

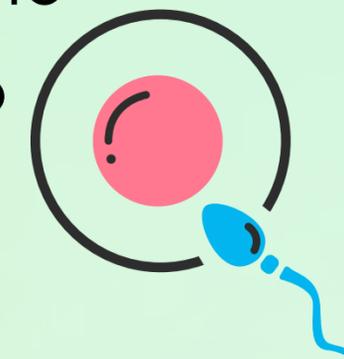


**UNIVERSITA' POLITECNICA
DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE
DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

Corso di laurea in: *SCIENZE
BIOLOGICHE*

EFFECTS OF DELTA-9 TETRAHYDROCANNABINOL ON OOCYTE COMPETENCE AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT

Effetti del Delta-9 Tetraidrocannabinolo
sulla Competenza dell'Oocita e sullo
Sviluppo Embrionale Precoce



Megan J. Misner, Afton Taborek, Justin Dufour, Lea Sharifi, Jibrán Y. Khokhar and Laura A. Favetta (2021)

Candidato: **Cristina D'Amelio**

Relatore: **Oliana Carnevali**

Anno accademico: **2020-2021**

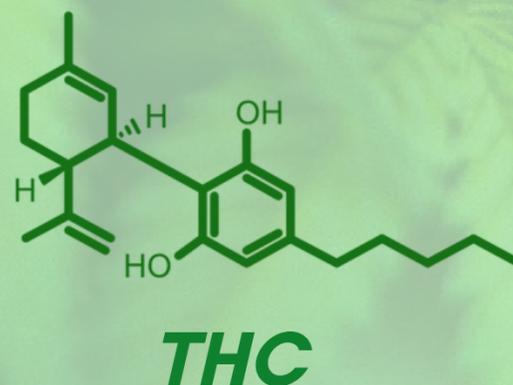
MATURAZIONE DELL'OOCITA

- Garantisce materiale all'oocita per avere successo nella fecondazione
- Garantisce materiale all'oocita per proseguire con lo sviluppo embrionale
- E' suscettibile di fattori esterni: dieta, esercizio fisico, fumo, alcol e consumo di

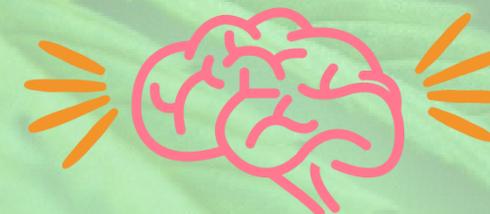
CANNABIS



- Consumo crescente in individui in età fertile (15-35 anni) e in donne in gravidanza
- Ricavata dalla pianta di *Cannabis sativa*
- Due principali componenti: **CANNABIDILOLO** e **DELTA-9 TETRAIDROCANNABINOLO (THC)**



EFFETTI PSICOATTIVI

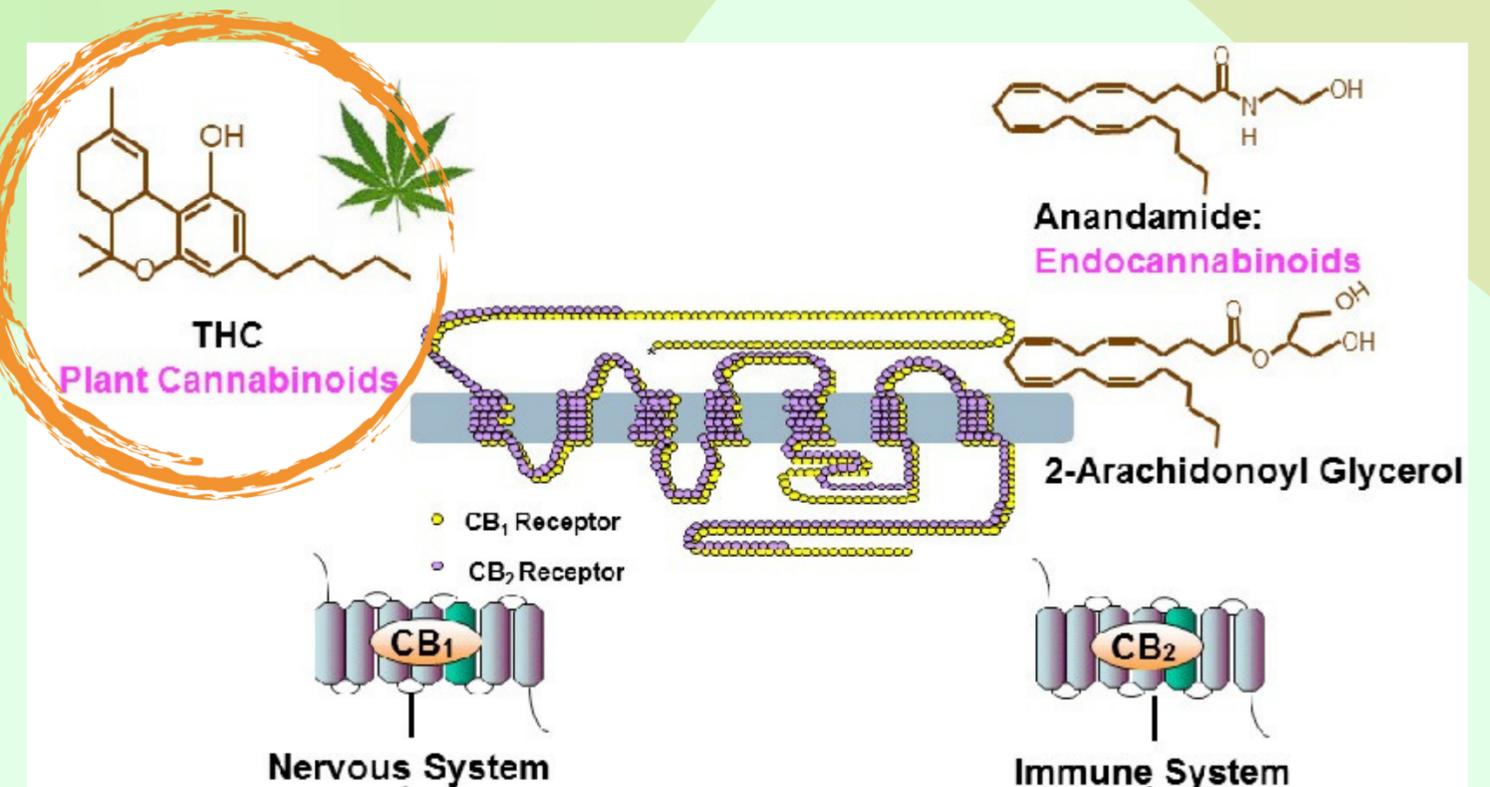


IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

- Responsabile dell'omeostasi del corpo
- Molecole segnale di natura lipidica: ***N-arachidonoiletanolammide*** o ***anandamide*** (AEA) e ***2-arachidonoilglicerolo*** (2-AG)
- Recettori 7 pass-transmembrane associati a proteine G:
 - ***CB1***, localizzato nel sistema nervoso e nei tessuti periferici, comprese ***ovaie*** e ***ovociti***
 - ***CB2***, localizzato a livello periferico e nel sistema immunitario

Il THC è in grado di legare i recettori
CB1 e CB2:

- Inattiva l'adenilato ciclasi
- Modifica la trascrizione genica
- Induce apoptosi



Il THC altera i processi riproduttivi:

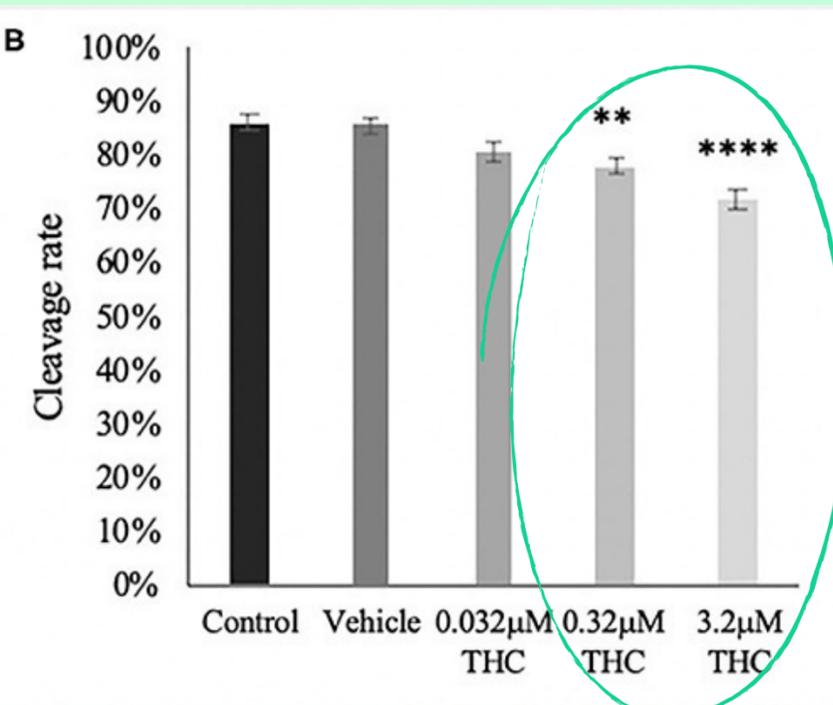
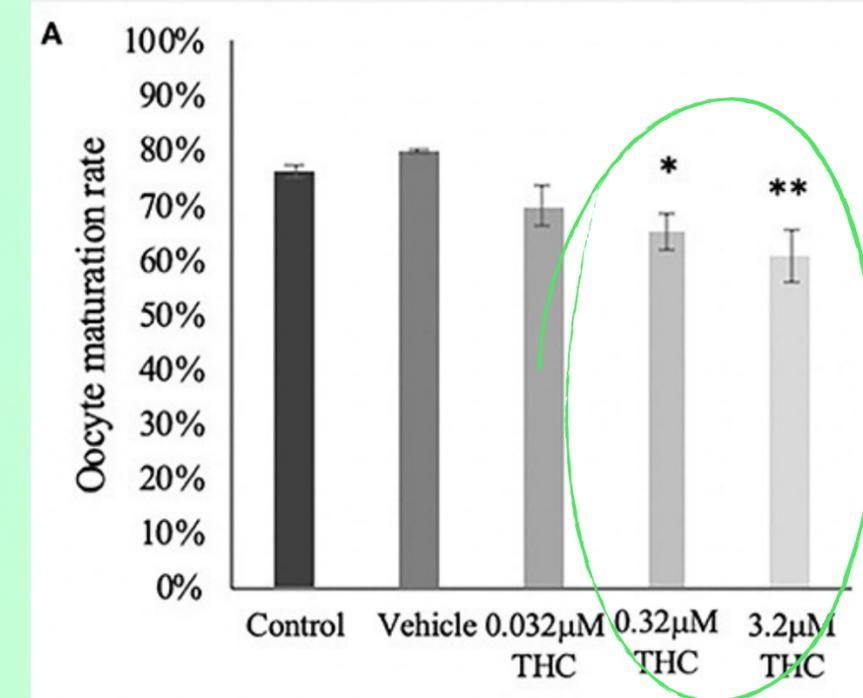
- ♀ Nelle donne causa **disturbi del ciclo mestruale, riduzione della maturazione dei follicoli e problemi di impianto dell'embrione nella riproduzione assistita;**
- ♂ Negli uomini causa **riduzione del numero di spermatozoi, riduzione della motilità degli spermatozoi e alterazioni morfologiche degli spermatozoi.**

Il seguente studio ha lo scopo di **determinare la qualità dell'oocita e dell'embrione e i parametri di sviluppo in assenza e in presenza di THC.**
Sono stati utilizzati ovociti di bovino, analoghi a quelli umani per dimensione e natura ovulatoria singola, suddivisi in 5 gruppi di trattamento:

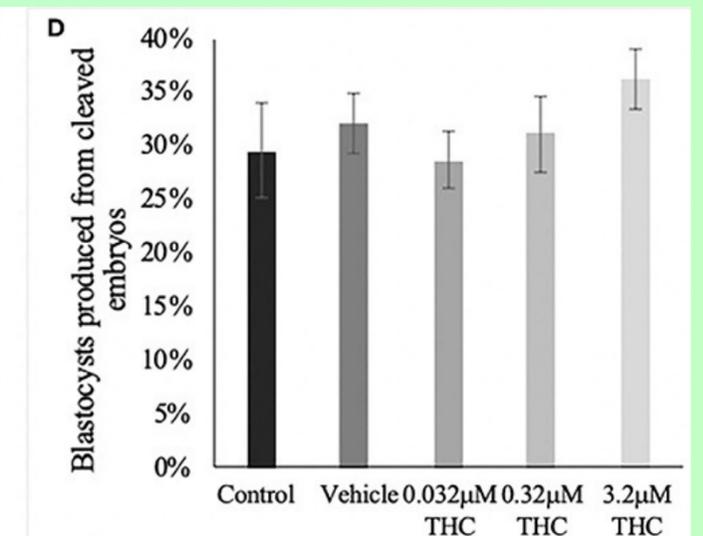
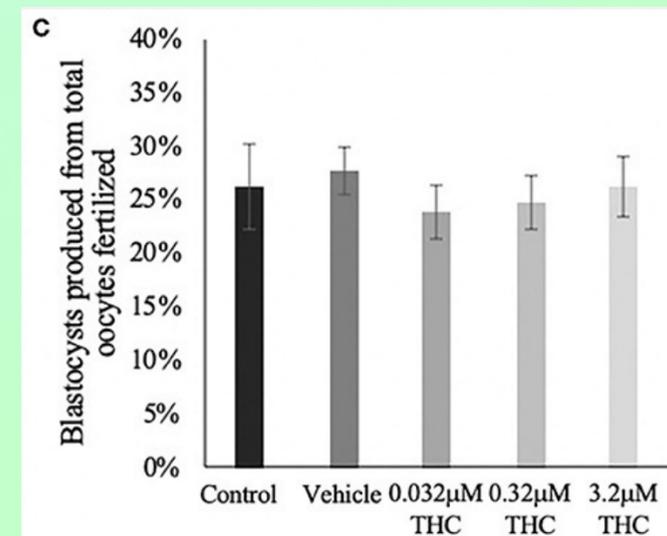
- CONTROLLO
- CONTROLLO DEL VEICOLO (3,2 μ M di 1:1:18 etanolo:tween20:buffer salino)
- THC TERAPEUTICO (0,032 μ M)
- THC RICREATIVO MEDIO (0,32 μ M)
- THC RICREATIVO ALTO (3,2 μ M)

ANALISI:

★ Tasso di maturazione degli ovociti: Misurato quando negli ovociti compare il primo globulo polare (metafase II). Si è visto che con *l'aumentare della dose di THC si ha una ridotta progressione alla fase MII -> CORRELAZIONE DOSE- DIPENDENTE NEGATIVA.*



★ Tasso di segmentazione: Valuta la percentuale di embrioni che raggiungono lo stadio a due cellule entro 48 h dalla fecondazione. Si è visto che con *l'aumentare della dose di THC il tasso di segmentazione diminuisce -> ANALOGO AL TASSO DI MATURAZIONE.*



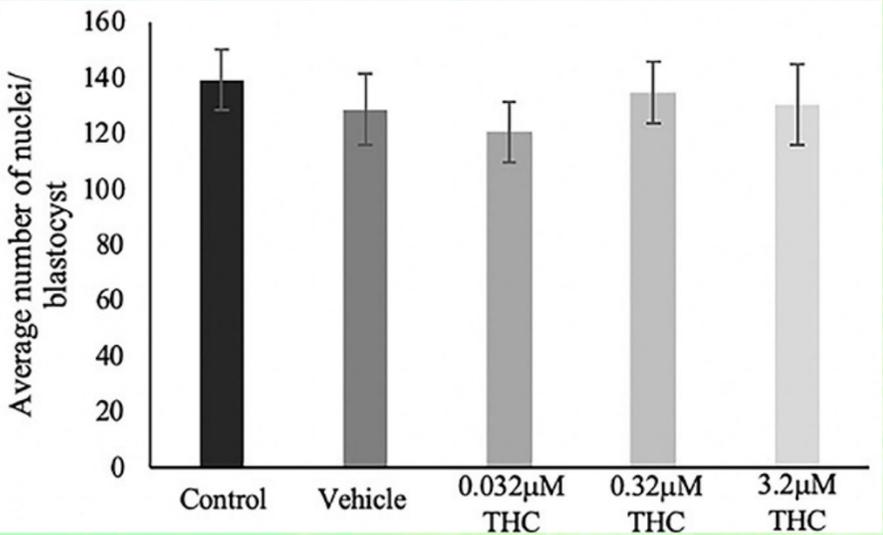
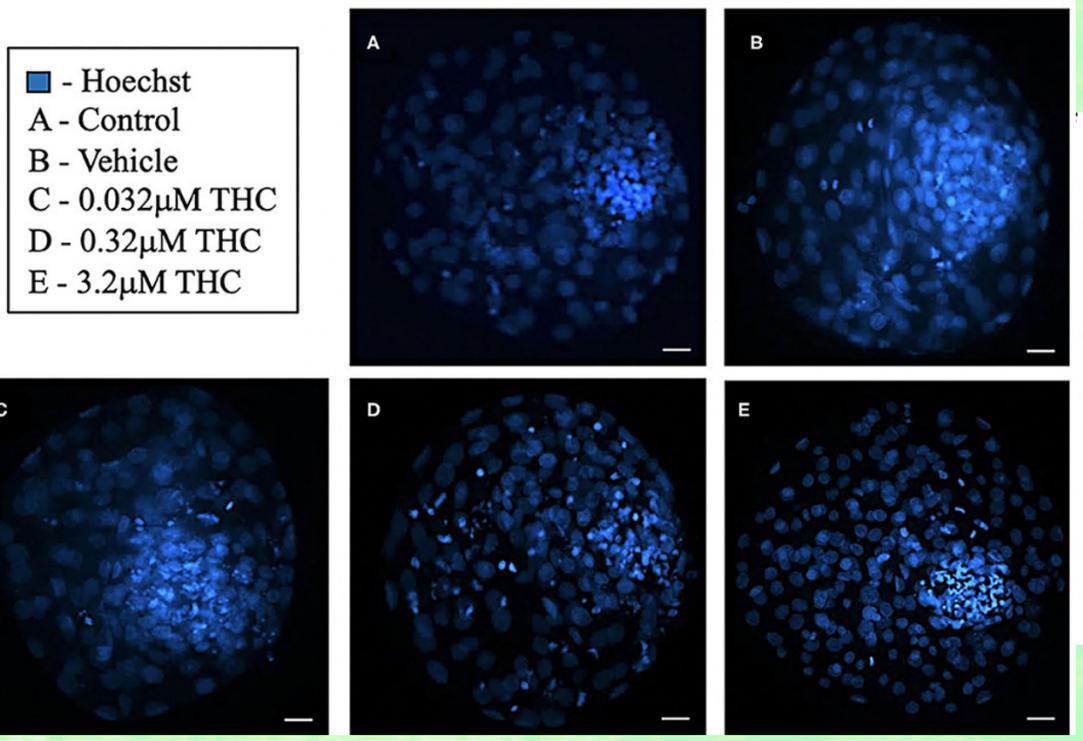
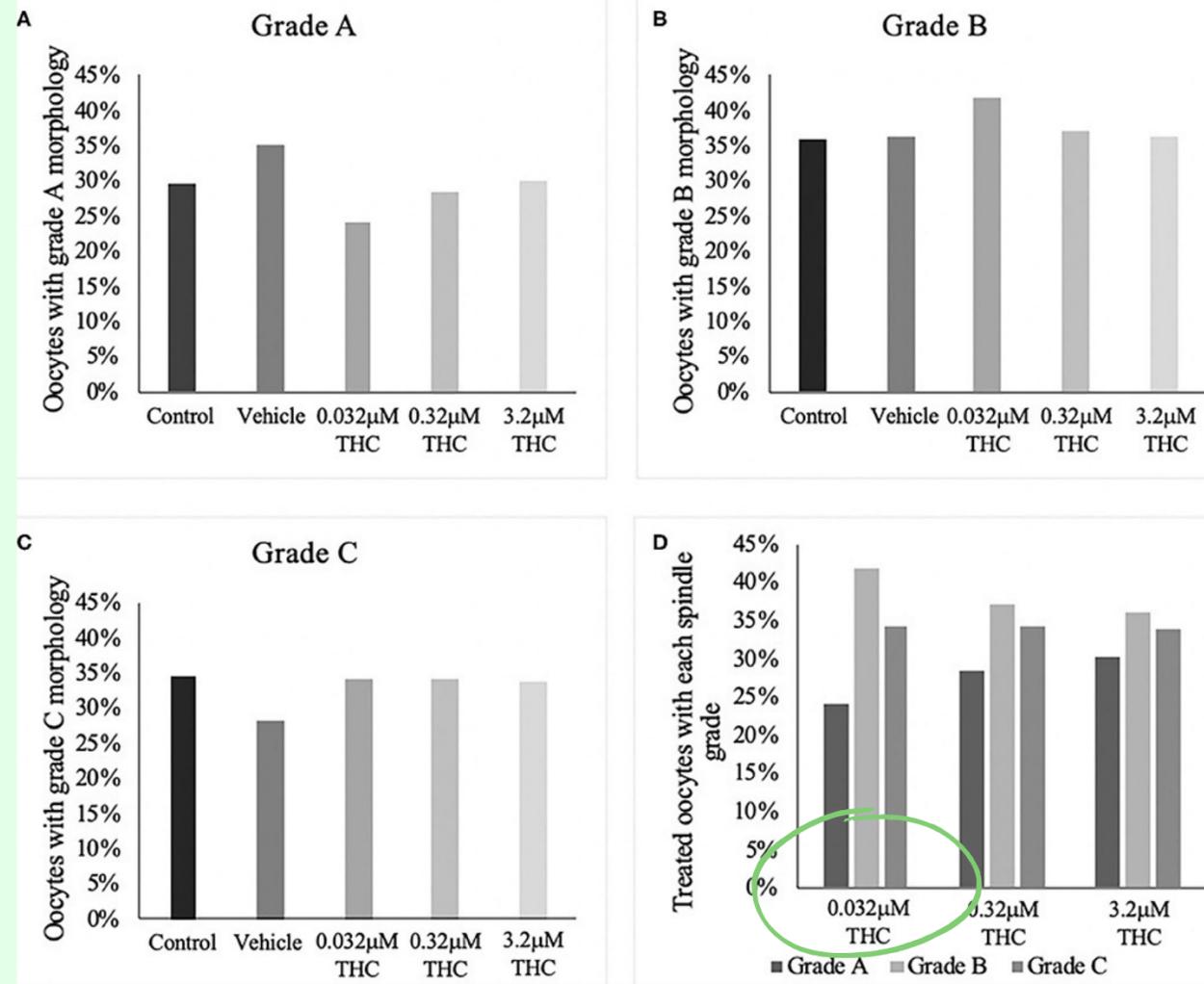
★ Tasso di blastocisti: Misurato al giorno 8 dopo la fecondazione. *Non sono state riscontrate differenze significative* nella velocità di sviluppo delle blastocisti in presenza di THC.

★ **Morfologia del fuso meiotico:** Analizzata tramite immunocitochimica sugli ovociti maturati in metafase II.

Gli ovociti sono stati suddivisi in:

- GRADO A: con cromosomi allineati e fuso organizzato;
- GRADO B: con cromosomi leggermente disallineati;
- GRADO C: con cromosomi non allineati e fuso disorganizzato.

Non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi di trattamento, tuttavia, il gruppo con basso THC (0,032µM) possiede la percentuale più bassa di ovociti di grado A -> **QUALITA' DEL FUSO PIU' BASSA.**



★ **Conteggio dei nuclei:** Eseguito manualmente sulle blastocisti dopo la colorazione con il colorante **HOECHST**. Non ha riportato differenze significative nel numero totale di cellule tra i gruppi di trattamento.

★ Colorazione differenziale:

Per il conteggio delle cellule nelle blastocisti.

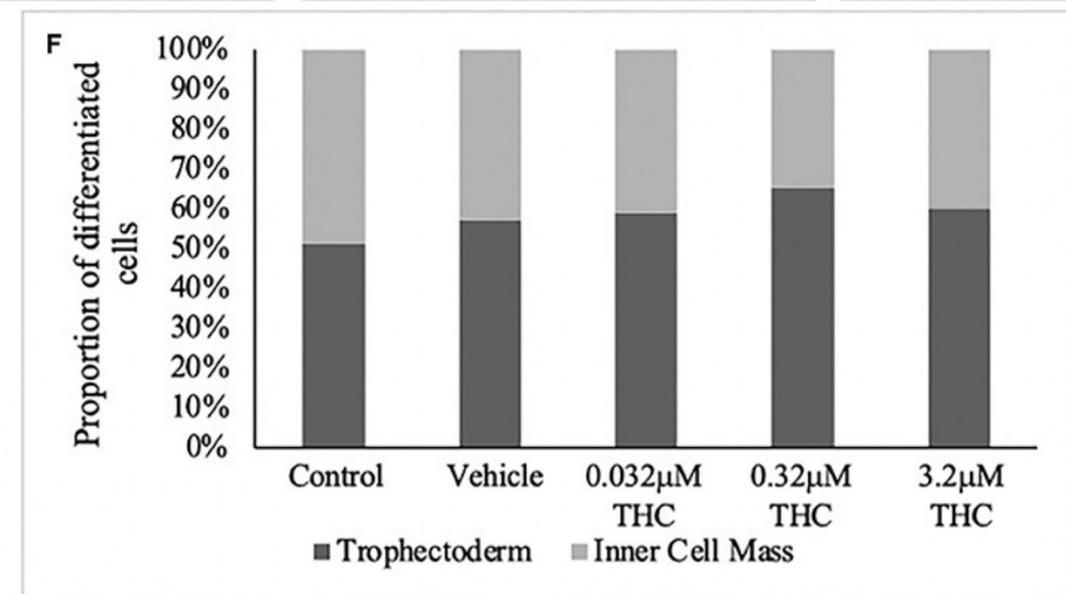
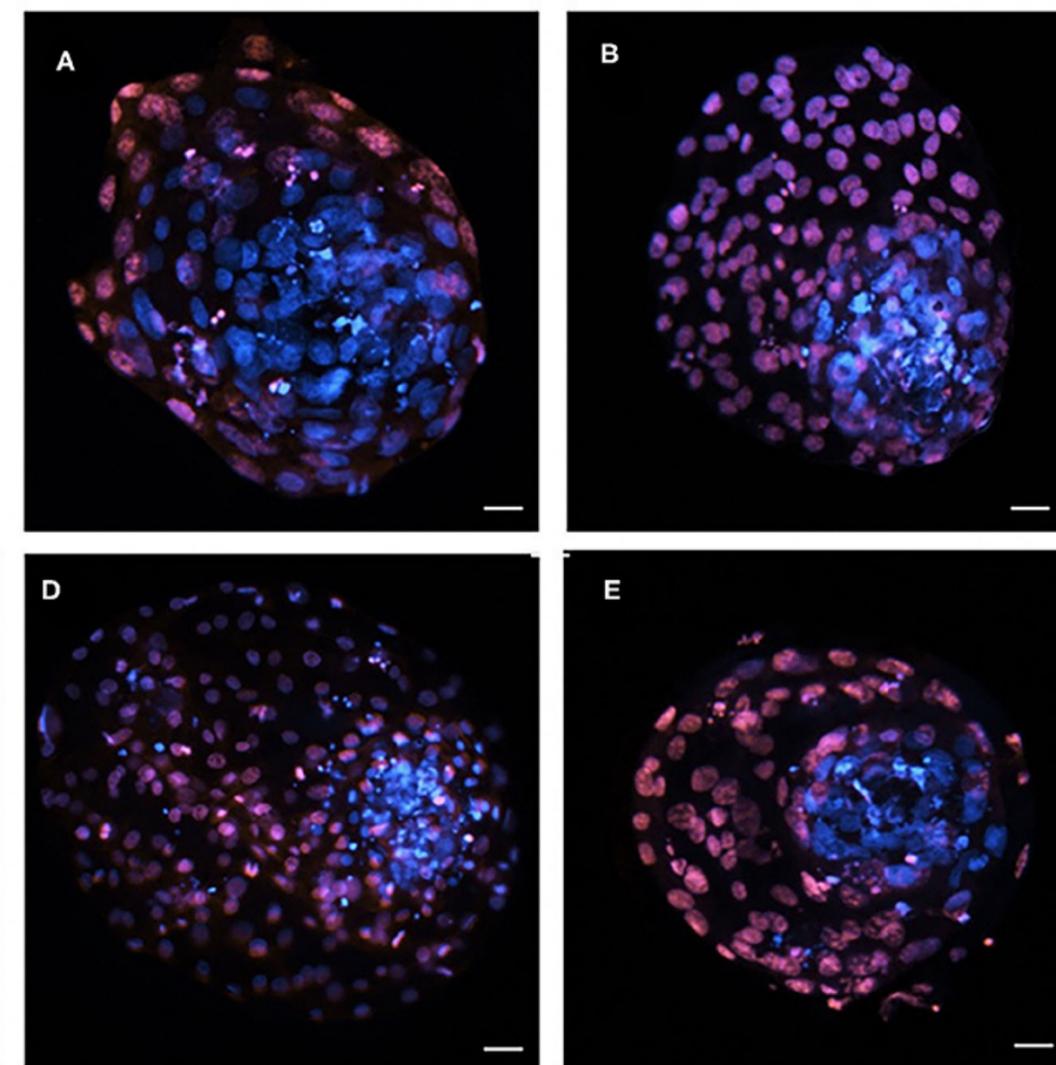
- **BLU HOECHST -> MASSA CELLULARE INTERNA (ICM)**
- **ROSA IODURO DI PROPIDIO -> TROFOECTODERMA (TE)**

Nessuna differenza significativa nella proporzione di ICM e di TE tra gruppi di trattamento.

Tuttavia, si è visto che all'aumentare della dose di THC si assiste ad una lieve riduzione del numero di cellule della ICM.

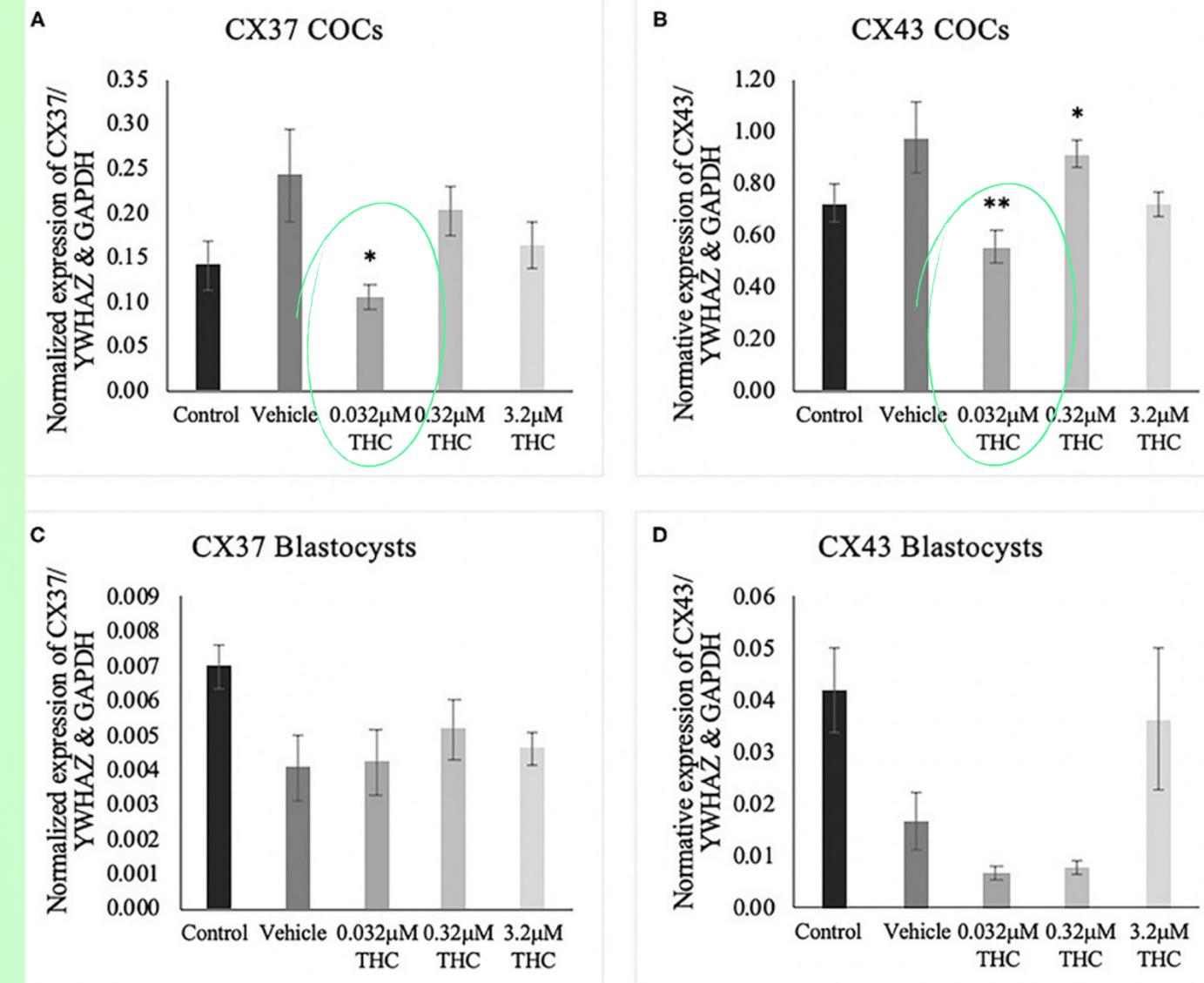
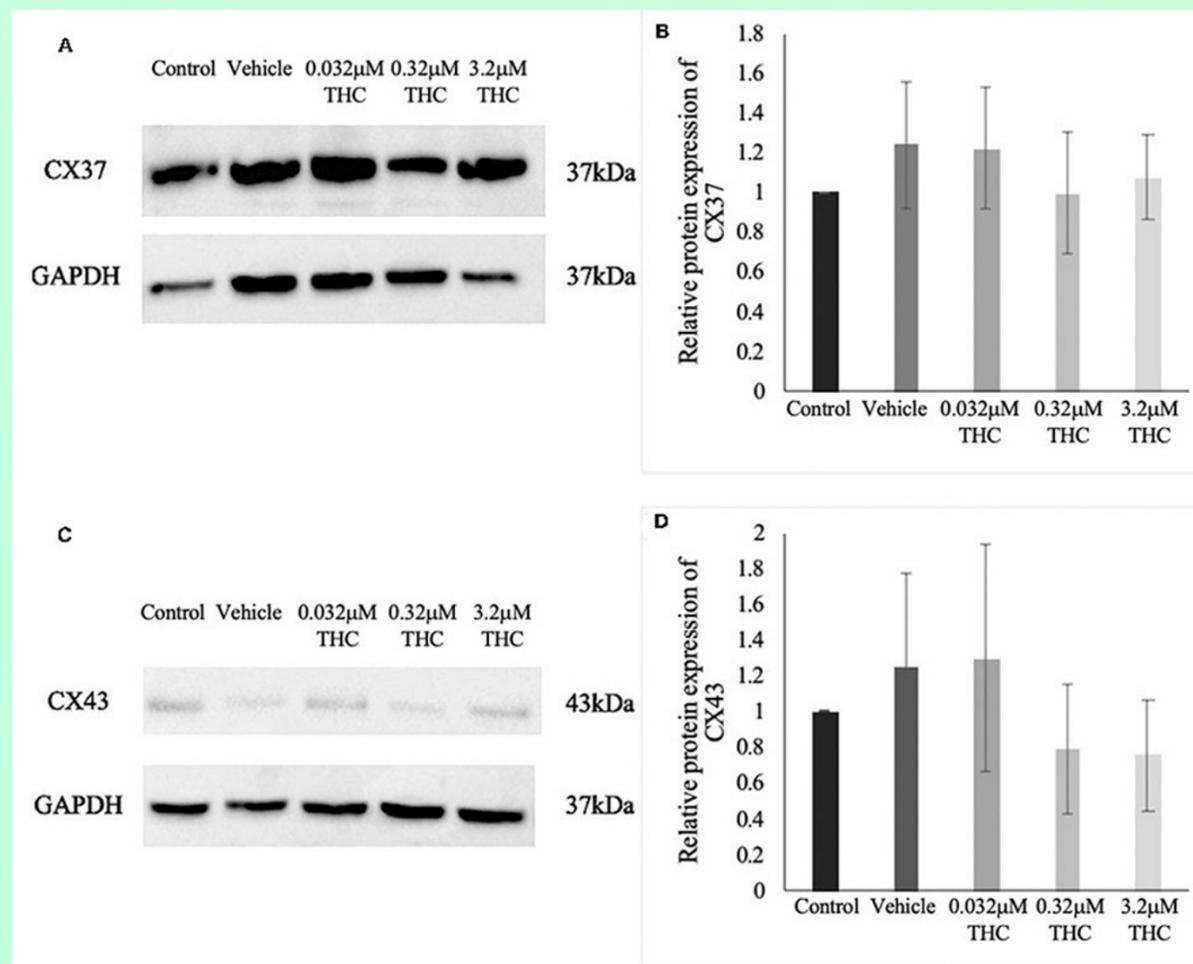
Inoltre, nel gruppo con alto THC (3,2 μ M) solo 4 blastocisti hanno mantenuto l'integrità con la colorazione -> **ALTE DOSI DI THC INDUCONO APOPTOSI (blastocisti più fragili).**

■ - TE
■ - ICM
A - Control
B - Vehicle
C - 0.032 μ M THC
D - 0.32 μ M THC
E - 3.2 μ M THC



★ Espressione dell'm-RNA della Connessina e della proteina Connessina: La Connessina è associata al potenziale di fecondazione dell'oocita, alla qualità dell'oocita e dell'embrione.

Negli ovociti con basso THC (0,032μM) la quantità di m-RNA di CX 37 e CX 43 è diminuita bruscamente, mentre nelle blastocisti non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi di trattamento.

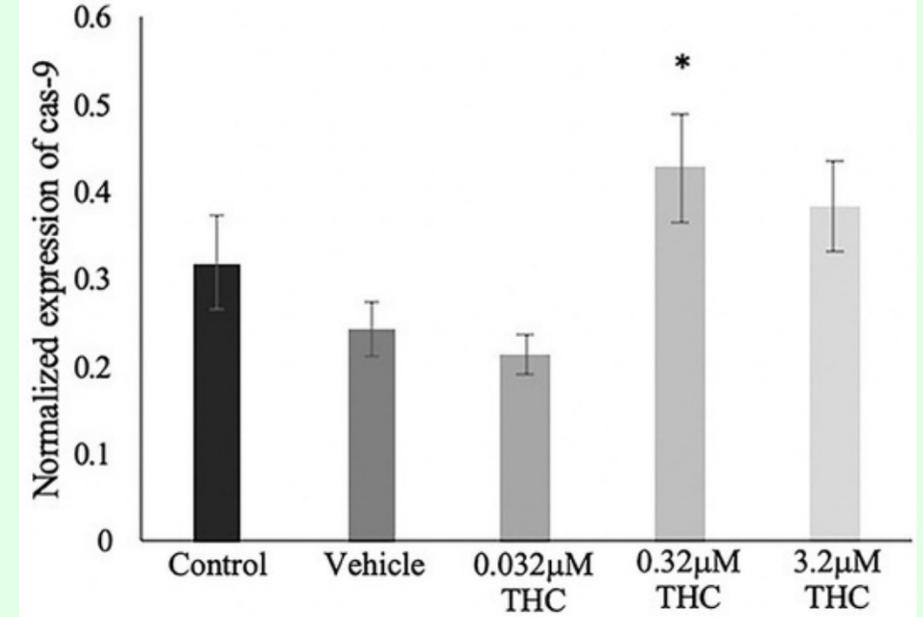


Le proteine sono state prelevate dagli ovociti e analizzate tramite Western Blot. I risultati sono stati normalizzati rispetto al controllo di carico GAPDH e non hanno riportato differenze significative nè in CX 37 nè in CX 43.

★ **Colorazione TUNEL:** Per analizzare la presenza di DNA frammentato e il tasso di apoptosi nelle cellule delle blastocisti.

- **BLU HOECHST -> TUTTI I NUCLEI**
- **VERDE FITCH -> NUCLEI FRAMMENTATI**
- **FRECCIE ROSSE -> CELLULE APOPTOTICHE**

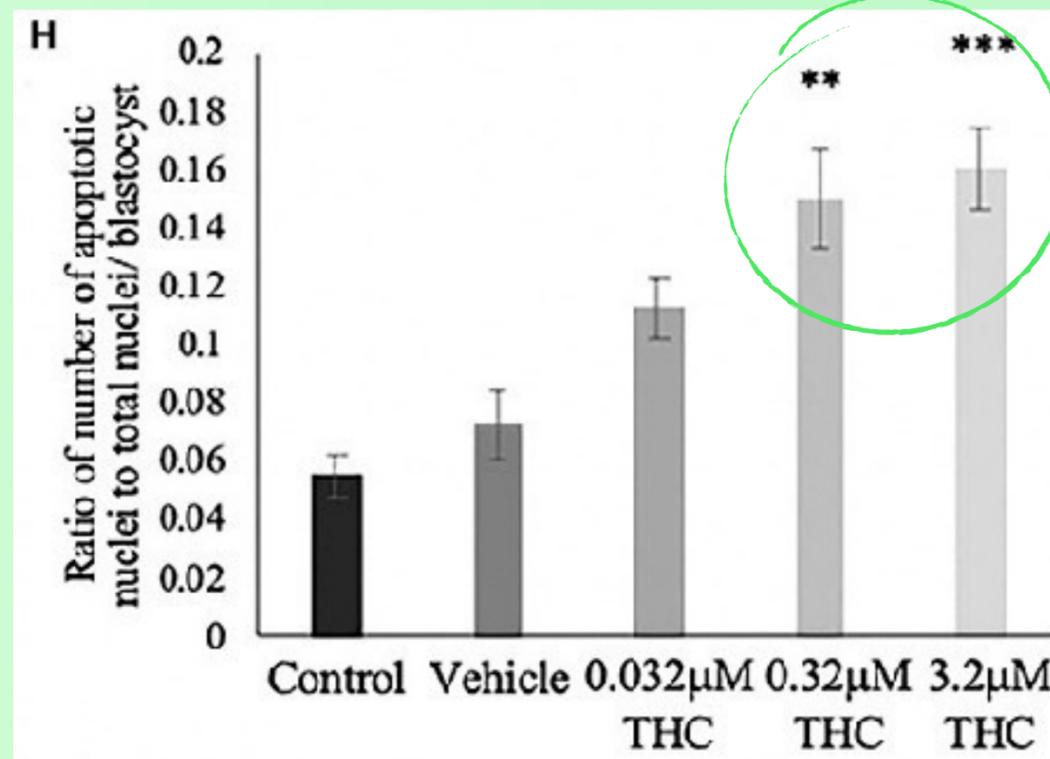
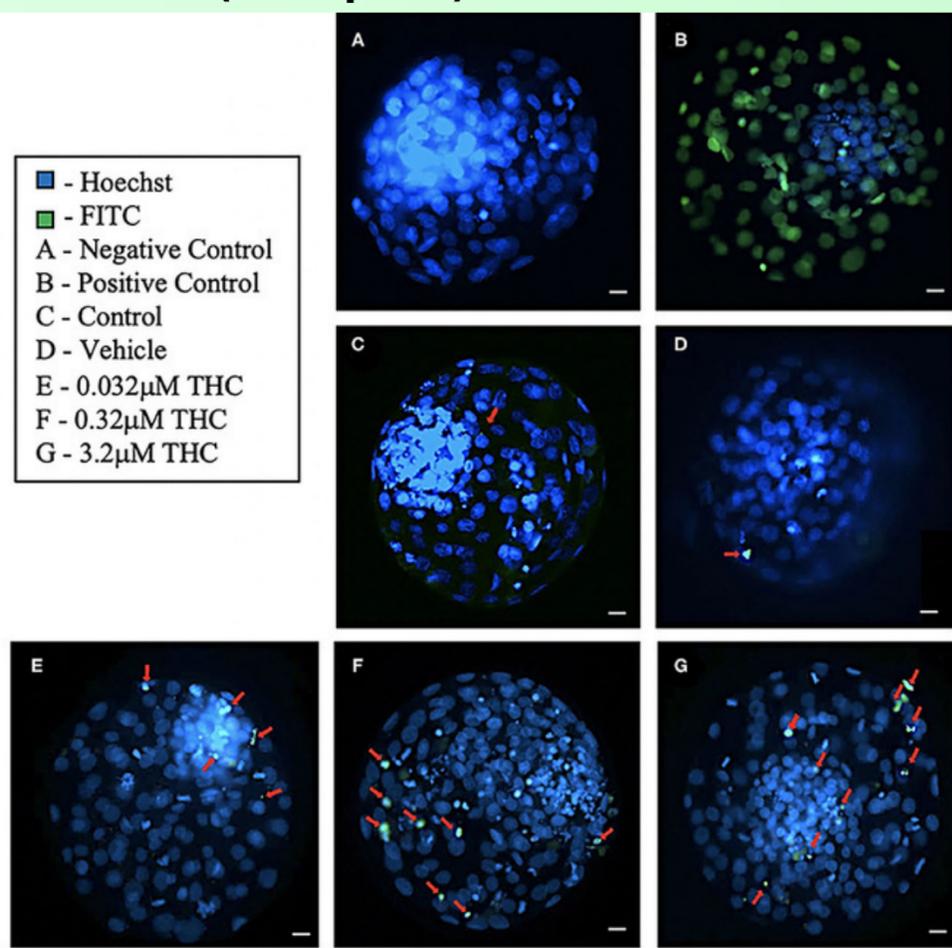
Si è visto che il numero di cellule apoptotiche aumenta significativamente nei gruppi con medio (0,32µM) e alto (3,2µM) THC.



★ **Espressione dell'm-RNA della Caspasi 9:**

Valutata sulle blastocisti per confermare i risultati ottenuti dalla colorazione TUNEL, infatti la Caspasi 9 conduce la cellula verso uno stato pro-apoptotico.

Si è visto che **nel gruppo con medio THC (0,32µM) e nel gruppo con alto THC (3,2µM) l'espressione dell'm-RNA della Cas-9 aumenta.**

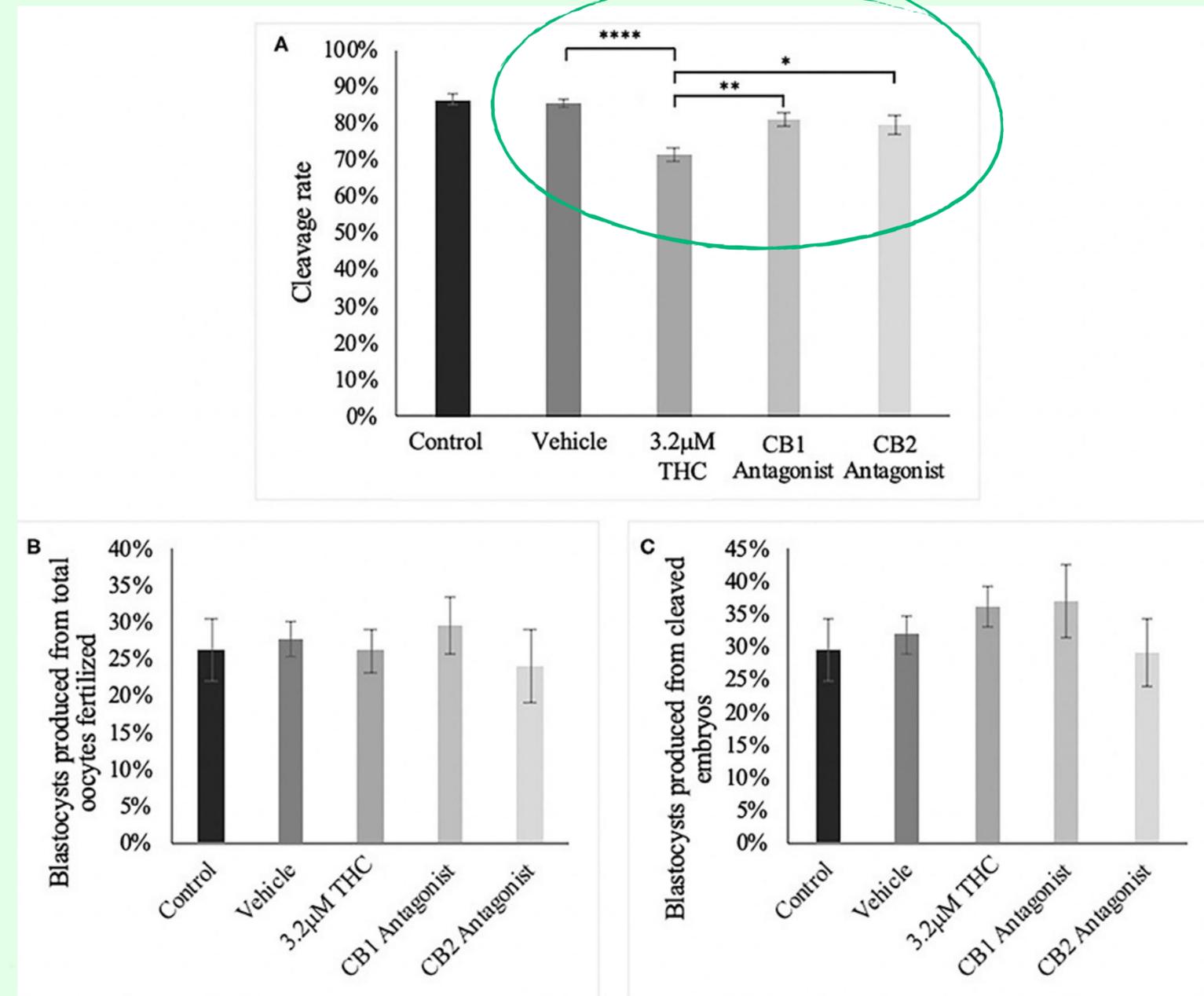


★ Studio con antagonisti CB1/CB2:

Gli ovociti sono stati trattati con una dose alta di THC ($3,2\mu\text{M}$) e con un antagonista selettivo CB1 o CB2 ($3,2\mu\text{M}$) e sono stati valutati i parametri di sviluppo.

Si è visto che:

- La presenza di un antagonista CB1 o CB2 ha **normalizzato il tasso di maturazione e di segmentazione** al pari dei gruppi di controllo;
- Non si sono riscontrate differenze nel numero di blastocisti prodotte in presenza di un antagonista CB1 o CB2.



IL THC AGISCE LEGANDO I RECETTORI CB1 E CB2

RIASSUNTO E CONCLUSIONE:

Lo studio preso in esame dimostra che il trattamento degli ovociti con THC ne ostacola la maturazione nucleare e il raggiungimento dello stadio a due cellule dopo la fecondazione, per cui comporta una riduzione della fertilità complessiva degli ovociti. Infatti, il THC è in grado di legare i recettori CB1 e CB2 presenti nell'ocita e inibire l'Adenilato Ciclasi con riduzione di c-AMP e inattivazione della Proteina Chinasi A (PKA), mentre il fattore MPF viene attivato, facendo progredire la meiosi. Il sistema endocannabinoide, infatti, è responsabile della maturazione dell'ocita come suggerito dalle alte concentrazioni di AEA nel liquido follicolare di follicoli contenenti ovociti maturi. **Il THC è un fattore di selezione per ovociti di qualità.** Quest'ultimi affrontano con successo la maturazione, la fecondazione e lo sviluppo embrionale, e non presentano differenze significative nella qualità del fuso meiotico, nel tasso di blastocisti, nel numero di nuclei e nella colorazione differenziale allo stadio di blastocisti. Un altro indicatore della qualità dell'ocita è la quantità di m-RNA della Connessina che diminuisce negli ovociti trattati con basso THC, probabilmente per alterazione della trascrizione, per lenta condensazione della cromatina, per ripresa meiotica. Tuttavia, questo non è stato confermato a livello proteico, probabilmente per l'attività dei MicroRNA attivati dal sistema endocannabinoide. Il THC, inoltre, induce apoptosi nelle cellule delle blastocisti per iperattivazione del sistema endocannabinoide, come dimostrato dalla colorazione TUNEL e dalla quantificazione dell'm-RNA della proteina Caspasi 9. Utilizzando un antagonista CB1 o CB2 negli ovociti trattati con alto THC si è osservata una normalizzazione del tasso di segmentazione e del tasso di blastocisti, con parametri di sviluppo analoghi a quelli dei gruppi di controllo.

In conclusione, è stato dimostrato che **il THC rappresenta uno stress iniziale per la maturazione dell'ocita e che una volta superato può indurre apoptosi nelle cellule della blastocisti, impedendo all'embrione di impiantarsi correttamente.** *Questo conferma che il THC ha effetti negativi sul sistema riproduttivo femminile, in particolare sulla maturazione dell'ocita e sullo sviluppo embrionale precoce pre-impianto.*

RIFERIMENTI:

Articolo scientifico:

Effects of Delta-9 Tetrahydrocannabinol (THC) on Oocyte Competence and Early Embryonic Development

Link dell'articolo:

<https://doi.org/10.3389/ftox.2021.647918>

Laureanda:

Cristina D'Amelio

Matricola 1087071

Anno accademico 2020/2021