi:10.1016/S0304-4157(00)00018-6
- Foresta, C., Caretto, A., Indino, M., And, C. B., and Scandellari, C. (1986). Localization of met-enkephalin on human spermatozoa and evidence for its physiological role. *Arch. Androl.* **17**, 19–24. doi:10.3109/01485018608986952
- Fraioli, F., Fabrizio, A., Gnassi, L., Silvestroni, L., Moretti, C., Redi, F., and Isidori, A. (1984). Beta-endorphin, Met-enkephalin, and calcitonin in human semen: evidence for a possible role in human sperm motility. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **438**, 365–370. doi:10.1111/J.1749-6632.1984.TB38297.X
- Fu, C. Y., Xia, R. L., Zhang, T. F., Lu, Y., Zhang, S. F., Yu, Z. Q., Jin, T., and Mou, X. Z. (2014). Hemokinin-1(4-11)-induced analgesia selectively up-regulates δ -opioid receptor expression in mice. *PLoS One* **9**, e90446. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0090446
- Kew, D., Muffly, K. E., and Kilpatrick, D. L. (1990). Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9143–9147. doi:10.1073/PNAS.87.23.9143
- Miller, D., Briggs, D., Snowden, H., Hamlington, J., Rollinson, S., Lilford, R., and Krawetz, S. A. (1999). A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: Implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene* **237**, 385–392. doi:10.1016/S0378-1119(99)00324-8
- Miller, D., Ostermeier, G. C., and Krawetz, S. A. (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol. Med.* **11**, 156–163. doi:10.1016/J.MOLMED.2005.02.006
- Pichini, S., Zuccaro, P., and Pacifici, R. (1994). Drugs in semen. *Clin. Pharmacokinet.* **26**, 356–373. doi:10.2165/00003088-199426050-00004
- Ragni, G., De Lauretis, L., Bestetti, O., Sghedoni, D., and Aro, V. G. A. (1988). Gonadal function in male heroin and methadone addicts. *Int. J. Androl.* **11**, 93–100. doi:10.1111/J.1365-2605.1988.TB00984.X
- Subirán, N., Agirregoitia, E., Valdivia, A., Ochoa, C., Casis, L., and Irazusta, J. (2008). Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil. Steril.* **89**, 1571–1577. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2007.06.056

- Subirán, N., Pinto, F. M., Agirreagoitia, E., Candenas, L., and Irazusta, J. (2010). Control of APN/CD13 and NEP/CD10 on sperm motility. *Asian J. Androl.* **12**, 899–902. doi:10.1038/AJA.2010.82
- Subirán, N., Candenas, L., Pinto, F. M., Cejudo-Roman, A., Agirreagoitia, E., and Irazusta, J. (2012). Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid peptide. *Fertil. Steril.* **98**, 617–625.e3. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2012.05.036
- Takzare, N., Samizadeh, E., Shoar, S., Majidi Zolbin, M., Naderan, M., Lashkari, A., and Bakhtiarian, A. (2016). Impacts of morphine addiction on spermatogenesis in rats. *Int. J. Reprod. Biomed. (Yazd)* **14**, 303–308. doi:10.29252/IJRM.14.5.303
- Tian, M., Broxmeyer, H. E., Fan, Y., Lai, Z., Zhang, S., Aronica, S., Cooper, S., Bigsby, R. M., Steinmetz, R., Engle, S. J., Mestek, A., Pollock, J. D., Lehman, M. N., Jansen, H. T., Ying, M., Stambrook, P. J., Tischfield, J. A., and Yu, L. (1997). Altered hematopoiesis, behavior, and sexual function in mu-opioid receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* **185**, 1517–1522. doi:10.1084/JEM.185.8.1517
- Urizar-Arenaza, I., Estomba, H., Muñoa-Hoyos, I., Matorras, R., Esposito, A., Candenas, L., Pinto, F. M., Valdivia, A., Irazusta, J., and Subirán, N. (2016). The opioid peptide beta-endorphin stimulates acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrology* **4**, 143–151. doi:10.1111/ANDR.12133
- van Amsterdam, J., and van den Brink, W. (2015). The misuse of prescription opioids: a threat for Europe? *Curr. Drug Abuse Rev.* **8**, 3–14. doi:10.2174/187447370801150611184218
- Vicente-Carrillo, A., Álvarez-Rodríguez, M., and Rodríguez-Martínez, H. (2016). The mu (μ) and delta (δ) opioid receptors modulate boar sperm motility. *Mol. Reprod. Dev.* **83**, 724–734. doi:10.1002/MRD.22675
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., and Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 953–990. doi:10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.73.011303.073940
- Xu, B., Wang, Z.-P., Wang, Y.-J., Lu, P.-H., Wang, L.-J., and Wang, X.-H. (2013). The toxic effect of opioid analgesics on human sperm motility in vitro. *Drug Chem. Toxicol.* **36**, 205–208. doi:10.3109/01480545.2012.710621

Mu opioid receptor in the human endometrium: dynamics of its expression and localization during the menstrual cycle

Lide Totorikaguena, B.S.,^a Estibaliz Olabarrieta, B.S.,^a Roberto Matorras, M.D., Ph.D.,^b Ederne Alonso, Ph.D.,^c Ekaitz Agirreagoitia, Ph.D.,^a and Naiara Agirreagoitia, Ph.D.^a

^a Department of Physiology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia;

^b Human Reproduction Unit, Cruces University Hospital, Biocruces, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia;

and ^c Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia, Spain

Objective: To study the dynamics of the expression and localization of the mu opioid receptor (MOR) in human endometrium throughout the menstrual cycle.

Design: Analysis of human endometrial samples from different menstrual cycle phases (menstrual, early/midproliferative, late proliferative/early secretory, midsecretory, and late secretory) by reverse transcription-polymerase chain reaction, Western blot, and immunohistochemistry.

Setting: Academic research laboratory.

Patient(s): Women from the Human Reproduction Unit of the Cruces University Hospital, fulfilling the following criteria: normal uterine vaginal ultrasound; absence of endometriosis, polycystic ovary syndrome, implantation failure, or recurrent miscarriage; and no history of opioid drug use.

Intervention(s): Endometrial samples of 86 women categorized into groups for the menstrual cycle phases: 12 menstrual, 21 early/midproliferative, 16 late proliferative/early secretory, 17 midsecretory, and 20 late secretory.

Main Outcome Measure(s): MOR gene and protein expression and localization in the different compartments of the human endometrium at different stages of the menstrual cycle.

Result(s): The expression of MOR mRNA and protein changed throughout the cycle in human endometrium. MOR expression increased during the proliferative phase and decreased during the secretory one. Lower values were found at menstruation, and maximum values around the time of ovulation. Small variations for each endometrial compartment were found.

Conclusion(s): The presence of MOR in human endometrium and the dynamic changes during the menstrual cycle suggest a possible role for opioids in reproduction events related to the human endometrium or endometriosis. (Fertil Steril® 2017; ■: ■-■. ©2017 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Mu opioid receptor, MOR, endometrium, menstrual cycle

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <https://www.fertstertdialog.com/users/16110-fertility-and-sterility/posts/14765-23367>

The endogenous opioid peptides (EOPs) are derived from proopiomelanocortin (POMC), proenkephalin (PENK), and prodynorphin (PDYN) precursors and exert their effects by binding to the G-protein-coupled receptors δ -opioid receptor

(DOR), κ -opioid receptor (KOR), and μ -opioid receptor (MOR) (1). EOPs are known to participate in the regulation of reproductive physiology at multiple sites (2) since opioid peptides and their precursors and receptors have been described in many of the male and fe-

male reproductive tissues. One of the best-known effects of opioid peptides on the reproductive system is their inhibitory role in the secretion of GnRH at the hypothalamic level and the tonic inhibition of the release of LH (3–5). But there is a growing body of evidence that indicates a participation of opioid peptides in the regulation of reproductive function through a direct local action within reproductive tissues (6).

One of the tissues where it is believed that the opioids are acting is the endometrium. Human endometrium is a complex tissue that regenerates and regresses with each menstrual

Received November 10, 2016; revised January 26, 2017; accepted January 31, 2017.

L.T. has nothing to disclose. E.O. has nothing to disclose. R.M. has nothing to disclose. E.Alonso has nothing to disclose. E.Agirreagoitia has nothing to disclose. N.A. has nothing to disclose.

L.T., E.O., E. Agirreagoitia, and N.A. should be considered similar in author order.

Supported by the University of the Basque Country (grant no. GIU14/26); by the University of the Basque Country (to L.T.); and by the UPV/EHU Gender Equality Department (to L.T. and E.O.).

Reprint requests: Naiara Agirreagoitia, PhD, Department of Physiology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country UPV/EHU, Barrio Sarriena s/n 48940, Leioa, Bizkaia, Spain (E-mail: naiara.aguirreagoitia@ehu.eus).

Fertility and Sterility® Vol. ■, No. ■, ■ 2017 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2017 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.020>

cycle under hormonal control but also due to regulation by other factors like opioid peptides (7). In fact, the three opioid peptide precursors' mRNA has been described in endometrium: POMC in rat endometrial cells (6) and Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line (8, 9); PENK in endometrial cells of human (10), cow (11), mouse (12), rat (6), and primate (13); and PDYN in human endometrial cells (14) and Ishikawa human endometrial cells (9). Moreover, opioid peptides such as β -endorphin and met-enkephalin have been found in the uterine fluid of the human and cow (15), and dynorphins have been described in human and Ishikawa human endometrial cells (14), where β -endorphin has also been detected (8). Finally, DOR and KOR have been described in Ishikawa human endometrial cells, while MOR is absent (14, 16); in fact, MOR has been localized only in the uterine luminal epithelium cells of the pregnant mouse (17) and in endometriosis stromal cells (18–20). It has been reported that specific agonists for KOR bind to epithelial and stromal primary endometrial cell cultures (14, 21).

The presence of all the compounds of the opioid system in the endometrium denotes a role of this system in any of the processes holding the endometrium. On the one hand, it has been described that dynorphin, via KOR, may participate in the apoptotic processes related to endometrial tissue remodeling during early pregnancy or menstruation (21). On the other hand, it is known that estrogens and glucocorticoids suppress the secretion of endometrial β -endorphin, while the secretion of dynorphin is induced by GnRH, and that type-specific regulation of endometrial opioids suggests that each type of opioid peptide possesses a quite distinct physiological role within the uterine cavity (9). Regarding the possible role of the opioid system in implantation, it has been hypothesized that some peptides coming from PENK could locally modulate the immune response since the mRNA of PENK was dramatically increased in the vicinity of the implantation site of the pregnant mouse uterus (12). Finally, the absence of β -endorphin and met-enkephalin in the uterine fluid of postmenopausal women but the presence of both peptides during the menstrual cycle (with higher concentrations in the secretory phase than in the proliferative phase due perhaps to the stimulation by gonadal steroids) suggests a role for opioids during the menstrual cycle (15, 22). Moreover, the transient expression of KOR and MOR and the presence of PENK in the mouse myometrium could regulate the myometrial contractibility (17).

As can be seen, there is evidence to suggest that the opioid system is involved in some endometrial functions, but from our point of view there is a gap in the field, since to date there is no detailed study about MOR in the mammalian endometrium during the menstrual cycle. Therefore, the aim of the present study was to analyze the dynamics of the expression of the MOR gene and protein, as well as the localization of MOR, in human endometrium throughout the menstrual cycle.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all participants at the time of tissue collection, and ethical approval was

provided by the Clinic Research Ethics Committee of the Basque Health System in the Cruces University Hospital (ethics approval no. CEIC EI4/36, 02/2015).

Human Endometrial Tissues

Endometrial tissues for this study were obtained by endometrial biopsy from 86 women ages 22–39 years with regular menstrual cycles (25–35 days) who had not undergone hormone treatment in the previous 3 months. Samples were collected from patients using a Cornier pipelle (Laboratoires CCD). All the participants were patients from the Human Reproduction Unit of the Cruces University Hospital, fulfilling the following criteria: normal uterine vaginal ultrasound; absence of endometriosis, polycystic ovary syndrome, implantation failure, or recurrent miscarriage; and no history of opioid drug use. Prophylactic antibiotics were not used. There was no case of infection or other side effects. Endometrial dating was determined histologically by an experienced pathologist (L.A.) according to the criteria of Noyes et al. (23).

These samples were categorized in groups for the different menstrual cycle phases: phase I, menstrual (days 1–5, $n = 4$); phase II, early to midproliferative (days 6–10, $n = 7$); phase III, late proliferative to early secretory (days 11–19, $n = 9$); phase IV, midsecretory (days 20–24, $n = 7$); and phase V, late secretory (days 25–28+, $n = 8$). Collected tissues were either snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for protein and mRNA extraction or fixed in buffered formalin (pH 7.4) and processed to paraffin wax blocks for immunohistochemistry (IHC).

Reverse Transcription

RNA from endometrial tissue (obtained from some samples of each stage) and cerebral cortex (positive control) were isolated with the RNasy mRNA Purification Kit (Ambion). The procedure for obtaining the cDNA was performed with ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Briefly, about 150 ng of RNA and random primers was heated at 65°C for 10 minutes and chilled on ice for 5 minutes. Then, after adding the reverse transcription mix, the mixture was annealed at 25°C for 5 minutes. A first-strand synthesis reaction was carried out at 55°C for 60 minutes, and the reverse transcriptase was inactivated at 70°C for 15 minutes.

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) Analysis

Real-time quantitative reverse transcriptase (RT)-PCR was performed on 29 endometrial samples throughout the menstrual cycle; phase I ($n = 5$), phase II ($n = 9$), phase III ($n = 3$), phase IV ($n = 6$), and phase V ($n = 6$). Quantitative PCR was performed in three replicates with the StepOne thermocycler using a TaqMan assay (Applied Biosystems), specifically designed for recognizing MOR (Hs01053957_m1). The thermal profile for this PCR consisted of a "holding stage" of 20 seconds at 95°C and 40 cycles with two steps: 1 second at 95°C and 20 seconds at 60°C . We used GAPDH

(Hs99999903_m1) as the endogenous control gene. The quantitative amount of mRNA in each sample was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method using GAPDH as the reference gene. The average ΔC_T of the cortex samples was used as the calibrator.

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)/PAGE and Immunoblotting

For the immunoblotting the following endometrial samples were used: from phase I, $n = 3$; phase II, $n = 5$; phase III, $n = 4$; phase IV, $n = 4$; and phase V, $n = 6$. The endometrial tissue and human cerebral cortex were processed as described elsewhere (24), and the membrane fraction was collected in the SDS sample buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue). The sample of human brain cortex was kindly donated by Dr. Leyre Urigüen (University of the Basque Country, Leioa, Basque Country).

Proteins were heated at 100°C for 5 minutes and were loaded onto 12% resolving gels and separated by one-dimensional SDS/PAGE (20–30 μ g of endometrial tissue per lane; gray matter of the human prefrontal cerebral cortex, 30 μ g). Proteins were then transferred to PVDF membranes (Amersham Biosciences), using the Mini Trans-Blot electrophoretic transfer system (Bio-Rad Laboratories). Blotted membranes were incubated with a primary polyclonal rabbit anti-MOR antiserum (1:2,500; Chemicon International) overnight at 4°C. The antibody was validated in a previous study by our research group (25, 26). The membrane was incubated for 2 hours at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Affinity BioReagents) diluted 1:2,500. Immunocomplexes were detected using enhanced chemiluminescence in a Chemi Doc system (Bio-Rad). To calculate the molecular weight of each band, the software Quantity One was used. To measure the changes along the menstrual cycle, results were normalized with the positive control ACTB (1:10,000; Sigma-Aldrich).

IHC

Samples (phase I, $n = 4$; phase II, $n = 7$; phase III, $n = 9$; phase IV, $n = 7$; and phase V, $n = 8$) were fixed in 4% neutral buffered formalin (pH 7.4) for 24–48 hours and stored in ethanol 70% until they were embedded in paraffin wax, and 4- μ m sections were obtained with a Shandon AS 325 retraction microtome. For preliminary assessment of morphology, sections were stained with hematoxylin and eosin. On the basis on this assessment, samples were dated and grouped in one of the above described five phases.

Following deparaffination and rehydration, sections were microwave heated in citrate buffer (10 mM, pH 6) for 10 minutes for the antigen retrieval. Afterwards sections were incubated with 0.3% H_2O_2 in methanol (30 minutes) to block the endogenous peroxidase activity and with normal goat serum in PBS-0.1% Triton \times 100 (10 minutes) to block nonspecific binding. Sections were then incubated in anti-MOR (Abcam; 1:1,200, overnight, 4°C) followed by the biotinylated anti-rabbit (1 hour) used as the secondary antibody in conjunction with the Vectastain H Elite ABC kit (Vector Laboratories).

Immunostaining was visualized with Vector nova red (Vector Laboratories; ± 1 minute). Slices were dehydrated and mounted with Vectamount (Vector Laboratories). Negative controls were performed by omitting the primary antibody before addition of the secondary antibody.

All images were examined and captured using Olympus BX50 optical microscopy (Olympus Optical Co.) connected to a digital color camera (Olympus XC50).

Evaluation of protein staining intensity and distribution was assessed using the semiquantitative histological score (HSCORE) system (27) and Digital-HSCORE, modified from Fuhrich et al. (28). Briefly, for the manual HSCORE, the whole sample was analyzed under 100 \times magnification and the following formula was used: $HSCORE = \sum Pi \times (i + 1)$, where i is the intensity of staining and P_i the percentage of stained cells with this intensity. The staining intensity was classified by three independent observers into four arbitrary categories: no labeling (0), weak (1), moderate (2), and strong (3). The D-HSCORE was performed using the image J software, as described elsewhere (28), but values of the arbitrary categories mentioned above in the range of color intensity (0–255) were established by three independent viewers (0: 255–235, 1: 234–174, 2: 113–173, 3: 112–0).

Low intraobserver ($r = 0.983$; $P < .0001$) and interobserver ($r = 0.994$; $P < .0001$) differences for HSCORE in uterine tissues have been previously reported using this technique (27).

Data Analysis

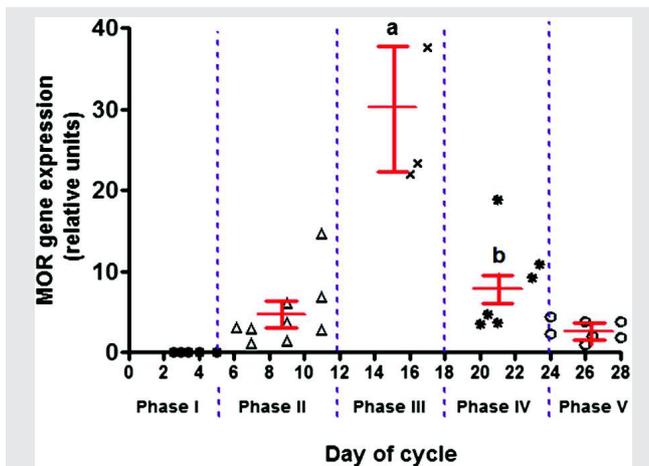
To study the changes of the MOR receptor throughout the menstrual cycle, Graph Pad Prism 5 program was used. All the results were pooled by above-mentioned menstrual cycle phases (phase I, phase II, phase III, phase IV, and phase V). The mRNA and protein expression was performed using the mean \pm SEM for the one-way analysis of variance (ANOVA) tests. The post hoc test was Bonferroni. Immunohistochemical expression of MOR was analyzed with two-way ANOVA, considering the different compartments (luminal epithelium, glands, endothelium, and stroma) and different phases of the menstrual cycle. Bonferroni was used as a post hoc test. Significance was set at $P < .05$.

RESULTS

Dynamics of MOR mRNA Expression in Human Endometrium during the Menstrual Cycle

There was no expression of MOR mRNA during the first days of the menstrual cycle (phase I), but, during the proliferative phase (phase II), the expression of MOR mRNA increased until the maximal MOR mRNA expression was observed during the late-proliferative phase (phase III). When the cycle continued to the secretory phase (phase IV), the expression of MOR mRNA decreased until almost the minimum in the last days of the cycle (phase V). The expression of MOR in phase III was significantly different in comparison with all other phases; moreover, the expression of MOR in phase I was significantly different ($P < .01$) in comparison with the expression in phase IV (Fig. 1).

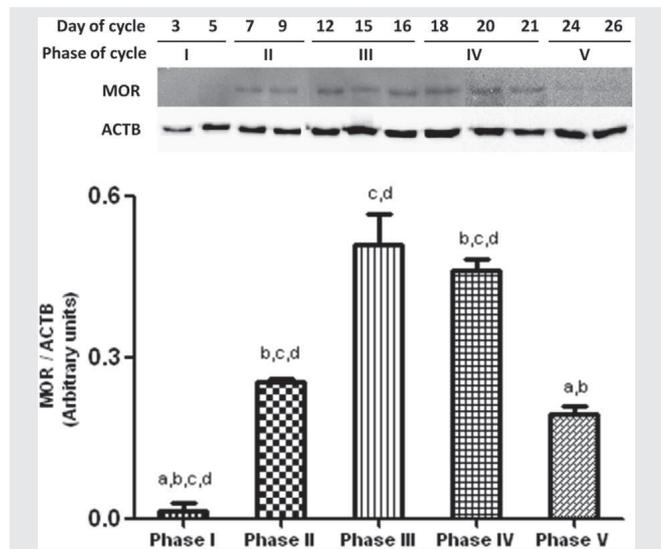
FIGURE 1



Expression values of MOR in human endometrium throughout the menstrual cycle by quantitative RT-PCR. Phase I: menstrual phase (days 1–5); phase II: early- and midproliferative phase (days 6–11); phase III: late-proliferative and early-secretory phase (days 12–17); phase IV: midsecretory phase (days 18–23); phase V: late-secretory phase (days 24–28). The quantitative amount of mRNA in each sample was determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using GAPDH as the reference gene. The average ΔCt of the cortex samples was used as the calibrator. Each data point in the graph belongs to one sample, and the mean \pm SEM for each phase is shown in red. Significant differences between phases are indicated with different letters. ^a $P < .05$ vs. all other phases. ^b $P < .05$ vs. phase I.

Totorikaguena. MOR in human endometrium. *Fertil Steril* 2017.

FIGURE 2



Expression of MOR in human endometrium throughout the menstrual cycle by Western blot. Phase I: menstrual phase (days 1–5); phase II: early- and mid-proliferative phase (days 6–11); phase III: late-proliferative and early-secretory phase (days 12–17); phase IV: mid-secretory phase (days 18–23); phase V: late-secretory phase (days 24–28). To determine MOR protein abundance, the same extracts were reblotted with anti-ACTB. The histogram shows the MOR expression mean \pm SEM of three different experiments corrected by ACTB content. Significant differences between phases are indicated with different letters; $P < .01$ in all cases. Representative Western blot is shown.

Totorikaguena. MOR in human endometrium. *Fertil Steril* 2017.

Dynamics of MOR Protein Expression in Human Endometrium during the Menstrual Cycle

Figure 2 shows representative Western blot using human endometrium at different days of the cycle. The anti-MOR polyclonal antiserum labeled a band at about 70 kDa in endometrial tissue protein extracts, and we detected a band at about 42 kDa using anti-ACTB antiserum. The expression of MOR protein was almost zero during the first days of the menstrual cycle (phase I), but, during the proliferative phase (phase II), the immunodetection of MOR was significantly increased, reaching a peak around the late-proliferative and early-secretory phase (phase III). After that phase, in the mid-secretory phase (phase IV), the immunodetection of MOR decreased significantly ($P < .01$), until it reached, in phase V, almost the value of the first phase.

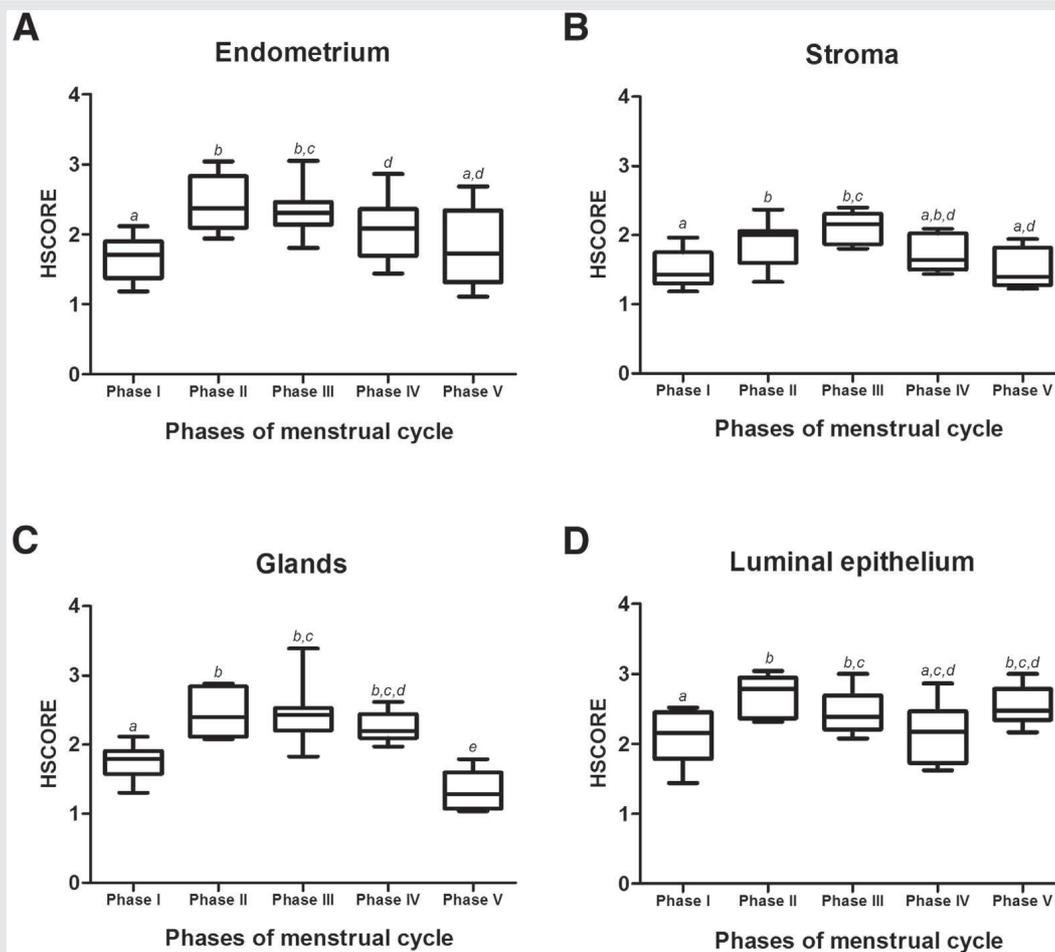
MOR Immunoreactivity in Human Endometrium: Histomorphometric Analyses

Specific endometrial MOR staining was observed in all phases of the menstrual cycle (Fig. 3A). The lowest immunolabeling was detected both in the menstrual phase (phase I) and in the days before this phase, that is, in the late secretory phase (phase V). After the menstrual period, the expression of the protein increased significantly ($P < .001$, phase I vs. phase II), and MOR protein immunoreaction showed high intensity during the proliferative phase. The most intense staining was present in the days near the ovulation (late proliferative

to early secretory phases or phase III). Afterwards, in the secretory period, the immunolabeling intensity decreases until it reaches the values observed in the menstrual phase. In fact, the menstrual phase immunolabeling values show significance ($P < .01$) between all the phases except the late secretory one.

All the studied endometrial regions (stroma, glands, and luminal epithelium; Fig. 3B, 3C, and 3D) were stained during the menstrual cycle, and the immunoreactive pattern that was shown for the whole endometrial tissue was maintained for all the studied areas, with some variations among them. In the stromal compartment (Fig. 3B), the staining increased significantly after menstrual period, during the proliferative phase, reaching a nadir in the late-proliferative to early-secretory period ($P < .01$ between phase I and phase II and $P < .001$ between phase I and phase III). From that moment, it showed a significant decline ($P < .01$ from phase III to IV and $P < .001$ from phase III to V). In the glands the maximum levels were reached already in the early proliferative (phase II) and maintained until the midsecretory phase (phase IV; Fig. 3C). From this moment, the staining was reduced significantly ($P < .001$), reaching the lowest observed values in the late secretory phase (phase V). It is interesting to remark how in the late secretory phase the expression of the MOR protein decrease is also significant with respect to the values found in the menstrual phase ($P < .01$). Analyzing the luminal epithelium

FIGURE 3



HSCORE values representing the immunoreactivity intensity of MOR protein staining in the whole endometrium (A), the stromal compartment (B), the epithelial glands (C), and the luminal surface of the endometrium (D). Box and whisker plots representing median, interquartile range, and minima/maxima for phase I: menstrual phase (days 1–5; $n = 4$); phase II: early- and mid-proliferative phase (days 6–11; $n = 7$); phase III: late-proliferative and early-secretory phase (days 12–17; $n = 9$); phase IV: midsecretory phase (days 18–23; $n = 7$); and phase V: late-secretory phase (days 24–28; $n = 8$). The different combinations of letters indicate significant differences between phases; $P < .01$ in all cases.

Totorikaguena. MOR in human endometrium. *Fertil Steril* 2017.

(Fig. 3D), it can be observed that protein concentration was enhanced after menstruation, reaching maximum values at the early-proliferative phase ($P < .001$). Afterward, the decrease started ($P < .01$ between phases II and IV), but from midsecretory to late secretory a new increase was observed, showing a different trend compared with the other compartments.

Immunohistochemical Localization of MOR in Human Endometrium

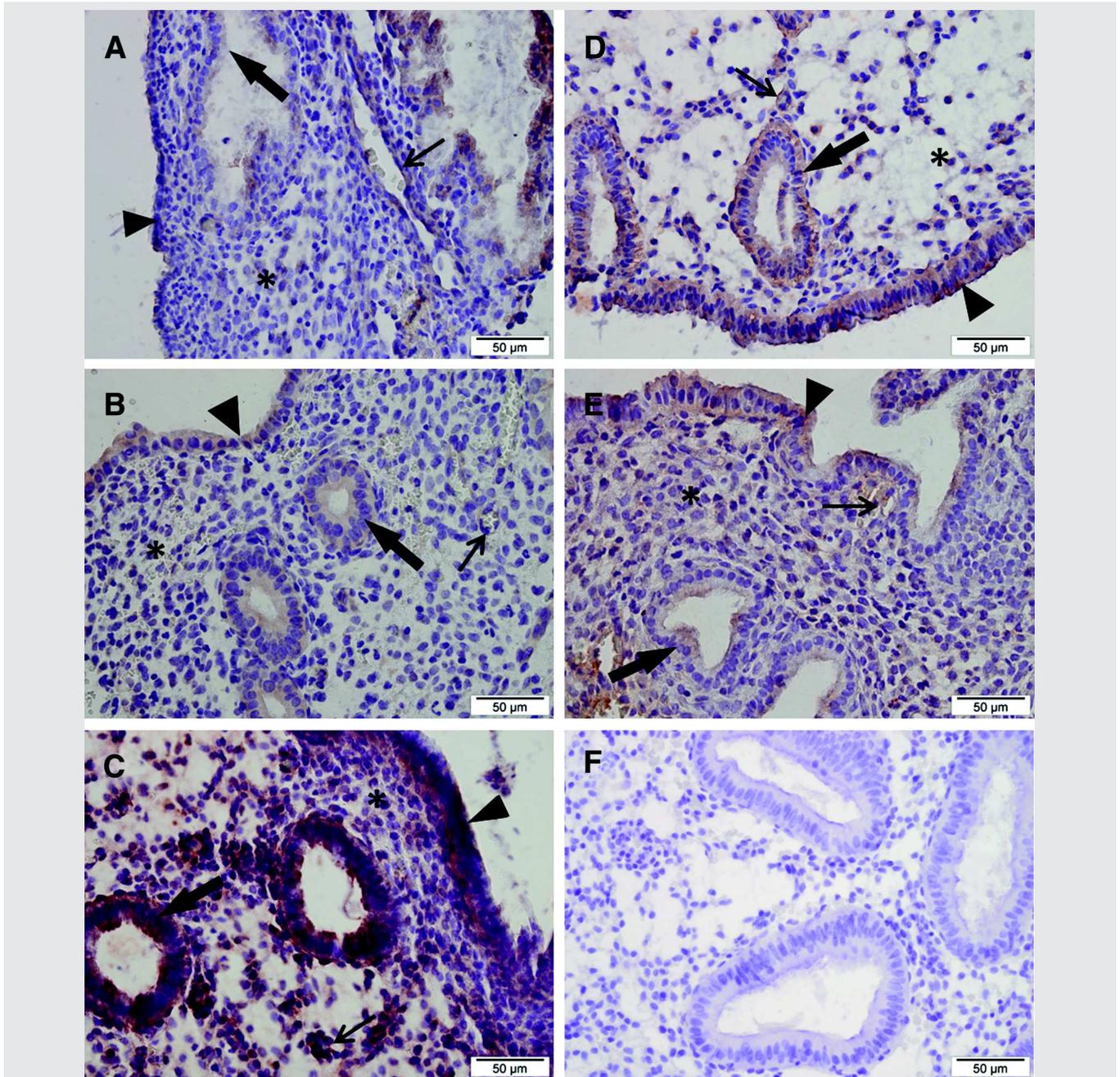
Figure 4 shows MOR distribution in the different menstrual cycle phases of the human endometrium.

Phase I. MOR expression in the menstrual endometrium (Fig. 4A): glands (arrows) and stroma (asterisk) near the basalis undergo collapse as the superficial tissue sloughs. Glands have tortuous shapes. MOR expression is weak, but it is a little bit more intense in the epithelial cells of the luminal surface of

the endometrium (arrowheads) and gland epithelium (arrows). Epithelial expression is stronger in the apical region of the cells. In the glandular epithelium a light staining of some of the cells can also be observed. Most of the cells of the stromal compartment have no MOR protein expression, but those in which the staining appeared show higher intensity than the glandular ones.

Phase II. MOR expression in the early to midproliferative endometrium (Fig. 4B): glands are small and tubular, both epithelium and stroma are regenerating, and it is usual to see mitotic activity. MOR expression is weak, but it is stronger in the epithelium: in the luminal surface of the endometrium, gland epithelium (arrows), and endothelium (thin arrows). MOR expression in the gland epithelium appears in the apical and basal region of the cells. The stromal compartment labeling reaches higher values than in the previous phase, but the increase is still higher in epithelia.

FIGURE 4



MOR localization in human endometrium during the menstrual cycle. Representative pictures of immunostaining with MOR antibody at menstrual phase, phase I (day 1, **A**); early- to midproliferative phase, phase II (day 6, **B**); late-proliferative to early-secretory phase, phase III (day 14, **C**); midsecretory phase, phase IV (day 20, **D**), and late-secretory phase, phase V (day 28, **E**). MOR immunoreactivity varies during the cycle in all endometrium compartments: epithelial gland cells (*arrows*), luminal epithelium (*arrowheads*), stroma (*asterisk*), and endothelium (*thin arrows*). (**F**) Day 14. Negative control by omitting the primary antibody before addition of the secondary antibody. Scale bar, 50 μ m.

Totorikaguena. MOR in human endometrium. *Fertil Steril* 2017.

Phase III. MOR expression in the late-proliferative to early-secretory endometrium (Fig. 4C): glands are tortuous with pseudostratified nuclei and sometimes subnuclear cytoplasmic vacuoles. Stroma is rather dense, fundamentally around the vessels, and shows moderate growth; small spiral arteries and thin-walled venules are present. MOR expression is very intense in the epithelial cells both in the luminal

surface and glands. We can observe how some cells were deeply stained near the apical membrane, while others show stronger staining in the basal layer (we did not find immunostaining in the nucleus of the cells; Supplemental Fig. 1). Nevertheless, in this phase, the staining in the epithelia does not seem to be higher, and in the luminal epithelium we can also appreciate a decrease compared with the previous phase.

The endothelium is still highly stained. The stroma region around vessels has also strong staining, and it reaches its maximum MOR protein expression levels during the late-proliferative phase, near the ovulation days.

Phase IV. MOR expression in the midsecretory phase (Fig. 4D): glands now are even more tortuous and show intraluminal secretion. Basal vacuoles move to the apical region, and now nuclei are basally oriented. Stroma shows edema, which will be maximal at days 21–22. MOR immunoreactivity is quite intense at the epithelial cells and shows staining at the apical and basal region of the epithelial gland cells (arrows). Endothelium (thin arrows) and stroma also show MOR immunoreactivity.

Phase V. MOR expression in the late secretory phase (Fig. 4E): after the 20th day of the cycle, the stroma changes are more evident; nonetheless, the glands become more prominent. Predecidual stromal change is now evident around spiral arteries, with many interspersed leukocytes. MOR immunoreactivity is less intense at the gland epithelial cells and shows staining at the apical region fundamentally (arrows). The luminal epithelium maintains intense staining. In the stroma, immunoreactivity is less intense, but endothelium staining is maintained (thin arrows).

DISCUSSION

The presence of the endogenous opioid system (opioid peptides, their precursors and receptors) in the mammalian endometrium was described a few years ago, and since then, a number of physiological roles have been suggested (7). With our present work, we have elucidated that MOR is expressed in human endometrium, not only at the mRNA level but also at the protein level, and, moreover, we have checked how the dynamics of expression and localization of MOR changes throughout the menstrual cycle in a coordinated way in each region of the endometrium (luminal epithelium, glands, and stroma).

To date, the unique evidence about the presence of MOR in the human endometrium has been produced in two works focused on endometriosis where the authors speak about the expression of MOR mRNA on eutopic endometrial stromal cells (18, 19). Our data confirm that the mRNA of MOR is present in human endometrium, but we have also seen how that expression follows a cycle-dependent pattern where mRNA is absent in the first days of the menstrual cycle, increases its expression during the early proliferative phase to reach a maximum at the late-proliferative phase and after, and decreases again until almost its minimum levels throughout the secretory phase. This fact could explain why in previous works performed with eutopic endometrium some patients did not show expression of MOR (18, 19), since the investigators only differentiated the patients' endometrium between the proliferative and secretory phases without taking into account the day of the cycle, while important changes are detected within these two phases. In the present work, we also have validated the expression pattern of mRNA by the immunodetection of the MOR protein, which showed a very similar pattern to that of mRNA using Western blot and IHC.

Our findings strongly contradict the widely accepted idea that MOR is not present in human endometrium, based on a study on Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cells (16). However, the aforementioned work did not include any experiment with normal endometrial cells. So, from our point of view, in comparing our data with those of that article, two hypotheses could be made: Ishikawa cells have the phenotype of endometrial cells at the beginning or the end of menstrual cycle or MOR certainly disappears in endometrial adenocarcinoma. In any case, it seems that the use of the Ishikawa cells would not be the best option to extrapolate the results obtained from a healthy endometrial tissue model for MOR.

The cyclic upregulation and downregulation observed on MOR lead us to hypothesize that MOR has a defined role throughout the menstrual cycle but especially during the period from the midproliferative to the midsecretory phase, where the expression of MOR is the largest of the entire cycle. That idea is reinforced with the data of the works that measured the presence of EOP in endometrium: in one work, β -endorphin was not detected in the human endometrium in the proliferative phase, while it appeared in secretory phase (22). In another work, the investigators did not find many differences during the cycle in β -endorphin levels, but instead they detected significantly higher concentrations of met-enkephalin in human uterine fluid during the secretory phase in comparison with the proliferative phase, and, additionally, the concentration of met-enkephalin in the uterine fluid in superovulated cows was higher than that in control cows (15). Moreover, as would be expected, it has been described that the transcript of the precursor of met-enkephalin (PENK) increased in the proliferative phase and decreased in the secretory phase of primate and human endometrium (10, 13). Thus, it seems that in the postovulatory period, the endometrium may secrete high levels of met-enkephalin and maybe β -endorphin and that the existence of MOR could be necessary for the function of those peptides. In addition, it has been hypothesized that those peptide-level changes in the cycle could be regulated by steroid hormones. In this sense the influence of gonadal steroids on the synthesis and secretion of opioid peptides in the endometrium (15) has been suggested, and it has been also proposed that P could induce the synthesis of opioid peptides in endometrial glandular cells (22). Otherwise, the absence of β -endorphin and met-enkephalin in the uterine fluid of postmenopausal women and the recovering of EOP levels after a steroid replacement (15) make clear the important role of the opioid system during the menstrual cycle and the necessity of the hormonal regulation of this system for it to work. Even so, a reduction in endogenous opioid tone as a trigger for initiating the LH surge in proestrus rats has been also proposed (5, 29).

Although the expression pattern of mRNA and the immunodetection of the MOR protein using Western blot and IHC for the whole endometrium showed a very similar pattern, there are some differences regarding the localization of the receptor in different compartments of the endometrial biopsies. The stromal compartment is the most representative area, and the expression of MOR follows the same pattern as that of the whole endometrium, increasing during the proliferative phase and decreasing in the mid-late secretory phases, but, for example, the expression pattern of MOR

in luminal epithelium shows a new rise in the late-secretory phase. It will be interesting to check where exactly the expression of MOR increases during the proliferative phase because it seems that this event is essential to inhibiting the inflammatory process occurring during menstruation, via inhibition of cAMP (30). This kind of regulation has been described in other communication systems of endometrium, some of them very related to the opioid system as, for example, the cannabinoid system (31).

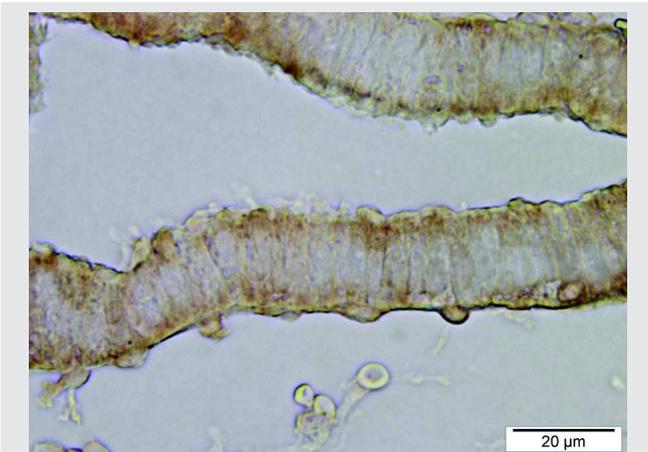
In conclusion, our data indicate that MOR is expressed in human endometrium and that its expression pattern changes during the menstrual cycle in a different manner in all the studied endometrial compartments. These findings suggest that MOR could have several functions in the complex remodeling process that endometrium undergoes every month and, therefore, in early events of reproduction. Even so, as the MOR knockout mice are able to have offspring (32), it will be interesting to elucidate what is the real role of MOR in reproduction events since this issue has been not studied in depth to date.

Acknowledgments: The authors thank Leire Andrés (Cruces University Hospital) for help in the discussion on endometrial histology.

REFERENCES

- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Ann Rev Biochem* 2004;73:953–90.
- Fabrizi A, Jannini EA, Gnessi L, Ulisse S, Moretti C, Isidori A. Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J Steroid Biochem* 1989;32:145–50.
- Mehmanesh H, Almeida OF, Nikolarakis KE, Herz A. Hypothalamic LH-RH release after acute and chronic treatment with morphine studied in a combined *in vivo/in vitro* model. *Brain Res* 1988;45:69–76.
- Yilmaz B, Gilmore DP. Opioid modulation of hypothalamic catecholaminergic neurotransmission and the pre-ovulatory LH surge in the rat. *Neuro Endocrinol Lett* 1999;20:115–21.
- Kumru S, Simşek M, Yilmaz B, Sapmaz E, Kutlu S, Sandal S, et al. Differential regulation of preovulatory luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by opioids in the proestrous rat. *Physiol Res* 2001;50:397–403.
- Jin DF, Muffly KE, Okulicz WC, Kilpatrick DL. Estrous cycle- and pregnancy-related differences in expression of the proenkephalin and proopiomelanocortin genes in the ovary and uterus. *Endocrinology* 1988;122:1466–71.
- Zoumakis E, Margioris AN, Makrigiannakis A, Stourmaras C, Gravanis A. Human endometrium as a neuroendocrine tissue: expression, regulation and biological roles of endometrial corticotropin-releasing hormone (CRH) and opioid peptides. *J Endocrinol Invest* 1997;20:158–67.
- Makrigiannakis A, Margioris A, Markogiannakis E, Stourmaras C, Gravanis A. Steroid hormones regulate the release of immunoreactive beta-endorphin from the Ishikawa human endometrial cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:584–9.
- Gravanis A, Makrigiannakis A, Stourmaras C, Margioris AN. Interaction between steroid hormones and endometrial opioids. *Ann N Y Acad Sci* 1994;734:245–56.
- Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, et al. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003;9:19–33.
- Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Einspanier R, et al. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. *J Mol Endocrinol* 2005;34:889–908.
- Rosen H, Itin A, Schiff R, Keshet E. Local regulation within the female reproductive system and upon embryonic implantation: identification of cells expressing proenkephalin A. *Mol Endocrinol* 1990;4:146–54.
- Low KG, Nielsen CP, West NB, Douglass J, Brenner RM, Maslar IA, et al. Proenkephalin gene expression in the primate uterus: regulation by estradiol in the endometrium. *Mol Endocrinol* 1989;3:852–7.
- Chatzaki E, Margioris AN, Makrigiannakis A, Castanas E, Georgoulis V, Gravanis A. Kappa opioids and TGFbeta1 interact in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* 2000;6:602–9.
- Petraglia F, Facchinetti F, M'Futa K, Ruspa M, Bonavera JJ, Gandolfi F, et al. Endogenous opioid peptides in uterine fluid. *Fertil Steril* 1986;46:247–51.
- Hatzoglou A, Gravanis A, Margioris AN, Zoumakis E, Castanas E. Identification and characterization of opioid-binding sites present in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:418–23.
- Zhu Y, Pintar JE. Expression of opioid receptors and ligands in pregnant mouse uterus and placenta. *Biol Reprod* 1998;59:925–32.
- Matsuzaki S, Canis M, Vaur-Barrière C, Boespflug-Tanguy O, Dastugue B, Mage G. DNA microarray analysis of gene expression in eutopic endometrium from patients with deep endometriosis using laser capture microdissection. *Fertil Steril* 2005;84:1180–90.
- Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Botchorishvili R, Déchelotte PJ, Mage G. Differential expression of genes in eutopic and ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 2006;86:548–53.
- Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Botchorishvili R, Déchelotte PJ, Mage G. Both GnRH agonist and continuous oral progestin treatments reduce the expression of the tyrosine kinase receptor B and mu-opioid receptor in deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2007;22:124–8.
- Chatzaki E, Makrigiannakis A, Margioris AN, Kouimtzioglou E, Gravanis A. The Fas/FasL apoptotic pathway is involved in kappa-opioid-induced apoptosis of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2001;7:867–74.
- Wahlström T, Laatikainen T, Salminen K, Leppälou J. Immunoreactive beta-endorphin is demonstrable in the secretory but not in the proliferative endometrium. *Life Sci* 1985;36:987–90.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950;1:3–25.
- Peralta L, Agirregoitia E, Mendoza R, Expósito A, Casis L, Matorras R, et al. Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:372–9.
- Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subiran N, et al. Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4969–75.
- Agirregoitia E, Peralta L, Mendoza R, Expósito A, Ereño ED, Matorras R, et al. Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2012;24:550–7.
- Budwit-Novotny DA, McCarty KS, Cox EB, Soper JT, Mutch DG, Creasman WT, et al. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res* 1986;46:5419–25.
- Fuhrich DG, Lessey BA, Savaris RF. Comparison of HSCORE assessment of endometrial beta3 integrin subunit expression with digital HSCORE using computerized image analysis (ImageJ). *Anal Quant Cytopathol Histopathol* 2013;35:210–6.
- Allen LG, Kalra SP. Evidence that a decrease in opioid tone may evoke pre-ovulatory luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 1986;118:2375–81.
- Maybin JA, Critchley HO. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Hum Reprod Update* 2015;21:748–61.
- Scotchie JG, Savaris RF, Martin CE, Young SL. Endocannabinoid regulation in human endometrium across the menstrual cycle. *Reprod Sci* 2015;22:113–23.
- Cominski TP, Ansonoff MA, Turchin CE, Pintar JE. Loss of the mu opioid receptor induces strain-specific alterations in hippocampal neurogenesis and spatial learning. *Neuroscience* 2014;278:11–9.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1



High magnification picture of MOR immunolocalization in human endometrium. Scale bar, 20 μm .

Totorikaguena. MOR in human endometrium. Fertil Steril 2017.