



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



Tesi di Dottorato

**“Valutazione della riduzione del danno testicolare
e spermatico indotto da *Cannabis Sativa*
(Marijuana) nel topo dopo somministrazione
orale di *Lepidium Mejenii* (MACA)”**

Candidato

Dott.ssa Veronica Palumbo

Tutor

Prof.ssa Natascia Cocchia

Coordinatore

Prof. Giuseppe Cringoli

*“Non siamo così soli a fare i castelli in aria
non siamo così soli sulla stessa barca
non siamo così soli a fare i castelli in aria
non siamo così soli a immaginare un nuovo giorno in Italia
tra le nuvole e il mare si può andare, andare
sulla scia delle navi di là dal temporale
qualche volta si vede una luce di prua
e qualcuno grida, domani*

...

domani è già qui, domani è già qui”

*Domani
Artisti Uniti per l'Abruzzo*

Lista delle abbreviazioni	9
Lista delle figure	11
Lista delle tabelle	13
Abstract	15
Introduzione	19
Capitolo 1 - Stress ossidativo e riproduzione maschile	21
1.1 Stress ossidativo	23
1.2 Conclusioni	28
Bibliografia	29
Capitolo 2 - MACA e riproduzione maschile	31
2.1 MACA	33
2.2 Effetti sulla spermatogenesi	36
2.3 Effetti sulla ghiandola prostatica	38
2.4 Effetti sulla libido sessuale	39
2.5 Conclusioni	41
Bibliografia	43
Capitolo 3 - Cannabinoidi e riproduzione maschile	49
3.1 <i>Cannabis Sativa</i>	51
3.2 Effetti sull'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo	59
3.3 Effetti sulle cellule germinali maschili	60
3.4 Effetti sulla motilità spermatica	61
3.5 Effetti sulla capacitazione spermatica	62
3.6 Effetti sulla reazione acrosomiale spermatica	63
3.7 Conclusioni	64
Bibliografia	65
Capitolo 4 - Il modello murino nella ricerca sulla fertilità maschile	69
4.1 Il modello murino	71
4.2 Topi <i>knockout/knockin</i> e topi gene trapping	74

4.3	Topi transgenici	76
4.4	Topi con mutazioni puntiformi indotte chimicamente	77
4.5	Il modello murino nell'infertilità maschile	79
4.5.1	I difetti premeiotici	79
4.5.2	I difetti meiotici	80
4.5.3	Difetti postmeiotici o spermiogenesi	82
4.5.4	Maturazione post testicolare e difetti di fertilizzazione	85
4.6	Conclusioni	87
	Bibliografia	88
Capitolo 5	- Valutazione della riduzione del danno testicolare e spermatico indotto da <i>Cannabis Sativa</i> (Marijuana) nel topo dopo somministrazione orale di <i>Lepidium Mejenii</i>	95
5.1	Introduzione	97
5.2	Materiali e metodi	100
5.2.1	Animali	100
5.2.2	Disegno sperimentale	100
5.2.3	Reagenti e farmaci	101
5.2.4	Valutazione del materiale seminale	101
5.2.5	Istopatologia e morfometria	102
5.2.6	Analisi dei dati	104
5.3	Risultati	105
5.3.1	Valutazione del materiale seminale	105
5.3.2	Istopatologia e morfometria	110
5.4	Discussione	114
5.5	Conclusioni	124
	Bibliografia	125

AC	Adenilato Ciclasi
AEA	Arachidoniletanolammide
AIDS	Sindrome Da Immunodeficienza Acquisita
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	Ione Calcio
cAMP	Adenosina Monofosfato Ciclico
CB1	Recettori Cannabinoidi Tipo 1
CB2	Recettori Cannabinoidi Tipo 2
CBD	Cannabidiolo
CBG	Cannabigerolo
CNR1	Cannabinoid Receptor Gene 1
CNR2	Cannabinoid Receptor Gene 2
DNA	Acido Desossiribonucleico
DSB	Cromosomi Spessi E Corti
ECS	Sistema Endocannabinoide Cannabis
ENU	N-Etil-N-Nitrosourea
ES	Staminali Embrionali
FSH	Ormone Follicolo Stimolante
H ₂ O	Molecole Di Acqua
H ₂ O ₂	Perossido Di Idrogeno
HA	Motilità Iperattiva
LH	Ormone Luteinizzante
LHRH	Ormone Di Rilascio Ipotalamico Delle Gonadotropine
LSD	Least Significant Difference
MACA	Lepidium Meyenii Walpers
MANOVA	Analisi Della Varianza Multivariata
NADPH	Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato Ossidasi
O ²⁻	Anione Radicale Superossido
O ₂	Diossigeno/Ossigeno
OH	Radicale Idrossile
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PKA	Protein Kinasi A
Prms	Protamine
PUFA	Acidi Grassi Polinsaturi
ROS	Specie Reattive Dell'ossigeno
RPM	Motilità Progressiva Rapida
SC	Concentrazione Spermatica
SD	Deviazione Standard

SO	Stress Ossidativo
SPM	Motilità Progressiva Lenta
THC	Tetraidrocannabinolo
TM	Motilità Totale
Tps	Proteine Di Transizione
Δ -1-THC	Delta-1-Tetraidrocannabinolo
Δ -9-THC	Delta-9-Tetraidrocannabinolo

- 1.1. Reazione di ossidoriduzione di O₂.
- 1.2. Attività dei ROS in un sistema biologico.
- 2.1. MACA rossa, gialla e nera.
- 3.1. *Cannabis Sativa*.
- 3.2. Piantagione di Canapa e Marijuana
- 4.1. Esempi di geni essenziali per lo sviluppo di cellule germinali implicate nello studio del modello murino (Jamsai et al. 2011).
- 4.2. Esempi di geni essenziali implicati nella meiosi nello studio del modello murino (Jamsai et al. 2011).
- 4.3. Esempi di geni essenziali per la spermiogenesi, la maturazione epididimale, la capacitazione e la fertilizzazione implicati negli studi del modello murino (Jamsai et al. 2011).
- 5.1. SC dei gruppi CONTROLLO, THC, MACA e THC+MACA rappresentata nel diagramma a scatola (box plot): la linea centrale rappresenta la mediana, la scatola è definita dal 1° e dal 3° interquartile, i “baffi” rappresentano il minimo e il massimo, mentre gli asterischi sono gli “outliers”. Le lettere (a-c) indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi (post hoc $p < 0.05$).
- 5.2. TM dei gruppi CONTROLLO, THC, MACA e THC+MACA rappresentata nel diagramma a scatola (box plot): la linea centrale rappresenta la mediana, la scatola è definita dal 1° e dal 3° interquartile, i “baffi” rappresentano il minimo e il massimo, mentre gli asterischi sono gli “outliers”. Le lettere (a-c) indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi (post hoc $p < 0.05$).
- 5.4. SPM dei gruppi CONTROLLO, THC, MACA e THC+MACA rappresentata nel diagramma a scatola (box plot): la linea centrale rappresenta la mediana, la scatola è definita dal 1° e dal 3° interquartile, i “baffi” rappresentano il minimo e il massimo, mentre gli asterischi sono gli “outliers”. Le lettere (a-b) indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi (post hoc $p < 0.05$); *= outliers.
- 5.5. Valutazione istologica dei testicoli di topo del gruppo CONTROLLO. Normale istologia testicolare con tubuli seminiferi uniformi, ben organizzati e spermatogenesi completa. Ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 40x.
- 5.6. Valutazione istologica dei testicoli di topo del gruppo MACA. Non significative alterazioni del parenchima testicolare e della

- spermatogenesi. Ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 40x.
- 5.7 Valutazione istologica dei testicoli di topo del gruppo THC. Evidenti distacchi multifocali dell'epitelio germinale, membrana basale irregolare e deformata, deformazione e degenerazione tubulare, tubuli seminiferi ristretti con aumento del diametro luminale. Ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 40x.
- 5.8 Valutazione istologica dei testicoli di topo del gruppo THC+MACA. Pochi distacchi dell'epitelio germinale e ridotta popolazione di spermatozoi maturi. Ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 40x.

- 5.1 Media e deviazione standard di SC, TM, RPM, SPM nei gruppi CONTROLLO, THC, MACA E THC+MACA. Le lettere (a-d) indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi (post hoc $p < 0.05$).

Tetrahydrocannabinol (THC) administration has been associated with testicular damage and reduced semen quality. The oral administration of hypocotyl- roots of MACA improved spermatogenesis, sperm motility and count and reduced spermatogenic damage induced by different causes (high altitude, lead acetate injections, malathion). The aim of this study was to evaluate the effect of administration of THC, MACA and of their association on testicular tissue and semen parameters.

Thirty 6-weeks old male c57/BL mice were divided into 4 groups: 1) control mice that not received any treatment (n=6); 2) received 10 mg/kg of Δ^9 -THC in 0.1 ml of sesam oil subcutaneously for 30 days (n=9); 3) received 50 mg/Kg of MACA powder PO for 30 days (n=10); 4) received the same doses of both Δ^9 -THC and MACA (n=5). Immediately after euthanasia, epididymis, testes, liver and kidney were collected. Epididymis was incised and placed into 500 μ l of PBS solution. Spermatozoa were allowed to swim-up into the medium for at least 30 minutes at 35°C. Sperm concentration (SC) was determined with a Bürker chamber; total (TM), rapid (RPM) and slow progressive (SPM) sperm motilities were assessed by placing 10 μ l of pre-warmed (37°C) semen suspension onto a pre-warmed slide and examined by light microscope.

Testes, liver, kidney and colon were preserved in 10% neutral buffered formalin), dehydrated and embedded in paraffin. Paraffin blocks were cut into 4 μ m thick sections and stained with hematoxylin and eosin (HE) for morphology. For liver, kidney and colon histologic assessment, several parameters were semiquantitatively evaluated separately by two independent experienced pathologists in a blinded fashion with good concordance (Cohen's κ = 0.913, P < 0.001). For the morphometry of the testis, transverse sections of testes with at least 20 round or nearly round seminiferous tubules were chosen randomly to measure tubular diameters and seminiferous epithelium height for each animal regardless the stage of the seminiferous epithelium cycle using images obtained at $\times$ 100 magnifications. The diameter (D) of seminiferous tubules was measured across the minor and major axes of the tubules by taking the average of two diameters, D1 and D2. The same tissue section used for measuring tubular diameters was used to measure the seminiferous epithelium height. For this analysis, two perpendicular lines in each field were drawn from the basement membrane (tunica propria) to the tubule lumen (luminal border); the mean of these two values were considered as the height of the seminiferous tubule. For tubular spermatogenesis index evaluation and quantification, we applied a ten-point scoring system used both in human

and experimental pathology for its good reproducibility. Statistical analyses between groups were performed using Student's t-test (two-tailed) or MANOVA for parameters with normal test based on distribution. Statistical significance was set at $p < .05$.

Mean and standard deviation of semen parameters for the different group were reported in the Table; different small letters (a-d) indicate differences between groups evaluated by MANOVA and Fisher's LSD ($p < 0.05$).

Semen parameters	Groups			
	<i>Control</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>SC</i> ($\times 10^6$ spz/ml)	50.5 $\pm$ 8.4 ^a	23.1 $\pm$ 3.6 ^b	36.6 $\pm$ 6.1 ^c	54 $\pm$ 8.3 ^a
<i>TM</i> (%)	76.7 $\pm$ 2.6 ^a	33 $\pm$ 2.5 ^b	55.8 $\pm$ 6.2 ^c	79.4 $\pm$ 4.4 ^a
<i>RPM</i> (%)	69.2 $\pm$ 3.8 ^a	15.8 $\pm$ 5.5 ^b	37.8 $\pm$ 4.7 ^c	51.6 $\pm$ 4.7 ^d
<i>SPM</i> (%)	5.8 $\pm$ 2 ^a	5.9 $\pm$ 1.8 ^a	15.5 $\pm$ 6 ^b	13.6 $\pm$ 2.5 ^b

Histological examination of formalin-fixed and paraffin-embedded sections of liver, kidney and cecum showed no evident histopathological changes for the selected parameters and no statistically significant difference among the groups. Histological assessment of testes from mice of CONTROL group showed no alterations with a normal histoarchitecture. In experimental group MACA, no severe and significant alterations were observed in testicular parenchyma nor in spermatogenesis. In experimental group THC, transverse sections of testis showed mild to moderate alterations accounting 45% of the testicular parenchyma and consisting mostly in multifocal detachment of germinal epithelium, irregular and buckled basement membrane, tubular deformation and degeneration, shrunken seminiferous tubules and increased luminal diameter. In experimental group THC+MACA, transverse sections of testis showed an overall normal histoarchitecture of testicular parenchyma but about the 25% of testicular parenchyma showed mild alterations such as detachment of germinal epithelium and reduced population of mature spermatozoa.

In morphometric measurements, tubular diameter had a significant increasing thickening in groups THC and THC+MACA compared to group MACA and control group ($p < 0.05$). Moreover, seminiferous epithelium height decreased significantly in groups THC compared to control group and experimental groups MACA and THC+MACA ($p < 0.01$). Spermatogenic Index had a level of 10 in control group and experimental group MACA but shifted from a level of 10 to 9 in experimental group THC and THC+MACA.

Therefore, a slight but not statistically significant reduction in the spermatogenic index was observed in group 2 ($p < 0.001$) compared to group MACA and THC+MACA. Epididymal cross sections of CONTROL groups as well as experimental group THC, MACA, THC+MACA showed no significant alterations: epididymal lumen were filled with spermatozoa and epithelium showed intact basement membrane, epididymal tubules, pseudostratified columnar epithelium and interstitial areas.

In Vivo MACA administration reduced the deleterious effect on testicular parenchima and semen production caused by THC exposure.

L'utilizzo delle piante a fini terapeutici (fitoterapia) rappresenta la medicina più antica utilizzata dall'uomo. Il problema dell'infertilità è uno dei più antichi del mondo e da sempre si è cercato rimedio mediante l'utilizzo di fitoterapici. Nel corso degli ultimi anni, la comunità scientifica ha prestato molta attenzione a questo tema, ricercando gli effetti e i meccanismi d'azione di molte piante o parti di esse utilizzate per il trattamento delle patologie.

Oggigiorno, è confermato che lo stress ossidativo giochi un ruolo fondamentale nello sviluppo della ipo- o infertilità. Numerose piante o parti di esse sono state, infatti, testate al fine di migliorare tale condizione sia in ambito femminile che maschile.

La MACA, o *Lepidium Meyenii*, è una pianta della famiglia delle Brassicacee nativa della Cordigliera delle Ande del Perù e della Bolivia. La sua radice è impiegata da sempre dalla popolazione andina per i suoi effetti antiossidanti e per il miglioramento delle funzionalità riproduttive maschili e femminili.

MACA è consumata in Perù da 400 anni sia come alimento che come medicamento; infatti, è noto il suo utilizzo nel trattamento dei reumatismi, dei problemi respiratori, degli squilibri ormonali, nella stimolazione del metabolismo e della memoria. Inoltre, è riportato in letteratura il suo utilizzo nel trattamento di depressione, anemia, leucemia, aids, cancro ed alcolismo. Questa pianta presenta differenti fenotipi, che conferiscono un differente colore agli ipocotili (radici), che presentano differenti proprietà medicinali. La maggior parte degli studi condotti con MACA valutano l'effetto delle varietà rosso, giallo e nero sulla spermatogenesi e i parametri seminali nel topo e nel ratto. Inoltre, è riportato che la somministrazione orale di ipocotili di MACA stimoli il comportamento sessuale nel topo. MACA è, inoltre, in grado di migliorare la qualità del seme di stallone e la sua refrigerabilità. Nell'uomo, il suo effetto afrodisiaco e la capacità di migliorare il potenziale riproduttivo sono stati verificati scientificamente. Il riconoscimento scientifico delle sue proprietà ha indotto scienziati e clinici ad inserire ufficialmente MACA tra i medicinali per il trattamento dell'ipofertilità maschile umana. Uno studio riporta che MACA ha ridotto gli effetti spermiotossici indotti dall'acetato di piombo nei ratti.

L'utilizzo di cannabinoidi per fini terapeutici è sempre più diffuso nel trattamento di patologie autoimmuni, neurologiche e tumorali. Nonostante il rischio di tossicità acuta sia stato scongiurato, non si può dire lo stesso della tossicità cronica, soprattutto in ambito riproduttivo. Attualmente, inoltre, l'uso illegale di *Cannabis Sativa* e di cannabinoidi è in crescita,

proprio in soggetti in età riproduttiva per motivi ricreazionali, sociali, medicali e spirituali. Allo stesso tempo, i problemi di ipofertilità di coppia aumentano sempre di più, e per un terzo sono ascrivibili alla componente maschile. Numerosi studi hanno dimostrato l'effetto negativo dell'assunzione quotidiana di marijuana sulla fertilità maschile sia in animali da laboratorio che nell'uomo. Inoltre, non è riportato che la semplice astinenza da Marijuana permetta un miglioramento dei parametri spermatici. L'uso di *Marijuana* rappresenta dunque una delle cause di infertilità maschile e va correlata all'azione dei cannabinoidi rilasciati da *Cannabis Sativa*.

Il sistema endocannabinoide è infatti coinvolto nella complessa regolazione della riproduzione maschile: gli endocannabinoidi endogeni rilasciati si legano ai recettori cannabinoidi, mantenendo un equilibrio precario. La presenza di *Endocannabinoids receptors* (ECS) in tutti i tratti dell'apparato genitale maschile così come il coinvolgimento degli endocannabinoidi nella fisiologia riproduttiva sono stati ampiamente dimostrati. Partendo da questo presupposto è stata formulata l'ipotesi che i cannabinoidi esogeni, quali quelli contenuti nella marijuana, competono a livello recettoriale con gli endogeni creando uno squilibrio in grado di interferire con la fertilità. Non sorprende, quindi, che numerosi studi dimostrano che i cannabinoidi esogeni hanno un effetto negativo sulla fertilità maschile.

Questo studio ha lo scopo di ampliare le conoscenze riguardanti l'azione spermiotossica di *Cannabis Sativa* nel topo e di testare la capacità di MACA di ridurre tale effetto deleterio, in modo da dare un contributo importante alla risoluzione dei problemi di infertilità legati al fattore maschile, visto il loro aumento legato alla crescita del consumo di *Cannabis Sativa*.

Capitolo 1

Stress ossidativo e riproduzione maschile

1.1 Stress ossidativo

L'infertilità maschile è una condizione relativamente comune. Molti maschi producono un numero sufficiente di spermatozoi maturi, tuttavia, la loro funzionalità risulta essere poi compromessa. Di conseguenza, la produzione di spermatozoi anomali è ritenuta la principale causa di infertilità nell'uomo. Le cause primarie che determinano la produzione di spermatozoi non idonei alla fecondazione sono varie. Il meccanismo eziopatogenetico e i diversi fattori che lo costituiscono (genetici, ambientali, stili di vita) sono tuttora oggetto di studio. Si ipotizza che a livello gametico, l'interazione di questi fattori si traduca in Stress Ossidativo (SO) in grado di danneggiare l'integrità strutturale e funzionale degli spermatozoi, cellule altamente differenziate e specializzate.

Fin dal 1943 il Dr MacLeod, pioniere della moderna andrologia, ha ipotizzato che lo SO potesse essere l'innescò del meccanismo eziopatogenetico che esita in ipofertilità maschile. Infatti, Dr MacLeod ha dimostrato che gli spermatozoi umani incubati a medie concentrazioni di ossigeno perdono rapidamente motilità e se incubati in presenza di catalasi, enzima antiossidante specifico del Perossido di Idrogeno (H_2O_2), tale riduzione della motilità risulta ulteriormente ridotta (MacLeod, 1943).

Tutte le cellule ed anche le cellule spermatiche, in particolare quelle danneggiate, producono le cosiddette Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS). L'effetto negativo dei ROS sugli spermatozoi, in particolare del H_2O_2 , è stato confermato da Tosic e Walton in un articolo pubblicato su Nature nel 1946 (Tosic e Walton, 1946). Successivamente, gli stessi autori hanno presentato la prova biochimica che gli spermatozoi bovini potevano, non solo generare H_2O_2 , ma anche metaboliti dannosi per il corretto evolversi della funzione spermatica (Tosic e Walton, 1950).

I ROS sono costituiti da specie radicali libere e da specie non radicali. I radicali liberi sono stati descritti più di un centinaio di anni fa ed è dimostrato che si comportano da mediatori in tutte le reazioni di ossidazione delle molecole organiche. I radicali liberi si trovano nei sistemi biologici e sono coinvolti in molti processi patologici e di invecchiamento. Sono altamente reattivi e ossidano i lipidi di membrana, i carboidrati, gli amminoacidi delle proteine e danneggiano gli acidi nucleici (Agarwal et al. 2003). Sono parte attiva in numerosi processi e non possono essere considerati solo agenti dannosi, ma parte integrante di normali reazioni dei processi metabolici e fisiologici degli organismi viventi. Una loro eccessiva produzione determina SO. I ROS sono molecole altamente instabili e molto

reattive in quanto posseggono nel loro orbitale più esterno un elettrone spaiato. Nel tentativo di ritornare ad uno stato di equilibrio, sottraggono agli atomi circostanti l'elettrone necessario e determinano la formazione di nuovi ROS. Il diossigeno (O_2) è un biradicale, perché contiene due elettroni con stessa carica nell'orbita molecolare più esterna. L'ossigeno molecolare può essere ridotto attraverso una reazione di acquisizione di quattro elettroni e quattro protoni, formando due molecole di acqua (H_2O). In questo caso, il biradicale libero è semplicemente convertito ad una specie non radicale per l'accettazione di quattro elettroni e quattro protoni. Esiste, però, un'altra via per la riduzione di questo O_2 , che porta alla formazione di ROS. Acquisendo un elettrone, l' O_2 è convertito in anione radicale superossido (O_2^-) contenente un elettrone libero nell'orbita più esterna, diventando così specie molto reattiva. Accettando un secondo elettrone e due protoni, O_2^- si converte in H_2O_2 , che presenta una natura non radicale e chimicamente più attiva della molecola di O_2 ma meno attiva di O_2^- . La formazione del radicale idrossile (OH), specie più reattiva all'ossigeno, deriva da un'ulteriore riduzione di H_2O_2 , portando alla sua dismutazione. Alla fine, l'acquisizione di quattro elettroni ed un ulteriore protone forma una molecola di H_2O . O_2^- , H_2O_2 , e OH sono chimicamente molto più reattivi di O_2 . Tutti sono chiamati ROS, ma solo O_2^- e OH sono realmente radicali liberi, mentre H_2O_2 no.

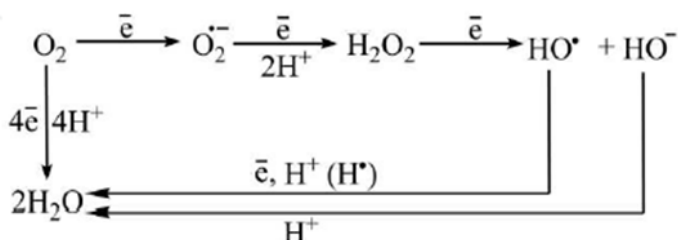


Fig. 1.1 Reazione di ossidoriduzione di O_2

La formazione di ROS e la reazione di ossidoriduzione hanno un ruolo importante nei processi fisiologici e patologici, come processi infiammatori, infettivi e disordini degenerativi, sia negli umani che negli animali (Bildik et al. 2004; Kumaraguruparan et al. 2005; Vajdovich et al. 2005). L'interruzione delle reazioni e del controllo di ossidoriduzione e lo squilibrio a favore delle specie pro-ossidanti determinano SO (Cadenas et al. 1985; Jones 2006).

Nei testicoli, i ROS, come ioni ossidrilici, superossido, ossido di azoto e perossido, sono prodotti durante i fisiologici processi di spermatogenesi e steroidogenesi. Sono necessarie basse concentrazioni di ROS per l'espletamento di importanti funzioni spermatiche, come la capacitazione, l'iperattivazione, la reazione acrosomiale e la fusione spermatozoo-ovocita, ma se presenti in quantità eccessive diventano nocive.

Un incremento dei ROS all'inizio del processo di capacitazione è seguito da un aumento della fosforilazione della tirosina (de Lamirande et al. 1998). Alla reazione acrosomiale è stata associata la concentrazione spermatica extracellulare di O_2^- (de Lamirande et al. 1998).

Nel tratto genitale maschile, i responsabili della produzione dei ROS sono quindi gli stessi spermatozoi e i leucociti, in particolare neutrofili e macrofagi. Dopo l'ejaculazione, le cellule spermatiche continuano ad essere la maggiore risorsa di ROS. Le cellule germinali maschili producono una piccola quantità di ROS già nei primi stadi di sviluppo. Sono coinvolti nei processi di condensazione cromatinica spermatica, di regolazione del numero di cellule germinali attraverso l'induzione di apoptosi o proliferazione di spermatogoni (Aitken et al. 1999). Si conoscono due meccanismi di produzione dei ROS intracellulari: i mitocondri e la Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato Ossidasi (NADPH), un complesso enzimatico contenuto nella membrana cellulare.

Alti livelli di ROS causano patologie spermatiche come la deplezione di Adenosina Trifosfato (ATP), l'alterazione della vitalità e della motilità spermatica (Saleh et al. 2002). Nel plasma seminale, i ROS originano da fonti esogene ed endogene. Molti di questi sono prodotti dalla prostata e dalle vescicole seminali. Durante la fase finale dell'ejaculazione, solo la presenza di leucociti in elevate quantità è dannosa per le funzioni spermatiche. Quindi, un'infezione che determina produzione di ROS nell'epididimo, nella ghiandola prostatica e nella vescicola seminale, potrebbe indirettamente alterare l'attività spermatica (Ochsendorf, 1999).

I ROS, agendo sulle membrane e sull'acido desossiribonucleico (DNA) degli spermatozoi, riducono la motilità spermatica e la possibile fusione con l'ovocita, compromettendo il contributo genomico paterno dell'embrione.

Secondo Aitken, lo SO causato da uno squilibrio tra la produzione di ROS e la capacità della barriera antiossidante, indebolisce la funzionalità degli spermatozoi mediante una serie di reazioni a catena che hanno come bersagli biomolecolari: lipidi, proteine e DNA. Lo SO colpisce l'integrità delle membrane degli spermatozoi, ne danneggia il nucleo, esaurisce la

concentrazione di ATP nei mitocondri e, quindi, diminuisce la motilità, la vitalità e la capacità di fecondazione degli stessi.

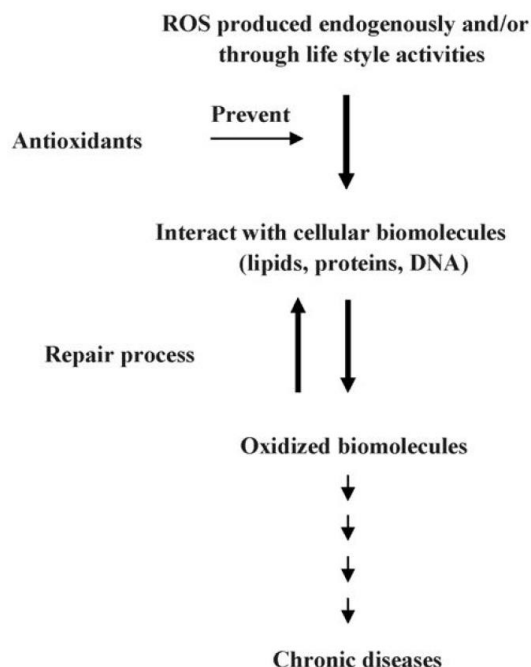


Fig. 1.2 Attività dei ROS in un sistema biologico

Gli spermatozoi sono molto sensibili, inoltre, alla perossidazione lipidica perché la loro membrana plasmatica è ricca di acidi grassi polinsaturi (PUFA), specialmente di PUFA a catena lunga. La concentrazione di questi PUFA diminuisce con l'età nei tori e l'effetto della supplementazione con PUFA si è dimostrato spesso positivo, soprattutto negli animali più vecchi. Tuttavia, la variabilità dei suoi effetti sulle caratteristiche dello sperma dei diversi mammiferi è sorprendentemente elevata.

Molti agenti possono determinare un aumento del grado di SO testicolare. Sostanze tossiche o condizioni di varicocele, orchiti, criptorchidismo, invecchiamento, sono considerate cause che conducono un incremento dell'apoptosi cellulare germinale e ipospermatogenesi. Danni al DNA indotti dai ROS determinano un aumento dell'apoptosi cellulare, andando a diminuire la conta spermatica e peggiorando, così, la qualità del seme con conseguente infertilità maschile (Nakada et al. 2006). Grandi quantità di mutazioni patologiche del mtDNA si accumulano nei testicoli; la

conseguente disfunzione respiratoria mitocondriale nelle cellule spermatogenetiche si traduce in una diminuzione della produzione di energia che determina, infine, arresto meiotico e anomalie nella morfologia degli spermatozoi, sottolineando, così, l'importanza della funzione respiratoria mitocondriale nella spermatogenesi dei mammiferi (Nakada et al. 2006).

1.2 Conclusioni

Lo stress ossidativo è stato ampiamente studiato negli ultimi 50 anni. Finora sono stati compiuti notevoli progressi, dalla caratterizzazione descrittiva di questo processo alla delineazione dei meccanismi molecolari che sottolineano le risposte adattive e le manipolazioni mirate delle risposte attese. La tossicità dell'O₂ è una sfida intrinseca alla vita aerobica, che riguarda anche gli spermatozoi, cellule responsabili della propagazione della specie. Il danno ossidativo alle membrane, alle proteine e al DNA degli spermatozoi è connesso ai cambiamenti nei meccanismi di trasduzione del segnale che regolano la fertilità.

Gli spermatozoi e gli ovociti possiedono una capacità intrinseca ma limitata di generare ROS utili per il processo di fecondazione. Sebbene siano disponibili vari meccanismi di difesa, tra cui enzimi antiossidanti, vitamine e biomolecole, un equilibrio tra ROS e antiossidanti sembra essere necessario per la sopravvivenza e la funzione degli spermatozoi.

In letteratura sono presenti molti studi su come gli antiossidanti siano in grado di migliorare la qualità spermatica. Ad oggi, sono note l'origine e l'eziologia dell'aumento dei ROS in maschi ipofertili e queste informazioni hanno permesso di studiare molti percorsi terapeutici. Inoltre, le proprietà pro-ossidative e antiossidanti delle terapie stanno attualmente ricevendo maggiore attenzione anche nell'ambito delle terapie anti-infettive. Lo stress ossidativo potrebbe anche essere una conseguenza di malattie tra cui diabete, cancro, aterosclerosi e morbo di Parkinson o di stili di vita non salutari come il fumo, l'abuso di alcol o l'esposizione a inquinamento chimico o elettromagnetico.

I ROS contribuiscono in modo significativo alla regolazione della funzione degli spermatozoi sia in senso positivo che negativo. Pertanto, queste cellule generano bassi livelli di ROS al fine di promuovere la capacità e l'evoluzione funzionale dei comportamenti degli spermatozoi necessari per la fecondazione. Se non si verifica la fecondazione, la generazione continua di ROS attiva la cascata intrinseca apoptotica.

I futuri progressi nel campo richiedono l'identificazione degli obiettivi cellulari più cruciali per l'azione dei ROS, nonché la scoperta dei meccanismi sottostanti e le conseguenze dell'interazione tra i ROS e i componenti cellulari.

- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 2003; 79; 829–843.
- Aitken R.J. The Amoroso lecture. The human spermatozoon – A cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility* 1999; 115; 1–7.
- Bildik A., Kargin F., Seyrek K., Pasa S., Ozensoy S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 2004; 77(1); 63–66.
- Cadenas E., Sies H. Oxidative stress: Excited oxygen species and enzyme activity. *Advances in Enzyme Regulation* 1985; 23; 217–237.
- de Lamirande E., Gagnon C. Paradoxical effect of reagents for sulfhydryl and disulphide groups on human sperm capacitation and superoxide production. *Free Radical Biology and Medicine* 1998; 25(7); 803–817.
- de Lamirande E., Tsai C., Harakat A., Gagnon C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcsome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *Journal of Andrology* 1998; 19(5); 585–594.
- Jones DP. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chemico Biological Interaction* 2006; 163(1–2); 38–53.
- Kumaraguruparan R., Kabalimoorthy J., Nagini S. Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clinical Biochemistry* 2005; 38(2); 154–158.
- MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1943; 138(3); 512–518.
- Nakada K., Sato A., Yoshida K., Morita T., Tanaka H., Inoue S., Yonekawa H., Hayashi J. Mitochondria-related male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2006; 103; 15148–15153.
- Ochsendorf F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update* 1999; 5; 399–420.
- Saleh R.A., Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 2002; 23; 737–752.
- Tafari S, Ciani F, Iorio EL, Esposito L, Cocchia N. 2015. Reactive oxygen species (ROS) and male fertility. In: Wu B, editor. *New Discoveries in Embryology*. London, UK: Intechopen; 19–40.
- Tosic J., & Walton A. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. *Nature* 1946; 158(4014); 485–485.

- Tosic J. & Walton, Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. *Biochemical Journal* 1950; 47(2); 199.
- Vajdovich P., Kriska T., Mézes M., Szabó P.R., Balogh N., Bánfi A., Arany-Tóth A., Gaál T., Jakus redox status of dogs with non-Hodgkin lymphomas. An ESR study. *J. Cancer Letters* 2005; 224(2); 339–346.

Capitolo 2

MACA e riproduzione maschile

2.1 MACA

Lepidium Meyenii Walpers, conosciuto in Sud America come MACA, è una pianta erbacea biennale che cresce quasi esclusivamente nella regione delle Ande del Perù e della Bolivia. MACA cresce tra i 3000-4000 m sul livello del mare, dove la bassa temperatura e i forti venti limitano altre colture, ma può essere coltivata con successo al di fuori del suo habitat naturale.

L'interesse per l'uso di questa pianta è dovuto al suo effetto positivo sulle funzioni riproduttive femminili, sull'osteoporosi, sulla depressione, sull'ansia, sulla memoria, sull'energia e sulle funzioni riproduttive maschili, come la spermatogenesi e l'iperplasia prostatica benigna di diverse specie di mammiferi, uomo compreso (Gonzales et al. 2007; Brooks et al. 2008; Clement et al. 2010a, 2012).

In letteratura, sono descritti 13 fenotipi di MACA caratterizzati da diversi colori degli ipocotili, ovvero il tubero, che vanno dal bianco al nero e che presentano diverse proprietà biologiche (Tello et al. 1992; Gonzales et al. 2005, 2006a; Rubio et al. 2006). Gli effetti più citati sono quelli degli ipocotili di tipo rosso, giallo e nero (Gonzales et al. 2006, 2007, 2009). I dati bibliografici mostrano principalmente come questi tre fenotipi primari di MACA (giallo, rosso e nero) sono in grado di determinare diversi effetti biologici.



Fig. 2.1 MACA rossa, gialla e nera

La parte edibile della pianta è l'ipocotile che può essere consumato sia fresco che essiccato. Gli ipocotili freschi vengono bolliti in acqua per ottenerne un succo o sono sottoposti ad essiccazione secondo le metodiche tradizionali in campi aperti. Gli ipocotili di MACA vengono esposti per circa due mesi a condizione di luce intensa, pressioni atmosferiche tipiche dell'alta quota e a temperature estreme. La farina di Maca può essere ricavata dopo essiccazione e macinazione degli ipocotili (Tafuri et al. 2019).

Le proprietà biologiche di Maca, raccolte in molti studi sperimentali e clinici, rivelano l'importanza di questa pianta come alimento nutraceutico (Valerio e Gonzales 2005; Ciani et al. 2018). Negli ipocotili secchi di Maca, sono presenti alti valori nutrizionali, dati da elementi come carboidrati, proteine, lipidi, aminoacidi essenziali e acidi grassi liberi, noti come metaboliti primari (Gonzales 2012; Tang et al. 2019). Inoltre, Zheng et al. (2000) hanno riportato diversi metaboliti secondari come la macaridina, macamidi, alcaloidi di MACA e glucosinolati, tipici di questa pianta. Proprio questi ultimi sembrano essere i metaboliti responsabili delle proprietà biologiche e medicinali di MACA (Gonzales 2012; Tafuri et al. 2019). In MACA, sono stati ritrovati, inoltre, diversi glucosinolati aromatici come benzil glucosinolati (glucotropaeolina) e m-metossibenzil glucosinolato (Glucolimnathin).

Pertanto, i numerosi effetti biologici di MACA dipendono dal tipo di ipocotile e, di conseguenza, dalle diverse concentrazioni dei metaboliti secondari (Gonzales et al. 2005, 2012; Clement et al. 2010a; Ye et al. 2019). Molti studi riportano effetti positivi di MACA sull'attività sessuale dell'uomo e della donna, sulla libido e sulle prestazioni sessuali (Gonzales et al. 2007, 2012). L'azione afrodisiaca di MACA è stata dimostrata nei ratti e nei topi con disfunzione erettile.

Una dose orale di estratto lipidico purificato di MACA per 22 giorni ha determinato un miglioramento della funzione erettile in tutti gli animali trattati (Zheng et al. 2000). Questo risultato è stato probabilmente attribuito all'azione di alcalamidi, macamidi 1, 2, 3 e 4, isolati e identificati nella radice come riportato da Clement et al. (2010a, 2010b).

MACA modula i sintomi della menopausa non interferendo con la produzione di estrogeni e testosterone (Brooks et al. 2008).

Gonzales et al. (2005) hanno dimostrato che la somministrazione di estratto acquoso di MACA ROSSA è in grado di ridurre la porzione ventrale della prostata in ratti normali e trattati con testosterone enantato.

Inoltre, uno studio su ratti maschi adulti, esposti per 21 giorni ad altitudine di 4340 m sopra il livello del mare e trattati con un estratto acquoso di Maca,

ha mostrato un aumento del numero di spermatozoi e anche una prevenzione dalla distruzione spermatogenetica indotta dall'alta quota. (Gonzales et al. 2004).

I fenotipi di MACA nero e giallo sembrano avere un coinvolgimento nella spermatogenesi, nella memoria e nella fatica, con aumento della memoria e dell'apprendimento nei topi (Rubio et al. 2007).

L'integrazione dietetica con polvere di MACA gialla ha migliorato la produzione spermatica nel cavallo e ne ha migliorato la conservabilità durante la fase di refrigerazione e di stoccaggio (Cocchia et al. 2010; Del Prete et al. 2018).

Particolari metaboliti secondari presenti in MACA sembrano avere un effetto sulla produzione e miglioramento della qualità spermatica (Clement et al. 2010, 2012).

La presenza di glucosinolati e macamidi, consente a MACA di proteggere le cellule dallo SO. I ROS sono prodotti nel corpo dei mammiferi (Ciani et al. 2015; Tafuri et al. 2018); nei testicoli sono prodotti durante i normali processi di spermatogenesi e steroidogenesi. La produzione fisiologica di ROS è coinvolta nella capacitazione, iperattivazione, reazione acrosomiale e fusione spermatozoo-ovocitaria al fine di consentire una fecondazione efficace, mentre elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno causano esaurimento di ATP, perdita della motilità e della vitalità degli spermatozoi (Tafuri et al. 2015).

Gli antiossidanti bloccano gli effetti dannosi derivanti dai ROS, nel caso in cui si verificasse uno stress ossidativo massivo (Costantino et al. 2009; Cocchia et al. 2015; Del Prete et al. 2018b).

2.2 Effetti sulla spermatogenesi

Molti studi hanno riportato che l'assunzione di MACA può aumentare la produzione giornaliera di spermatozoi, la conta spermatica epididimale nei vasi deferenti sia di ratti sani (Gonzales et al. 2001a) che di ratti con disturbi della spermatogenesi indotta da esperimenti (Gonzales et al. 2004; Bustos-Obregon et al. 2005; Rubio et al. 2006).

Gonzales et al. (2001, 2003) hanno osservato, nei ratti maschi, che la somministrazione orale di un estratto acquoso ed estratto etanolic di MACA per 21 giorni migliora la spermatogenesi, agendo sulla mitosi spermatogonale nelle sue fasi iniziali (IX-XIV) e aumentando il peso dei testicoli e degli epididimi. Gli stessi effetti sono stati osservati negli uomini sani trattati per 4 mesi, senza influenzare i livelli sierici di testosterone ed estradiolo (Gonzales et al. 2001b).

Gonzales et al. (2006) hanno mostrato che MACA nera è l'unico fenotipo che aumenta la produzione giornaliera e la motilità spermatica epididimale dopo 42 giorni di trattamento.

I risultati di un altro studio condotto su ratti (Gonzales et al. 2006b) hanno mostrato che, durante un ciclo spermatogenetico (12 giorni), l'estratto acquoso di MACA nera ha migliorato la conta spermatica nell'epididimo già dal primo giorno di trattamento. Questo risultato sembra essere dovuto ad un meccanismo regolatorio di distribuzione degli spermatozoi prodotti nel testicolo, piuttosto che un aumento reale della produzione spermatica.

Gasco et al. (2007) ha eseguito uno studio sulle tre varietà di MACA per valutare gli effetti cronici (84 giorni di trattamento) sulla produzione spermatica giornaliera, sulla conta spermatica epididimale e dei dotti deferenti, ed i livelli totali di DNA nei testicoli di ratti maschi. I risultati hanno confermato che MACA gialla e nera determinano un miglioramento della conta spermatica epididimale e tutti e tre i fenotipi incrementano la conta spermatica nei vasi deferenti senza influenzare la produzione giornaliera di spermatozoi. I livelli di DNA testicolare, invece, non sono stati influenzati dal trattamento di nessuna delle tre varietà.

Gonzales et al. (2013) hanno dimostrato come MACA determina un aumento della conta spermatica epididimale già al giorno 3 post trattamento. Precisamente, sono stati osservati un incremento delle fasi di spermiiazione (VII-VIII), di mitosi delle cellule germinali (IX-XI), di produzione spermatica giornaliera e di conta spermatica epididimale senza che venissero influenzati i livelli di testosterone, dell'ormone luteinizzante (LH) e di quello ormone follicolo-stimolante (FSH).

Il più grande effetto sulla spermatogenesi è stato osservato in seguito a somministrazione di una frazione di acetato di etile di un estratto idroalcolico di MACA nera (Yucra et al. 2008). Nei ratti con danno sperimentale sulla spermatogenesi determinato dall'alta quota, gli estratti acquosi di MACA gialla hanno limitato il danno spermatogenetico (Gonzales et al. 2004), la distruzione spermatogenetica acetato indotta e l'effetto deleterio della somministrazione di Malatione sulla spermatogenesi nei topi (Bustos-Obregon et al. 2005; Rubio et al. 2006) mentre migliora la motilità e la conta spermatica nei topi con subfertilità indotta dopo la somministrazione di ketoconazolo (Valdivia-Cuya et al. 2016). Cuya et al. 2016).

Un'interessante ricerca di Sanchez-Salazar e Gonzales (2018) ha analizzato la conta spermatica nei topi trattati con estratto acquoso bollito di ipocotili di MACA gialla di diverse dimensioni, in diverse condizioni di pH e utilizzando due diverse vie di somministrazione (orale e intraperitoneale). I dati hanno mostrato che il numero di spermatozoi risulti più elevato nei topi che hanno ricevuto MACA in formulazioni di calibro maggiore e che la riduzione del pH dell'estratto di MACA ha incrementato la conta spermatica. Inoltre, lo studio ha dimostrato che la somministrazione orale dell'estratto acquoso degli ipocotili è migliore perché il suo passaggio nel tratto gastrointestinale consente la conversione dei composti presenti in MACA in principi bioattivi con azione terapeutica.

Nei tori, l'integrazione alimentare con MACA per 20 settimane non ha avuto effetti diretti sul peso corporeo, sulla circonferenza dei testicoli, sulla temperatura rettale, sulla libido, sul comportamento nell'accoppiamento e sul volume dell'eiaculato; tuttavia, ha migliorato la quantità di spermatozoi, la qualità e l'indice di frammentazione del DNA (Clement et al. 2010b).

Negli stalloni, l'integrazione alimentare di MACA gialla per 60 giorni, ha migliorato la produzione spermatica e ne ha migliorato la resistenza al raffreddamento e allo stoccaggio, preservando l'acrosoma, l'integrità del DNA e la motilità spermatica totale e progressiva (Del Prete et al. 2015, 2018a; Ciani et al. 2017).

2.3 Effetti sulla ghiandola prostatica

MACA rossa ha dimostrato di ridurre le dimensioni della prostata nei ratti e nei topi con iperplasia indotta da testosterone enantato (Gonzales et al. 2005, 2008). Gonzales et al. (2005) hanno riportato che dopo 42 giorni di trattamento con MACA rossa, il peso della prostata ventrale si è ridotto di oltre il 50% e non ha influenzato l'incremento del peso delle vescicole seminali indotto dal testosterone enantato. È stato anche notato come MACA rossa abbia avuto effetto sulla porzione ventrale della prostata senza modificare i livelli sierici di testosterone o estradiolo, suggerendo così che MACA riesca ad interferire con l'attività androgenica senza alcuna azione diretta sui recettori. Infine, è stato osservato che MACA rossa contrasta l'azione del testosterone enantato più efficientemente del trattamento convenzionale. (Gasco et al. 2007).

Un altro studio ha dimostrato che l'n-butanolo e la frazione acquosa dell'estratto metanolico di MACA rossa ha avuto un differente effetto nei topi con iperplasia prostatica benigna testosterone indotta. La frazione di n-butanolo, ma non la frazione acquosa dell'estratto metanolico riducono la dimensione della prostata nell'iperplasia prostatica benigna.

L'effetto di MACA rossa sull'iperplasia prostatica benigna sembra correlato al contenuto di benzil glucosinolato. Sia l'estratto acquoso che quello alcolico di MACA rossa hanno mostrato alcune somiglianze negli effetti provocati. Entrambi gli estratti di MACA, infatti, hanno ridotto il peso della prostata nei ratti con iperplasia prostatica indotta da testosterone enantato (Gonzales et al. 2007).

2.4 Effetti sulla libido sessuale

Nel 2000, Zheng et al. hanno dimostrato per la prima volta l'attività afrodisiaca di MACA (Zheng et al. 2000).

L'estratto lipidico di Maca, somministrato per 22 giorni, ha aumentato il numero di rapporti e il numero di gravidanze in topi normali e una diminuzione dell'intervallo di tempo tra due possibili erezioni nei ratti maschi con disfunzione erettile.

Cicerone et al. (2001) hanno scoperto che la somministrazione orale di ipocotili polverizzati di MACA a diverse dosi per 21 giorni nei ratti ha stimolato positivamente il comportamento sessuale, sia durante trattamenti acuti che cronici, indipendentemente dalla sua azione sulla attività locomotoria spontanea.

Al contrario, Lentz et al. (2007) non ha rilevato nessun significativo cambiamento nel comportamento sessuale maschile durante i trattamenti acuti, a breve e lungo termine, dal primo all'ultimo giorno di trattamento con la polvere di MACA.

L'azione afrodisiaca è stata dimostrata in ratti e topi con disfunzione erettile che sono stati trattati con una dose orale di estratto lipidico di MACA purificato per 22 giorni. Dopo il trattamento, un miglioramento dell'erezione è stato osservato in tutti gli animali trattati. Questo risultato è stato attribuito all'azione di quattro alcaloidi, le macaine 1, 2, 3 e 4, isolati e identificati nella radice (Clement et al. 2012).

Lavana et al. (2013) hanno studiato per la prima volta l'effetto dell'integrazione di MACA su alcune caratteristiche della libido e del seme dei montoni di pecora (*Ovis aries*). L'esperimento ha mostrato un aumento del numero di accoppiamenti senza interessamento delle caratteristiche seminali.

In letteratura, è presente uno studio clinico randomizzato in doppio cieco controllo-placebo, in cui, per 12 settimane, sono stati somministrati trattamenti attivi con differenti dosi di MACA gelatinizzata a uomini e successiva comparazione col placebo. La ricerca ha rivelato un miglioramento del desiderio sessuale a 8 e 12 settimane di trattamento e non ha influito sui livelli sierici di testosterone e di estradiolo (Gonzales et al. 2002, 2003). MACA, inoltre, ha migliorato l'umore, l'ansia ed incrementato l'attività fisica. (Gonzales 2006).

Un secondo studio clinico randomizzato in doppio cieco eseguito su uomini con lieve disfunzione erettile, trattati con MACA per 12 settimane, ha

mostrato un miglioramento sulla percezione soggettiva del benessere generale e sessuale (Zenico et al. 2009).

Gonzales-Arimborgo et al. (2016) hanno dimostrato che il consumo di uno spray all'estratto di MACA rossa e nera per 12 settimane ha comportato un miglioramento dello stato d'animo, di energia e di salute nell'uomo. Gli effetti sull'umore e sull'energia sono risultati migliori con l'estratto secco di MACA rossa.

2.5 Conclusioni

Nella società contemporanea, la disfunzione sessuale maschile è un grave problema di salute pubblica che influenza negativamente le relazioni e la salute psicologica. In particolare, la disfunzione erettile è in aumento nell'uomo di tutte le età ed è correlata, tra le molteplici cause, ad uno stile di vita malsano (Abdulsalam et al.2019).

A causa dei molteplici effetti collaterali legati ai farmaci utilizzati per migliorare la funzione sessuale, oggi si rinvia un sempre maggiore interesse per le terapie alternative.

MACA è usata da secoli come integratore alimentare per le sue incredibili proprietà nutritive e mediche. Negli ultimi decenni, l'interesse per MACA è aumentato e lo ha reso un nutraceutico di grande fama per i suoi benefici sulla salute. Per questo motivo, MACA viene esportata in tutto il mondo come polvere, capsule, pillole, farina, liquore ed estratti.

MACA ha mostrato effetti sul comportamento sessuale, sulla fertilità, sull'umore, sulla memoria, sull'osteoporosi, sul metabolismo e sul trattamento di alcune malattie cardiovascolari e tumorali. Parecchie ricerche suggeriscono che ai diversi fenotipi di MACA sono associati diversi effetti biologici e target medici. Ad esempio, la varietà di MACA rossa agisce sull'iperplasia prostatica benigna nei topi, sperimentalmente sull'osteoporosi indotta (Gonzales et al. 2014) e sulla conta spermatica, migliorandone i parametri (Gonzales et al. 2006b).

MACA nera e gialla mostrano migliori risultati sulla spermatogenesi, sulla memoria, sull'affaticamento, con un aumento di memoria e apprendimento nei topi (Rubio et al. 2007). Inoltre, MACA nera riduce i livelli di glucosio, abbassa la pressione sanguigna e determina un miglioramento della salute generale dei soggetti trattati. (Gonzales et al. 2013b).

Quindi si può concludere dicendo che gli effetti di MACA dipendono da molteplici fattori, quali diversi fenotipi, regione di coltivazione, tempo di raccolta, processazione cui è sottoposto il prodotto, varietà e proporzione dei suoi composti bioattivi.

- Ghadiri MK, and Gorji A. Natural remedies for impotence in medieval Persia. *International journal of impotence research* 2004, 16(1), 80-83.
- Abdulsalam A, Abubakar U, Abdulkadir M, Opara JA, Ajibol OF. 2019. Role of exercise, fitness and nutrition in prevention of male sexual dysfunction. *Int J Stu Adv Med Sci.* 1(1):22–28.
- Brooks NA, Wilcox G, Walker KZ, Ashton JF, Cox MB, Stojanovska L. 2008. Beneficial effects of *Lepidium Meyenii* (Maca) on psychological symptoms and measures of sexual dysfunction in postmenopausal women are not related to estrogen or androgen content. *Menopause.* 15(6): 1157–1162.
- Bustos-Obregon E, Yucra S, Gonzales GF. 2005. *Lepidium Meyenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice. *Asian J Androl.* 7:71–76.
- Ciani F, Cocchia N, d'Angelo D, Tafuri S. 2015. Influence of ROS on Ovarian Functions. In: Wu B, editor. *New discoveries in embryology.* London, UK: Intechopen; 41–73.
- Ciani F, Cocchia N, Del Prete C, Palumbo V, Carotenuto D, Pasolini MP, Tafuri S. 2017. Sperm cromatin integrity in stallions with *Lepidium Meyenii* (Maca) dietary supplementation. *Reprod Domest Anim.* 52(3):77.
- Ciani F, Tafuri S, Troiano A, Cimmino A, Fioretto BS, Guarino AM, Pollice A, Vivo M, Evidente A, Carotenuto D, Calabro. 2018. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of *Uncaria tomentosa* aqueous extract in squamous carcinoma cells. *J Ethnopharmacol.* 211:285–294.
- Cicero AFG, Bandieri E, Arletti R. 2001. *Lepidium Meyenii* Walp. Improves sexual behavior in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *J Ethnopharmacol.* 75(2–3):225–229.
- Cicero AFG, Piacente S, Plaza A, Sala E, Arletti R, Pizza C. 2002. Hexanic MACA extract improves rat sexual performance more effectively than methanolic and chloroformic MACA extracts. *Andrologia.* 34(3):177–179.
- Clement C, Diaz Grados DA, Avula B, Khan IA, Mayer AC, Ponce Aguirre DD, Manrique I, Kreuzer M. 2010b. Influence of colour type and previous cultivation on secondary metabolites in hypocotyls and leaves of MACA (*Lepidium Meyenii* Walpers). *J Sci Food Agric.* 90(5):861–869.
- Clement C, Kneubuhler J, Urwler A, Witschi U, Kreuzer M. 2010a. Effect of MACA supplementation on bovine sperm quantity and quality followed over two spermatogenic cycles. *Theriogenology.* 74:173–183.

- Clement C, Witschi U, Kreuzer M. 2012. The potential influence of plant-based feed supplementson sperm quantity and quality in livestock: A review. *Anim Reprod Sci.* 132:1–10.
- Cocchia N, Ciani F, El-Rass R, Russo M, Borzacchiello G, Esposito V, Montagnaro S, Avallone L, Tortora G, Lorzio R. 2010. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote.* 18(1):1–8.
- Cocchia N, Corteggio A, Altamura G, Tafuri S, Rea S, Rosapane I, Sica A, Landolfi F, Ciani F. 2015. The effects of superoxide dismutase addition to the transport medium on cumulus-oocyte complex apoptosis and IVF outcome in cats (*Felis catus*). *Reprod Biol.* 15(1):56–64.
- Costantino M, Giuberti G, Caraglia A, Caraglia M, Lombardi A, Misso G, Abbruzzese A, Ciani F, Lampa E. 2009. Possible antioxidant role of SPA therapy with chlorine-sulphur-bicarbonate mineral water. *Amino Acids.* 36(2):161–165.
- Del Prete C, Ciani F, Tafuri S, Pasolini MP, Della Valle G, Palumbo V, Abbondante L, Calamo A, Barbato V, Gualtieri R, et al. 2018. Effect of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase supplementation in the extender on chilled semen of fertile and hypofertile dogs. *J Vet Sci.* 19(5):667–675.
- Del Prete C, Cocchia N, Ciani F, Tafuri S, Carotenuto D, Napoleone G, Pasolini MP. 2015. Influence of diet supplementation with *Lepidium Meyenii* on quality of cooled equine semen. *Reprod Domest Anim.* 50(3):27–32.
- Del Prete C, Tafuri S, Ciani F, Pasolini MP, Ciotola F, Albarella S, Carotenuto D, Peretti V, Cocchia N. 2018. Influences of dietary supplementation with *Lepidium Meyenii* (Maca) on stallion sperm production and on preservation of sperm quality during storage at 5 C. *Andrology.* 6(2):351–361.
- Fano D, Vasquez-Velasquez C, Gonzales-Castañeda C, Guajardo-Correa E, Orihuela PA, Gonzales GF. 2017. N-Butanol and aqueous fractions of red MACA methanolic extract exerts opposite effects on androgen and oestrogens receptors (alpha and beta) in rats with testosteroneinduced benign prostatic hyperplasia. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017:1.
- Gasco M, Aguilar J, Gonzales GF. 2007. Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium Meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. *Androl.* 39(4):151–158.

- Gasco M, Villegas L, Yucra S, Rubio J, Gonzales GF. 2007. Dose-response effect of Red MACA (*Lepidium Meyenii*) on benign prostatic hyperplasia induced by testosterone enanthate. *Phytomed.* 14(7–8):460–464.
- Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. 2006. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium Meyenii* (Maca) on spermatogenesis in rats. *J Ethnopharmacol.* 103(3):448–454.
- Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. 2006. Effect of Black MACA (*Lepidium Meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. *Andrologia.* 38(5):166–172.
- Gonzales GF, Cordova A, Gonzales C, Chung A, Vega K, Villena A. 2001. *Lepidium Meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian J Androl.* 3(4):301–303.
- Gonzales GF, Cordova A, Vega K, Chung A, Villena A, Gonez C, Castillo S. 2002. Effect of *Lepidium Meyenii* (Maca) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. *Andrology.* 34(6):367–372.
- Gonzales GF, Cordova A, Vega K, Chung A, Villena A, Gonez C. 2003. Effect of *Lepidium Meyenii* (Maca) a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *J Endocrinol.* 176(1):163–168.
- Gonzales GF, Gasco M, Cordova A, Chung A, Rubio J, Villegas L. 2004. Effect of *Lepidium Meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). *J Endocrinol.* 180(1):87–95.
- Gonzales GF, Gasco M, Malheiros-Pereira A, Gonzales-Castaneda C. 2008. Antagonist effect of *Lepidium Meyenii* (Red Maca) on prostatic hyperplasia in adult mice. *Andrology.* 40(3): 179–185.
- Gonzales GF, Gonzales C, Gonzales-Castaneda C. 2009. *Lepidium Meyenii* (Maca): A Plant from the Highlands of Peru – from Tradition to Science. *Forsch Komplementmed.* 16(6):373–380.
- Gonzales GF, Gonzales-Castaneda C, Gasco M. 2013. A mixture of extracts from Peruvian plants (Black MACA and yacon) improves sperm count and reduced glycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Toxicol Mech Methods.* 23(7):509–518.
- Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, Fernandez G, Yucra S, Rubio J, Yi P, Gasco M. 2005. Red MACA (*Lepidium Meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 3:1–5.

- Gonzales GF, Rubio J, Chung A, Gasco M, Villegas L. 2003. Effect of alcoholic of *Lepidium Meyenii* (Maca) on testicular function of male rats. *Asian J Androl.* 5(4):349–352.
- Gonzales GF, Ruiz A, Gonzales C, Villegas L, Cordova A. 2001. Effect on *Lepidium Meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis in male rats. *Asian J Androl.* 3(3):231–233.
- Gonzales GF, Vasquez V, Rodriguez D, Maldonado C, Mormontoy J, Portella J, Pajuelo M, Villegas L, Gasco M, Mathur PP. 2007. Effect of two different extract of Red MACA in male rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. *Asian J Andrology.* 9(2):245–251.
- Gonzales GF, Vasquez VB, Gasco M. 2013. The transillumination technique as a method for the assessment of spermatogenesis using medicinal plants: the effect of extracts of Black MACA (*Lepidium Meyenii*) and camu camu (*Myrciaria dubia*) on stages of the spermatogenic cycle in male rats. *Toxicol Mech Methods.* 23(8):559–565.
- Gonzales GF, Villaorduna L, Gasco M, Rubio J, Gonzales C. 2014. MACA (*Lepidium Meyenii* Walp), una revision sobre sus propiedades biológicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 31(1): 100–110.
- Gonzales GF. 2006c. Biological effects of *Lepidium Meyenii*, Maca, a plant from the highlands of Peru. In: Singh VK, Boardwalk R, Govil JN, Sharma RK, editors. *Natural Products. Series: Recent Progress in Medical Plants.* India: Stadium Press; 15:217–242.
- Gonzales GF. 2012. Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium Meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012:193496.
- Gonzales-Arimborgo C, Yupanqui I, Montero E, Alarcon-Yaquette D, Zevallos-Concha A, Caballero L, Gasco M, Zhao J, Khan I, Gonzales GF. 2016. Acceptability, safety, and efficacy of oral administration of extracts of black or red MACA (*Lepidium Meyenii*) in adult human subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Pharmaceuticals (Basel).* 9(3):49.
- Lavana A, Vazquez R, Palma-Irizarry M, Orihuela A. 2013. Effect of MACA (*Lepidium Meyenii*) supplementation on some libido and semen characteristics in hair sheep rams (*Ovis aries*). *B Latinoam Caribe Pl.* 12(3):238–242.
- Lentz A, Gravitt K, Carson CC, Marson L. 2007. Acute and chronic dosing of *Lepidium Meyenii* (Maca) on male rat sexual behavior. *J Sex Med.* 4(2):332–339.

- Rubio J, Dang H, Gong M, Liu X, Chen SL, Gonzales GF. 2007. Aqueous and hydroalcoholic extracts of Black MACA (*Lepidium Meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice. *Food Chem Toxicol.* 45(10):1882–1890.
- Rubio J, Riqueros MI, Gasco M, Yucra S, Miranda S, Gonzales GF. 2006. *Lepidium Meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol.* 44(7):1114–1122.
- Sanchez-Salazar L, Gonzales GF. 2018. Aqueous extract of Yellow MACA (*Lepidium Meyenii*) improves sperm count in experimental animals but response depends on hypocotyl size, pH and routes of administration. *Andrologia.* 50(3):e12929.
- Tafari S, Cocchia N, Vassetti A, Carotenuto D, Esposito L, Maruccio L, Avallone L, Ciani F. 2019. *Lepidium meyenii* (Maca) in male reproduction, *Natural Product Research*,
- Tafari S, Ciani F, Iorio EL, Esposito L, Cocchia N. 2015. Reactive oxygen species (ROS) and male fertility. In: Wu B, editor. *New Discoveries in Embryology*. London, UK: Intechopen; 19–40.
- Tafari S, Cocchia N, Carotenuto D, Vassetti A, Staropoli A, Mastellone V, Peretti V, Ciotola F, Albarella S, Del Prete C, et al. 2019. Chemical analysis of *Lepidium Meyenii* (Maca) and its effects on redox status and on reproductive biology in stallions. *Molecules.* 24(10):1981.
- Tafari S, Marullo A, Ciani F, Della Morte R, Montagnaro S, Fiorito F, De Martino L. 2018. Reactive oxygen metabolites in alpha-herpesvirus-seropositive Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*): a preliminary study. *Pol J Vet Sci.* 21(3):639–642.
- Tang Y, Zhu ZY, Pan LC, Sun H, Song QY, Zhang Y. 2019. Structure analysis and anti-fatigue activity of a polysaccharide from *Lepidium Meyenii* Walp. *Nat Prod Res.* 33(17):2480–2489.
- Tello J, Hermann M, Calderon A. 1992. La MACA (*Lepidium Meyenii* Walp.): Cultivo Alimenticio Potencial para las Zonas Altoandinas. *Boletín de Lima.* 81:59–66.
- Valdivia-Cuya M, Yarasca D, Levano-Sanchez G, Vasquez CJ, Temoche-Garcia H, Torres-Torres L, Cruz-Ornetta V. 2016. Effect of *Lepidium Meyenii* (Maca) on testicular function of mice with chemically and physically induced subfertility. *Andrologia.* 48:927–934.
- Valerio LG, Jr, Gonzales GF. 2005. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and MACA (*Lepidium Meyenii*): a critical synopsis. *Toxicol Rev.* 24(1):11–35.

- Yucra S, Gasco M, Rubio J, Nieto J, Gonzales GF. 2008. Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black MACA (*Lepidium Meyenii*) on testicular function in adult male rats. *Fertil Steril*. 89(5):1461–1467.
- Zenico T, Cicero AFG, Valmorri L, Mercuriali M, Bercovich E. 2009. Subjective effects of *Lepidium Meyenii* (Maca) extract on well-being and sexual performances in patients with mild erectile dysfunction: a randomised, double-blind clinical trial. *Andrologia*. 41(2):95–99.
- Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Shao Y, Huang ZY, Lu Y, Yan SJ, Qien LC, Zheng QY. 2000. Effect of a lipidic extract from *Lepidium Meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*. 55(4):598–602.

Capitolo 3

Cannabinoidi e riproduzione maschile

3.1 *Cannabis Sativa*

La cannabis è la droga di uso più comune su scala mondiale. Negli ultimi decenni, vi è stato un notevole aumento nell'uso di cannabis, in particolare tra i giovani di età inferiore ai 35 anni. In concomitanza con l'aumento dell'uso di cannabis, è stata registrata una diminuzione delle caratteristiche quali-quantitative spermatiche e, di conseguenza, una riduzione dei tassi di concepimento rispetto alle generazioni precedenti. In particolare, ad oggi si conoscono gli effetti della cannabis sui marker clinici della fertilità maschile e si sta rivalutando il ruolo del sistema endocannabinoide sulla produzione di ormoni sessuali e spermatozoi.

La Cannabis (Linnaeus, 1753) o canapa è una pianta appartenente al genere *angiosperme* della famiglia delle *Cannabaceae*. Attualmente, secondo alcuni comprende un'unica specie, la *Cannabis Sativa*, la pianta storicamente più diffusa in occidente, a sua volta comprendente diverse varietà e sottospecie; secondo altri invece si distinguono tre specie, *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* e *Cannabis ruderalis* (Schultes et al. 1974; Anderson, 1974; Anderson, 1980).

Tuttavia, le tre specie si incrociano e i loro confini risultano poco chiari. È stato proposto di riconoscere, pertanto, una sola specie di cannabis, ovvero *Cannabis Sativa*. Un aspetto comune di tutte le piante di cannabis è la presenza di composti secondari chiamati “cannabinoidi”, più precisamente “fitocannabinoidi”. Oggigiorno si conoscono oltre 100 diversi fitocannabinoidi, che sono prodotti principalmente in tricomi che crescono sull'inflorescenza femminile di cannabis. Tuttavia, tra le varie tipologie di cannabis, il profilo e la quantità di fitocannabinoidi varia enormemente. Per questo motivo, diversi autori hanno proposto di classificare le varietà di Cannabis secondo i loro fenotipi chimici in “chemotipi” con distinti profili cannabinoidi.

Originaria dell'Asia centrale e sacra per la gente hindu, la pianta era indicata in sanscrito con i termini *bhanga*, *vijaya* e *ganjika*; in hindi, *ganja* (Johntal, 2009). È generalmente accettata l'ipotesi secondo cui la canapa sia giunta nelle Americhe dopo Colombo; tuttavia alcuni scienziati hanno trovato residui di cannabis, tabacco e foglie di coca in numerose mummie (1500 d.C.) scoperte in Perù (Clarke et al. 2013; Johntal. 2009).

La canapa è una pianta erbacea a ciclo annuale la cui altezza varia tra 1,5 e 6 metri, anche se alcune sottospecie hanno altezze finali che variano tra 0,5 (*Cannabis ruderalis*) e 5 metri (*Cannabis Sativa*).

Presenta una lunga radice a fittone ed un fusto, eretto o ramificato, con escrescenze resinose, angolate, a volte cave, specialmente al di sopra del primo paio di foglie.



Fig. 3.1 *Cannabis Sativa*

Le foglie sono picciolate e provviste di stipole; ciascuna di esse è palmata, composta da 5 a 13 foglioline lanceolate, a margine dentato-seghettato, con punte acuminate fino a 10 cm di lunghezza e 1,5 cm di larghezza; nella parte bassa del fusto le foglie si presentano opposte, nella parte alta invece tendono a crescere alternate, soprattutto dopo il nono/decimo nodo della pianta, ovvero a maturazione sessuale avvenuta, dopo la fase vegetativa iniziale, nota popolarmente come “levata”. Le piante di canapa sono sia monoiche, utili per la produzione di semi a uso alimentare, sia dioiche. I fiori maschili, chiamati staminiferi, sono riuniti in pannocchie terminali e ciascuno presenta 5 tepali fusi alla base e 5 stami. I fiori femminili, chiamati pistilliferi, sono riuniti in gruppi di 2-6 alle ascelle di brattee formanti corte spighe; ognuno mostra un calice membranaceo che avvolge strettamente un ovario superiore e uniloculare sormontato da due stili e due stimmi.

La pianta germina in primavera e fiorisce in estate inoltrata, quando le ore di luce diminuiscono. È stato dimostrato che la durata del periodo vegetativo

è influenzata dal fotoperiodo cui le piante vengono sottoposte; l'unica specie di *Cannabis* la cui fioritura non dipende dal fotoperiodo è la *Cannabis ruderalis*, la cui fioritura avviene automaticamente dopo un periodo di crescita vegetativa variabile tra 21 e 30 giorni circa, e si protrae per un arco di tempo di 4-6 settimane. Il periodo di fioritura varia molto a seconda delle specie e delle varietà considerate: piante di *Cannabis Sativa*, originarie della fascia equatoriale, tendono ad avere una fioritura molto duratura, fino a 14-16 settimane e oltre in alcune varietà, mentre varietà di *Cannabis indica*, che ha origine nella fascia subtropicale/temperata, solitamente richiedono circa 8-10 settimane per portare le infiorescenze a maturazione. L'impollinazione è anemofila (trasporto tramite il vento). In autunno compaiono i frutti, degli acheni duri e globosi, ciascuno trattenente un seme con un endosperma carnoso ed embrione curvo.

Il contenuto di metaboliti secondari vincola la tassonomia in due sottogruppi o chemiotipi a seconda dell'enzima preposto nella biosintesi dei cannabinoidi. Si distingue il chemiotipo cannabidiolo (CBD), caratterizzato dall'enzima CBDA-sintetasi che contraddistingue la canapa destinata a usi agroindustriali e terapeutici e il chemiotipo tetraidrocannabinolo (THC) caratterizzato dall'enzima THCA-sintetasi presente nelle varietà di cannabis destinate a produrre infiorescenze e medicamenti. L'ibrido *fi* manifesta la contemporanea presenza di entrambi i maggiori cannabinoidi CBD e THC confermando l'aspetto politipico della cannabis.

La struttura chimica dei cannabinoidi può essere descritta come quella di un terpene unito a un resorcinolo a sostituzione alchilica, oppure come quella di un sistema ad anello benzopiranic. Le due descrizioni implicano anche una nomenclatura differente; con la prima, il principale cannabinoide viene definito come delta-1-tetraidrocannabinolo (Δ -1-THC) mentre con la seconda diventa delta-9-tetraidrocannabinolo (Δ -9-THC).

Il cannabinoide più famoso è il THC, noto per il suo effetto psicotropo. La presenza di THC classifica la pianta come “*Canapa*” o “*Marijuana*”. Questa classificazione non rispecchia la classificazione tassonomica, né filogenetica, ma riguarda semplicemente le restrizioni legislative in materia di stupefacenti. Le varietà di Marijuana presentano alti livelli di THC, possono raggiungere livelli fino al 20-30% nella massa secca della femmina. Tuttavia, se il contenuto di THC di una pianta è inferiore allo 0,3% nella massa dell'infiorescenza essiccata (la legislazione varia dallo 0,2 all'1% a seconda del paese) e il suo consumo pertanto non ha effetti allucinogeni, la pianta è considerata canapa.

In generale, le varietà di marijuana hanno più alti livelli di cannabinoidi e producono molti fiori e rami laterali.

D'altra parte, le piante di canapa di solito presentano un contenuto complessivo di cannabinoidi inferiore, presentano meno rami laterali e si sviluppano in altezza, vista la loro produzione di fibre. Tuttavia, questa distinzione non è universale perché nuove ricerche hanno generato piante di canapa a forma di marijuana con bassi livelli di THC.



Fig. 3.2 Piantagione di Canapa e Marijuana

Il fitocannabinoide THC è stato il primo composto psicoattivo isolato ed identificato negli anni '60. Tuttavia, solo negli anni '80 si è scoperto che l'uomo possedesse un sistema endocannabinoide con recettori nel sistema nervoso centrale e periferico.

A causa delle sue molteplici influenze sul corpo umano, diverse varietà di cannabis sono state usate per millenni per scopi ricreativi, religiosi, spirituali e medici. La cannabis è stata usata per il trattamento dell'epilessia in Medio Oriente e durante i rituali funebri nella Cina occidentale.

Il consumo di Cannabis è stato vietato nell'ultimo secolo, quando molti paesi hanno classificato il THC come farmaco con un alto potenziale dannoso e senza una vera applicazione medica. Invece, molte ricerche dimostrano come prodotti contenenti THC possano essere utilizzati per il trattamento del dolore, della nausea e del vomito in pazienti con sclerosi multipla, cancro o sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Farmaci a base di cannabis possono avere un potenziale terapeutico per molte malattie, come il disturbo da stress post-traumatico, la sindrome di

Tourette e i disturbi del sonno. Questa è la ragione per cui in molti paesi si sta sempre più legalizzando l'uso di marijuana medica come di quella ricreativa.

Fitocannabinoidi diversi dal THC, come il CBD e il cannabigerolo (CBG) hanno ricevuto sempre più spesso l'attenzione pubblica e scientifica. Questi composti possono avere effetti benefici su ansia e depressione, pur mancando gli effetti collaterali della loro molecola allucinogena sorella.

Il CBD è stato approvato per il trattamento di alcuni tipi di epilessia negli Stati Uniti e sono presenti molti altri studi di ricerca medica in corso.

Nel corpo umano, THC e altri composti cannabinoidi trovati nel sistema endocannabinoide della cannabis (ECS), si legano ai recettori cannabinoidi tipo 1/2 (CB1 e CB2) (Pertwee, 1997). Recettori per ECS sembrano essere ampiamente diffusi nei tessuti vitali per la riproduzione maschile, con recettori CB1/CB2 espressi nell'ipotalamo, nell'ipofisi, nelle cellule del Leydig, nelle cellule del Sertoli, nei vasi deferenti e negli spermatozoi (McPartland et al. 2007). Studi riguardanti i gameti dei ricci di mare hanno dimostrato come i cannabinoidi potevano avere direttamente un'influenza sulla fertilità (Schuel H et al. 2002). Le conoscenze acquisite da allora su come i cannabinoidi, sia esogeni che endogeni, possano influire sulla fertilità sono riassunti nella figura 3.3.

Come il THC possa influenzare la fertilità è stato evidenziato mediante lo studio dell'effetto degli antagonisti endogeni di ECS sugli spermatozoi e sulle cellule di supporto degli spermatozoi, come le cellule del Sertoli e le cellule a rilascio ormonale. L'agonista per eccellenza dell'ECS è anandamide, o arachidonoiletanolammide (AEA) (Pertwee et al. 2002).

Diversi studi in vitro nell'uomo, hanno fornito evidenza che il plasma seminale, il fluido oviduttale a ciclo medio e il liquido follicolare contengono AEA e che lo sperma umano esprime il recettore CB1 (Gye et al. 2005). Inoltre, è stato dimostrato che basse concentrazioni di un promotore analogo di AEA e alte concentrazioni di questo stesso analogo inibiscono la motilità iperattiva (HA) che consente agli spermatozoi di penetrare la zona pellucida dell'ovocita. Infine, studiando gli effetti di un analogo AEA sulla capacitazione, l'esposizione di spermatozoi ad analoghi di AEA determina una riduzione complessiva del legame con la zona pellucida.

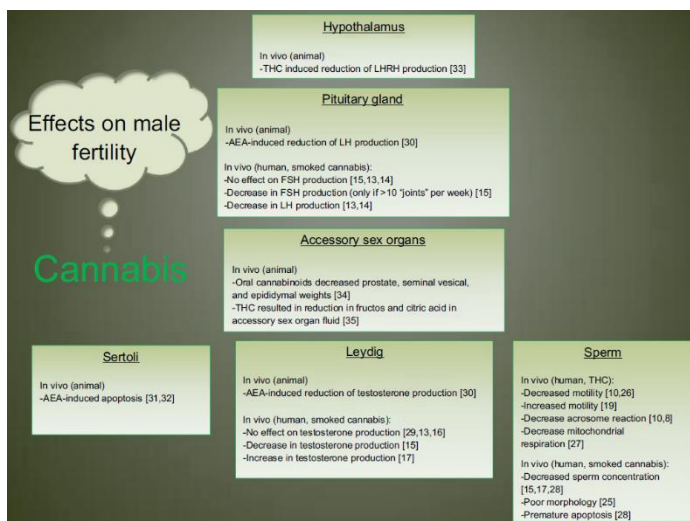


Fig. 3.3 Azione della Cannabis nell'uomo. AEA = arachidoniletanolammide; FSH = Ormone Follicolo Stimolante; LH = Ormone Luteinizzante; LHRH = Ormone Di Rilascio Ipotalamico Delle Gonadotropine; THC = Tetraidrocannabinolo (Hsiao, 2018)

Studi successivi associati ad una diminuzione di AEA nel plasma seminale di uomini con oligoastenotetrazoospermia e astenozoospermia sono stati comparati con uomini con normozoospermia (Ricci et al. 2007). Questi studi dimostrano come i cannabinoidi endogeni possano influenzare gli spermatozoi in maniera dose-dipendente e poiché il THC ha una lunga emivita nell'uomo, vi è la preoccupazione che l'aggiunta di THC esogena da consumo di cannabis possa inondare il sistema endogeno e produrre effetti dannosi. Rossato et al. nel lavoro pubblicato nel 2005, hanno cercato di chiarire l'impatto del THC sulla funzione spermatica incubandolo dosi di sperma con diverse concentrazioni di THC. Questo lavoro ha dimostrato che il THC ha prodotto una riduzione dose-dipendente del numero di spermatozoi progressivamente motili (riduzione del 2–21%) e un'inibizione significativa della reazione acrosomiale spontanea.

Altri cannabinoidi trovati nella cannabis, come il CBD, hanno dimostrato di inibire la reazione acrosomiale nel modello riccio di mare e di ridurre il

testosterone, la spermatogenesi e le cellule del Sertoli nel modello murino (Cobellis et al. 2006; Schuel et al. 1994). Sfortunatamente, nessuno studio clinico sull'uomo ha studiato l'effetto del CBD solo sulla funzione spermatica o sulla produzione di ormoni. Complessivamente, sono stati condotti studi molecolari e in vitro che hanno dimostrato chiaramente che l'ECS ha un ruolo nel modulare la fertilità influenzando direttamente la motilità spermatica, la spermatogenesi, la capacitazione e la reazione acrosomiale. L'aggiunta di cannabinoidi esogeni attraverso l'uso di cannabis, pertanto, può alterare queste attività spermatiche.

L'impatto dei cannabinoidi endogeni ed esogeni sulla fertilità negli uomini va probabilmente oltre gli effetti sugli spermatozoi e sul plasma seminale. In effetti, i primi lavori su questo argomento si sono concentrati sull'ECS in relazione all'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo. Studi in vitro e su animali su come l'ECS può influenzare l'ipofisi anteriore, le cellule di Leydig, e le cellule del Sertoli sono riassunte nella Figura 3.3.

Sebbene studi sui meccanismi molecolari determinati dalla cannabis sulle funzioni riproduttive siano importanti, sono altrettanto importanti le conoscenze degli effetti dell'uso di cannabis su parametri clinicamente oggettivi, come il testosterone, i parametri di produzione e di analisi del materiale seminale. Negli anni '90, il consumo di cannabis era stato utilizzato per studiare gli effetti sul sistema ormonale e i parametri del materiale seminale. Diversi studi, hanno evidenziato come al consumo di cannabis non era associato un cambiamento dell'ormone follicolo-stimolante (FSH), e una diminuzione della produzione dell'ormone luteinizzante (LH) (Foresta et al. 2000; Foresta et al. 1999; Kolodny et al. 1974). Gli studi sui livelli di testosterone hanno evidenziato pareri discordanti perché in alcuni si è evidenziato un calo della produzione di testosterone tra consumatori abitudinari di cannabis (una differenza di circa 400 ng/dl rispetto ai controlli), in altri invece non è stato evidenziato cambiamento (Park et al. 2004). Tuttavia, questi studi hanno significative limitazioni poiché effettuati su un piccolo campione e la somministrazione di cannabis avveniva tramite sigarette con concentrazioni diverse di THC (Foresta et al. 2000; Foresta et al. 1999; Park B et al. 2004) perché in parte perso tramite la combustione. È interessante notare che in un contemporaneo studio di coorte basato su questionari, con una popolazione di 1200 uomini, si è evidenziato che all'uso di marijuana, attraverso le sigarette, si è associato un aumento dei livelli di testosterone (Wenger et al. 1987). Di conseguenza, l'impatto della cannabis sulla produzione degli ormoni maschili è ancora poco noto.

I recettori CB1/CB2 sono stati trovati nel tessuto testicolare e nello spermatozoo stesso (CB1). Inoltre, è stato dimostrato che il THC si ritrova nel tessuto testicolare dei ratti dopo inalazione (Hembree et al. 1978). Per questo motivo, si pensa che la cannabis possa determinare effetti negativi sulla capacità del testicolo di produrre spermatozoi utili alla fecondazione. L'effetto della cannabis può avere un ruolo indiretto sulla fertilità maschile. Ci sono stati pochi studi completi circa gli effetti della cannabis sul comportamento sessuale, anche se il consenso generale sembra essere quello che basse dosi di cannabis abbiano effetti positivi sull'eccitazione sessuale (Gammon et al. 2005; Wenger et al. 1999). Tuttavia, un uso cronico ha manifestato disfunzione erettile e difficoltà a raggiungere l'orgasmo (Maccarrone et al. 2002; Brinster, 2007). Visti questi risultati contraddittori e anche i suoi probabili effetti sulla concentrazione spermatica, è difficile giustificare l'uso di cannabis in coppie sterili per migliorare la copulazione. Studi che valutano i parametri di analisi del seme associati all'uso di cannabis indicano concentrazioni inferiori di spermatozoi. Per cui, fino a prova contraria, è ragionevole consigliare ai pazienti che la cannabis abbia un effetto dannoso sul potenziale riproduttivo maschile.

3.2 Effetti sull'asse Ipotalamo-Ipofisi-Testicolo

La spermatogenesi è un processo lungo e complesso controllato da diversi meccanismi (Foresta et al. 2000). Le gonadotropine (FSH e LH) svolgono un ruolo cruciale nell'induzione e nel mantenimento della spermatogenesi nei mammiferi incluso l'uomo (Foresta et al. 1999), con un effetto positivo sulle cellule del Sertoli e di Leydig.

È noto che nei maschi il fumo di cannabis riduce i livelli di LH nel plasma, con conseguente riduzione del testosterone plasmatico (Kolodny et al. 1974), sebbene siano stati riportati risultati contraddittori (Park et al. 2004). Anche la secrezione di FSH può essere modulata dai cannabinoidi (Wenger et al. 1987) e gli effetti combinati sulle gonadotropine hanno determinato una riduzione della conta spermatica nei maschi, frequentemente osservata in uomini fumatori di cannabis (Hembree et al. 1978).

Sembra che gli effetti dei cannabinoidi sulla secrezione delle gonadotropine sia localizzato a monte dell'ipofisi e, in particolare, a livello dell'area preottica dell'ipotalamo in cui sono presenti *Cannabinoid Receptor Gene 1* (1) e dove avviene il rilascio del *LH Releasing Hormone* (LHRH) (Matsuda et al. 1993). A questo livello, i cannabinoidi sembrano modulare negativamente l'attività dei neuroni che secernono LHRH mediante meccanismi indiretti (Gammon et al. 2005).

Oltre l'effetto ben noto dei cannabinoidi sulla secrezione di gonadotropine, modulanti la funzione gonadica a livello ipotalamico, gli studi hanno localizzato CNR1 nell'ipofisi anteriore, suggerendo un effetto diretto dei cannabinoidi sulla secrezione di LH e FSH a livello ipofisario (Wenger et al. 1999).

3.3 Effetti sulle cellule germinali maschili

I dati provenienti da studi su animali, hanno dimostrato che CNR1 è espresso nelle cellule germinali, dallo spermatogonio allo spermatozoo maturo. Gye et al. nel lavoro pubblicato nel 2005, hanno dimostrato la presenza di questo recettore nello spermatogonio, negli spermatociti primari e negli spermatozoi nel testicolo del topo, e queste osservazioni sono state replicate da Cobellis et al. nel 2006 nel testicolo degli invertebrati.

Le conoscenze attuali mostrano chiaramente che i cannabinoidi influenzano negativamente il processo spermatogenetico, riducendo la proliferazione delle cellule germinali e il peso degli organi riproduttivi (Cobellis et al. 2006; Maccarrone et al. 2002).

Le cellule del Sertoli costituiscono uno dei componenti principali del tubulo seminifero, e il loro numero, fissato alla pubertà, è strettamente correlato alla produzione totale di spermatozoi. Le cellule del Sertoli circondano e nutrono le cellule germinali durante la loro maturazione. Mediante l'azione ormonale che regola il processo spermatogenetico, le cellule del Sertoli sono in grado di creare un microambiente, finemente sintonizzato, che permetta la maturazione cellulare dallo spermatogonio allo spermatozoo maturo (Brinster, 2007).

Il *Cannabinoid Receptor Gene 2* (CNR2) è stato recentemente descritto nelle cellule del Sertoli, modulando apoptosi cellulare (Maccarrone et al. 2003). Inoltre, le cellule di Leydig sembrano esprimere CNR1, che, quando attivato, induce una riduzione della produzione di testosterone, inibendo così ulteriormente il processo spermatogenetico (Gye et al. 2005). Inoltre, il testosterone è necessario per l'attività dell'epididimo e delle vescicole seminali, che influenzano importanti funzioni dello spermatozoo come la motilità (Higgins et al. 1978). Quindi, gli eventi complessi che coordinano la spermatogenesi maschile e l'integrazione di messaggi cerebrali e testicolari sono modulati dai cannabinoidi a livello ipotalamico, ipofisario e testicolare.

3.4 Effetti sulla motilità spermatica

Dal primo articolo pubblicato da Perez nel 1981, i dati sperimentali raccolti confermano l'effetto negativo dei cannabinoidi sulla motilità spermatica nelle diverse specie di mammiferi. A parte le osservazioni ottenute nel campione di ricci di mare in cui non è stato osservato un effetto significativo dei cannabinoidi sulla motilità spermatica (Schuel et al. 1994), è stato studiato che queste sostanze inibiscono la motilità spermatica in diverse specie di mammiferi, incluso l'uomo (Rossato et al. 2005; Schuel et al. 2002). In realtà, gli effetti negativi dei cannabinoidi sulla motilità degli spermatozoi furono riportati a metà degli anni '70 e nei primi anni '80; tuttavia, CNR1 e CNR2 non sono stati identificati fino all'inizio degli anni '90, quando l'espressione di CNR1 fu dimostrata nel testicolo (Gerard et al, 1991). Sulla base di un esperimento farmacologico, gli effetti inibitori dei cannabinoidi sulla motilità spermatica nei mammiferi sono stati attribuiti all'attivazione del CNR1 (Rossato et al. 2005). Cobellis et al. hanno replicato questi risultati sullo sperma di *Rana esculenta*, adottando lo stesso approccio farmacologico.

Inoltre, gli stessi autori hanno esteso queste osservazioni su un disegno sperimentale genetico molecolare, dimostrando che sullo sperma di topo si nota un drammatico aumento della percentuale di motilità nella testa dell'epididimo. Ciò dimostra chiaramente che la mancanza di attivazione di CNR1 aumenta la motilità spermatica. (Ricci et al. 2007).

Dalla letteratura, sembra che l'attivazione del CNR1 inibisca la motilità spermatica negli invertebrati e nei vertebrati, almeno in vitro.

Sono stati riportati risultati contraddittori, tuttavia, per quanto riguarda gli effetti dell'ingestione di cannabinoidi, nonché del fumo di marijuana, sulla motilità spermatica in vivo. Le variazioni ottenute in questi studi possono essere giustificate dal disegno sperimentale o dal piccolo numero di soggetti partecipanti agli studi clinici (Whan et al. 2006).

3.5 Effetti sulla capacitazione spermatica

Dopo l'eiaculazione, lo spermatozoo deve subire una complessa serie di eventi biochimici e morfologici noti come "capacitazione", in modo che sia in grado di fertilizzare un ovocita (Salicioni et al, 2007). Ciò include il rimodellamento della membrana plasmatica lipidica, necessario per migliorare la capacità di risposta degli spermatozoi agli stimoli determinanti la reazione acrosomiale, facilitando così l'interazione con l'ovocita. Questi cambiamenti sono attivati da meccanismi che coinvolgono l'adenilato ciclasi (AC), l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e la protein kinasi A (PKA), che portano alla fosforilazione della tirosina di diverse proteine (31). Questi processi sono inibiti dai cannabinoidi e dall'attivazione di CNR1 (Schuel et al. 2002; Maccarrone 2005). Questi effetti sono specifici perché si è visto poter essere contrastati dalla pre-incubazione degli spermatozoi con CNR1 antagonista SR141716.

Fisiologicamente, la capacitazione spermatica si verifica all'interno del tratto genitale femminile, in particolare è stato dimostrato che gli spermatozoi perdono il plasma seminale all'interno delle prime vie del tratto genitale femminile e, all'interno dell'utero e poi dell'ovidutto, si ritrovano in un ambiente con basse concentrazioni di endocannabinoidi (Schuel et al. 2002). Questo sembra suggerire che l'attivazione del sistema endocannabinoide nell'apparato riproduttore maschile serva per mantenere gli spermatozoi inattivi, una condizione di quiescenza prima dell'interazione con l'ovocita (Rossato et al. 2005).

3.6 Effetti sulla reazione acrosomiale spermatica

La capacitazione spermatica è un prerequisito fondamentale per l'esocitosi dell'acrosoma, un lisosoma modificato situato nella porzione anteriore della testa dello spermatozoo (Yanagimachi, 1994). L'unione dei gameti avviene dopo che la reazione acrosomiale ha esposto enzimi proteolitici, con attività tripsinica, in grado di digerire una parte localizzata della zona pellucida dell'ovocita, permettendo così allo spermatozoo di penetrarla (Wassarman et al. 2005). Esistono dati omogenei che dimostrano come l'attivazione CNR1 riduca la capacità degli spermatozoi di attivare la reazione acrosomiale sia nei vertebrati che negli invertebrati (Rossato et al. 2005; Schuel H et al. 1994; Schuel et al. 2002; Maccarrone et al. 2005). Questi dati confermano ulteriormente l'effetto inibitorio dei cannabinoidi sulla fertilità degli spermatozoi.

I meccanismi che portano all'inibizione della reazione acrosomiale degli spermatozoi da parte dei cannabinoidi sono ancora sconosciuti. È noto che la regolazione dei flussi e dei canali ionici attraverso la membrana plasmatica spermatica sia fondamentale per l'innescio della reazione acrosomiale e il più importante regolatore fisiologico sembra essere lo ione calcio, Ca^{2+} (Darszon et al. 1999).

L'effetto inibitorio dei cannabinoidi sul sistema AC/cAMP/PKA (Maccarrone et al. 2005), potrebbe spiegare l'effetto negativo di questi agenti, attraverso l'attivazione di CNR1, sulla condensazione spermatica e reazione acrosomiale.

3.7 Conclusioni

La marijuana è la droga ricreativa più comunemente usata in tutto il mondo e ora è ben noto come i suoi endocannabinoidi, siano in grado di influire negativamente sulle funzioni spermatiche, sia negli invertebrati che nei vertebrati, compromettendo così il processo di fecondazione. Queste conoscenze sono molto importanti visto il largo uso di marijuana soprattutto nei giovani. Questi dati, inoltre, insieme alla dimostrazione che il tratto riproduttivo maschile possieda un sistema in grado di sintetizzare e metabolizzare endocannabinoidi, potrebbe suggerire l'esistenza di patologie che predispongano ad un aumento degli endocannabinoidi nel tratto riproduttivo maschile e quindi di alterare la produzione spermatica, al di là dell'uso di cannabinoidi esogeni.

I possibili effetti negativi sulla fertilità maschile di cannabinoidi terapeutici dovrebbero essere tenuti in debita considerazione, visto che l'uso di cannabinoidi è stato legalmente autorizzato in alcuni paesi per il trattamento di alcune condizioni patologiche, come la stimolazione dell'appetito in pazienti con AIDS, il trattamento di nausea e vomito, la riduzione di sintomi in alcune malattie neurologiche, la riduzione della pressione intraoculare nei pazienti con glaucoma, il trattamento della depressione e del dolore.

- Anderson, L. C. 1974. A study of systematic wood anatomy in *Cannabis*. Harvard University Botanical Museum Leaflets 24: 29–36.
- Anderson, L. C. 1980. Leaf variation among *Cannabis* species from a controlled garden. Harvard University Botanical Museum Leaflets 28: 61–69.
- Beltrán C, Vacquier VD, Moy G, Chen Y, Buck J, Levin LR, Darszon A. Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 1128–1135.
- Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. *Science* 2007; 316: 404–405.
- Christopoulos A, Coles P, Lay L, Lew MJ, Angus JA. Pharmacological analysis of cannabinoid receptor activity in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1281–1291.
- Cobellis G, Cacciola G, Scarpa D, Meccariello R, Chianese R, Franzoni MF, Mackie K, Pierantoni R, Fasano S. Endocannabinoid system in frog and rodent testis: type-1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase activity in male germ cells. *Biol Reprod* 2006; 75: 82–89.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* 1999; 79: 481–510.
- De Jonge CJ, Han HL, Lawrie H, Mack SR, Zaneveld LJ. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J Exp Zool* 1991; 258: 113–125.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168: 147–185.
- Di Marzo V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 134–140.
- Emboden, William A. (1974). "*Cannabis* — a polytypic genus". *Economic Botany* 28 (3): 304.
- Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 179–200.
- Foresta C, Bettella A, Merico M, Garolla A, Plebani M, Ferlin A, Rossato M. FSH in the treatment of oligozoospermia. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 161: 89–97.
- Foresta C, Bettella A, Rossato M, La Sala G, De Paoli M, Plebani M. Inhibin B plasma concentrations in oligozoospermic subjects before and after

- therapy with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1999; 14: 906–912.
- Gammon CM, Freeman GM Jr, Xie W, Petersen SL, Wetsel WC. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by cannabinoids. *Endocrinology* 2005; 146: 4491–4499.
- Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 1991; 279: 129–134.
- Ghasemi M, Sadeghipour H, Dehpour AR. Anandamide improves the impaired nitric oxide-mediated neurogenic relaxation of the corpus cavernosum in diabetic rats: involvement of cannabinoid CB1 and vanilloid VR1 receptors. *BJU Int* 2007; 100: 1385–1390.
- Gye MC, Kang HH, Kang HJ. Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes. *Arch Androl* 2005; 51: 247–255.
- Hembree WC III, Nahas GG, Zeidenberg P, Huang HF. Changes in human spermatozoa associated with high dose marihuana smoking. *Adv Biosci* 1978; 23: 429–439.
- Higgins SJ, Burchell JM. Effects of testosterone on messenger ribonucleic acid and protein synthesis in rat seminal vesicle. *Biochem J* 1978; 174: 543–551.
- John L. Sorenson e Carl L. Johannesse, *World Trade and Biological Exchanges Before 1492*, iUniverse, Bloomington, 2009, p. 151.
- Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marihuana use. *N Engl J Med* 1974; 290: 872–874.
- Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabo` N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci* 2005; 118: 4393–4404.
- Maccarrone M, Cecconi S, Rossi G, Battista N, Pauselli R, Finazzi-Agro` A. Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology* 2003; 144: 20–28.
- Maccarrone M, Falciglia K, Di Rienzo M, Finazzi-Agro` A. Endocannabinoids, hormone-cytokine networks and human fertility. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 309–317.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 1993; 327: 535–550.

- McPartland JM, Glass M, Pertwee RG. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 583–593.
- Park B, McPartland JM, Glass M. Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70: 189–197.
- Perez LE, Smith CG, Asch RH. delta 9-tetrahydrocannabinol inhibits fructose utilization and motility in human, rhesus monkey, and rabbit sperm in vitro. *Fertil Steril* 1981; 35: 703–705.
- Pertwee RG, Ross RA, Craib SJ, Thomas A. Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse vas deferens. *Eur J Pharmacol* 2002; 456: 99–106.
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997; 74: 129–180.
- Philip Hsiao, Raul I. Clavijo. Adverse Effects of Cannabis on Male Reproduction. *European Urology Focus* 4, 2018, 324–328.
- Ricci G, Cacciola G, Altucci L, Meccariello R, Pierantoni R, Fasano S, Cobellis G. Endocannabinoid control of sperm motility: the role of epididymus. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153: 320–322.
- Rossato M, Ion Popa F, Ferigo M, Clari G, Foresta C. Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 984–991.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 245–259.
- Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, Giuffrida A. N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem Phys Lipids* 2002; 121: 211–227.
- Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Mahony MC, Giuffrida A, Picone RP, Makriyannis A. Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 376–387.
- Schuel H, Goldstein E, Mechoulam R, Zimmerman AM, Zimmerman S. Anandamide (arachidonylethanolamide), a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7678–7682.
- Schultes R. E., Klein W. M., Plowman T., Lockwood T. E. (1974). "Cannabis: an example of taxonomic neglect". *Harvard University Botanical Museum Leaflets* 23: 337–367.

- Susanne Schilling, Rainer Melzer, Paul F. McCabe. *Cannabis Sativa*. Current Biology. VOLUME 30, ISSUE 1, PR8-R9, JANUARY 06, 2020
- Tokanovic S, Malone DT, Ventura S. Stimulation of epithelial CB1 receptors inhibits contractions of the rat prostate gland. Br J Pharmacol 2007; 150: 227–234.
- Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES. Recent aspects of mammalian fertilization research. Mol Cell Endocrinol 2005; 234: 95–103.
- Wenger T, Ferná'ndez-Ruiz JJ, Ramos JA. Immunocytochemical demonstration of CB1 cannabinoid receptors in the anterior lobe of the pituitary gland. J Neuroendocrinol 1999; 11: 873–878.
- Wenger T, Rettori V, Snyder GD, Dalterio S, McCann SM. Effects of D-9-tetrahydrocannabinol on the hypothalamic-pituitary control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in adult male rats. Neuroendocrinology 1987; 46: 488–493.
- Whan LB, West MC, McClure N, Lewis SE. Effects of delta-9 tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. Fertil Steril 2006; 85: 653–660.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, eds. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1994: 189–281.

Capitolo 4

Il modello murino nella ricerca sulla fertilità maschile

4.1 Il modello murino

L'infertilità è uno dei maggiori problemi nel mondo. Le cause di infertilità maschile possono essere classificate in quattro categorie:

- produzione spermatica difettosa;
- ostruzioni del tratto riproduttivo;
- infiammazioni del tratto riproduttivo;
- disordini sessuali, come disfunzione erettile e problemi eiaculatori (de Kretser 1997, 1999).

Circa la metà delle cause di infertilità maschile sono da ricercare in difetti di produzione spermatica, difetti nelle fasi di spermatogenesi, basso numero di spermatozoi, anomalie nella motilità, nella morfologia o nella funzionalità spermatica (de Kretser 1999). Sebbene l'eziologia della maggior parte dei casi rimanga sconosciuta, si è notato un significativo aumento della percentuale di infertilità maschile causata da difetti genetici come aberrazioni cromosomiche, mutazioni genetiche e polimorfismi di singoli nucleotidi (Matzuk et al. 2008; O'Flynn et al. 2010; Reijo R et al. 1995; Morris et al. 1996).

La produzione di spermatozoi funzionali nei mammiferi richiede una serie di passaggi complessi e altamente specializzati riguardanti la divisione cellulare, la differenziazione e l'interazione cellula-cellula. Tutti questi meccanismi avvengono nei tubuli seminiferi dei testicoli e sono sotto stretto controllo ormonale. L'interazione tra l'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo e gli ormoni di produzione testicolare, come androgeni, estrogeni, inibina e follistatina, garantiscono la regolazione della spermatogenesi (de Kretser et al. 1998; de Kretser et al. 2001; O'Donnell L et al. 2005; McLachlan et al. 2002).

Alterazioni nel sistema di regolazione ormonale sono state riconosciute quali cause di infertilità sia in umana che nel modello murino (Matzuk et al. 2008; Cooke HJ et al. 2002).

La spermatogenesi dei mammiferi viene divisa in tre fasi:

- fase proliferativa, caratterizzata dalla presenza di spermatogoni;
- fase meiotica, caratterizzata dalla presenza di spermatociti;
- fase di differenziazione, spermiogenesi, caratterizzata dalla presenza di spermatidi.

A seguito di queste fasi, seguono una serie di processi di maturazione post testicolari che sono di fondamentale importanza per rendere gli spermatozoi mobili e fertili e, quindi, utili alla fecondazione.

All'interno del testicolo, oltre alle cellule germinali, si ritrovano altre due tipologie di cellule, le cellule di Leydig e del Sertoli, che supportano il processo di spermatogenesi (de Kretser et al. 1998).

Le cellule del Sertoli, attraverso la barriera emato-testicolare, provvedono a isolare l'ambiente necessario per lo sviluppo di spermatociti in spermatidi. Inoltre, queste cellule garantiscono il supporto paracrina a tutte le tipologie di cellule germinali adulte (Skinner et al. 2005).

Le cellule di Leydig, collocate nel tessuto interstiziale del testicolo, sono le principali produttrici di testosterone nei tubuli seminiferi, ormone necessario al corretto completarsi della spermatogenesi.

In una cellula eucariote è stimato che oltre 1000 geni sono coinvolti nella regolazione della fertilità maschile. Nei topi, è stato calcolato che il trascrittoma delle cellule del gene maschile comprenda oltre 30000 trascrizioni. Le cellule somatiche dei testicoli e la regolazione endocrina della spermatogenesi possono contenerne molti altri, per cui ogni difetto, in un qualsiasi di questi geni, può determinare infertilità.

Due approcci comuni utilizzati per valutare la funzione di un gene sono gli approcci genetici inversi e diretti. In un approccio genetico inverso, l'analisi funzionale di un gene inizia alterando l'espressione genica (cioè l'inattivazione completa o parziale o l'espressione ectopica), seguita da una valutazione delle conseguenze fenotipiche.

Al contrario, un approccio genetico diretto, o approccio fenotipico, inizia con la generazione relativamente non orientata e l'identificazione di varianti fenotipiche di interesse. La mutazione sottostante viene identificata successivamente. Quest'ultimo approccio è un potente metodo per rivelare geni completamente nuovi che funzionano in un particolare processo, in quanto non richiede una conoscenza preliminare della funzione di un gene.

Studi citogenetici e molecolari hanno rilevato come anomalie cromosomiche tra cui delezioni (ad esempio, la regione del fattore azoospermia sul braccio lungo del cromosoma Y), traslocazioni e aneuploidie cromosomiche, si verificano con una maggiore incidenza negli uomini sterili rispetto agli uomini fertili (Matzuk et al. 2008; O'Flynn et al. 2010; Reijo R et al. 1995; Morris et al. 1996). Sebbene i recenti progressi nella biologia molecolare e il completamento della sequenza del genoma umano abbiano consentito la previsione dei geni ricercati all'interno delle regioni cancellate o traslocate, le funzioni precise della maggior parte di

questi geni devono ancora essere determinate. Inoltre, i geni che causano l'infertilità e i fattori di rischio vengono identificati mediante screening delle mutazioni dei geni candidati in soggetti sterili rispetto ai soggetti fertili di controllo.

L'identificazione dei geni necessari per la spermatogenesi, la maturazione spermatica, la capacitazione e la fecondazione è indispensabile per ottenere informazioni precise riguardo una comprensione completa della fertilità maschile.

I risultati di questi studi trovano utilità nella diagnosi e nel trattamento dell'infertilità maschile umana, nonché nello sviluppo di contraccettivi maschili necessari per l'uomo e gli animali.

Data la complessità della fertilità maschile, l'intero processo non può essere completamente modellato in vitro. Pertanto, i modelli animali forniscono una valida alternativa alla sperimentazione.

I topi sono i modelli animali più comunemente utilizzati nella ricerca biomedica, compresa la biologia riproduttiva, grazie al loro breve ciclo riproduttivo e condizioni gestionali relativamente economiche. Soprattutto, i topi sono geneticamente molto simili agli umani (Church et al. 2009) e i loro embrioni sono relativamente facili da manipolare a livello genetico. Inoltre, la spermatogenesi e l'oogenesi del topo sono paragonabili a quelle dell'uomo. Nel corso di diversi decenni, molti tipi di modelli di topo sono stati resi disponibili per la ricerca biomedica, tra cui modelli *knockout/knockin* e *transgenici* (utilizzando l'approccio genetico inverso o del gene candidato). Più di recente, i modelli mutanti di topo chimicamente mutagenizzato (usando l'approccio genetico diretto) sono stati sempre più utilizzati per la ricerca di geni associati alla malattia, comprese le cause di infertilità maschile (Handel et al. 2006; Kennedy et al. 2006; Kennedy et al. 2005; Lessard et al. 2007; Lessard et al. 2004; Jamsai et al. 2010)

4.2 Topi *knockout* /*knockin* e topi gene trapping

L'approccio più comunemente utilizzato per definire una funzione genica in vivo è l'ablazione genica mediante ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali (ES), nota come "*knockout*" o "targeting genico" (Smithies et al. 1985; Thomas et al. 1987). La valutazione di una funzione genica è studiata sulla base dell'eliminazione completa (allele nullo) o dell'eliminazione parziale di una funzione genica candidata (vale a dire, cancellazione di particolari domini della proteina codificata).

In generale, i costrutti di targeting sono progettati per portare un marcatore selezionabile per consentire la selezione di cloni ES correttamente mirati (ad esempio, gene di resistenza alla kanamicina/neomicina), affiancati da 59 e 39 regioni di omologia del gene bersaglio. Le cellule ES mirate vengono iniettate in blastocisti di un diverso ceppo di topo per produrre progenie chimeriche, che vengono successivamente accoppiate con topi di tipo selvaggio per generare topi *knockout* eterozigoti, cioè trasportando un allele eliminato e un allele di tipo selvaggio. Topi *knockout* omozigoti, cioè portatori di due alleli cancellati, sono generati da incroci eterozigoti (Capecchi et al. 1989; Capecchi, 1989). Una volta generata, la caratterizzazione fenotipica viene eseguita per definire i difetti patologici dovuti alla perdita completa o parziale della funzione genica bersaglio.

Oltre alla generazione di alleli nulli, specifiche mutazioni che causano malattie possono essere introdotte con precisione nel genoma del topo con un approccio "*knockin*/*knockin*". La produzione di topi *knockin*/*knockin* richiede due cicli di ricombinazione omologa nelle cellule ES per poter eliminare la sequenza rimanente di vettori target dal locus target. Sebbene la generazione di topi *knockin* sia più complicata dei topi *knockout*, questo approccio consente la creazione di modelli murini portatori di mutazioni specifiche che causano malattie piuttosto che una delezione genica che elimina completamente la funzione proteica. Ad esempio, tali alleli potrebbero portare mutazioni osservate nella popolazione umana.

La produzione di alleli nulli mediante i quali i geni bersaglio vengono inattivati in ogni cellula dell'animale per tutta la sua vita può essere molto preziosa nel definire la funzione genica in vivo. Questo approccio, tuttavia, ha una limitazione a causa di una grande percentuale di topi *knockout* che mostrano mortalità embrionale/neonatale inaspettata, che limita l'analisi della funzione genica nelle fasi successive della vita. In alcuni casi, il gene può contribuire a diversi aspetti della salute in diverse fasi, ad esempio funzioni diverse nella fase di embrione rispetto a quelle da neonato o adulto.

Nel caso di infertilità e ricerca contraccettiva, questa è una grave limitazione. Per superare questa limitazione, è possibile ottenere l'ablazione di un gene bersaglio in un momento preciso e/o tessuto specifico utilizzando l'approccio *knockout* condizionale, che consente al topo di svilupparsi fino a un certo stadio di sviluppo prima dell'inattivazione del gene. Questo approccio utilizza i sistemi di ricombinazione specifici del sito (Rodriguez et al. 2000).

Oltre agli approcci *knockout* e *knockin*, è stato sviluppato un metodo ad alta produttività per la disgregazione genica casuale, noto come “trapping genico”. Un marcatore eucariotico selezionabile da un farmaco e/o marker per l'analisi dell'espressione genica e un segnale di terminazione trascrizionale (poli A) vengono utilizzati per inserire e interrompere casualmente la trascrizione genica nel genoma della cellula ES. Attraverso l'uso di tecnologie ad alto rendimento, sono stati prodotti cloni ES contenenti migliaia di diversi geni intrappolati.

4.3 Topi transgenici

Un organismo transgenico è un organismo a cui è stato modificato il genoma per trasportare una copia (o più di una copia) di un pezzo di DNA di origine straniera. Questi modelli consentono ai ricercatori di valutare difetti fenotipici in vivo a causa dell'espressione ectopica di un gene, ad esempio la sovraespressione di un gene di tipo selvaggio e l'espressione di una forma negativa dominante per diminuire la normale funzione di un gene. La produzione di topi transgenici è ottenuta mediante iniezione diretta di un frammento purificato di un transgene di interesse in ovociti fecondati. Dopo l'iniezione, il transgene viene inserito nel genoma degli ovociti fecondati, che vengono successivamente utilizzati per generare topi transgenici. L'integrazione del transgene di solito ottenuto in maniera casuale e il livello di espressione dei transgeni può essere influenzato dall'effetto posizionale e dal numero di copie del transgene.

4.4 Topi con mutazioni puntiformi indotte chimicamente

Nel topo è stato sviluppato un approccio genetico avanzato che utilizza un potente mutageno, N-etil-N-nitrosourea (ENU). ENU agisce principalmente come agente alchilante, trasferendo il suo gruppo etilico in un qualsiasi numero di nitrogeno nucleofilo o sito di ossigeno dei quattro desossiribonucleotidi (Acevedo-Arozena et al. 2008; Georgel et al. 2008; Justice et al. 1999).

Il gruppo etilico trasferito costituisce un di più del DNA che, durante la proliferazione cellulare e la replicazione del DNA, provoca mutazioni ereditabili. L'ENU induce il più alto tasso di mutazione di qualsiasi agente testato nei topi. Un programma di mutagenesi ENU prevede una serie di iniezioni intraperitoneali di ENU nei maschi adulti.

Dopo un periodo transitorio di sterilità (10-12 settimane, a seconda del ceppo del topo e delle dosi di ENU utilizzate), a causa dell'esaurimento della spermatogonia differenziata, i topi sono sottoposti a schemi di riproduzione controllata per propagare le mutazioni indotte. Alla fine, i discendenti di questi topi vengono sottoposti a screening per un fenotipo di interesse e analisi di collegamento utilizzate per identificare la mutazione sottostante. Le mutazioni vengono spesso introdotte in un ceppo di topo e la prole viene trasferita in un ceppo diverso per consentire la mappatura della regione cromosomica mutata. L'*outbreeding* può verificarsi durante la generazione di topi per lo screening fenotipico o una volta identificato un fenotipo di interesse. La localizzazione della mutazione causale in una regione relativamente piccola nell'intero genoma (analisi di collegamento) può essere effettuata utilizzando una serie di tecniche. La maggior parte, tuttavia, sfrutta piccole differenze nella sequenza genomica del DNA tra i singoli ceppi di topi. Una volta definita la regione di collegamento, la mutazione viene identificata attraverso il sequenziamento dei geni candidati. I geni candidati entro l'intervallo di collegamento sono generalmente selezionati in base al profilo di espressione genica, alla funzione di proteina prevista e ai fenotipi disponibili di topo/malattia umana. Più recentemente, l'identificazione della mutazione senza la necessità di selezionare il gene candidato è stata ottenuta da tecnologie di sequenziamento dell'intero genoma (Handel et al. 2006; Kennedy et al. 2006; Kennedy et al. 2005; Lessard et al. 2007; Lessard et al. 2004; Jamsai et al. 2010).

ENU fornisce un potente strumento per la scoperta di geni precedentemente sconosciuti all'interno di processi biologici. Oltre a definire la funzione genica, è possibile identificare domini/regioni critici della proteina mutata.

La prima mutagenesi ENU su larga scala è iniziata nel 1997 (Hrabe de Angelis et al. 1998). Tali programmi hanno rivelato molti geni critici per le malattie umane, inclusa l'infertilità maschile (Geyer et al. 2009; Harris et al. 2007; Schneider et al. 2009; Sun et al. 2010).

4.5 Il modello murino nell'infertilità maschile

Lo studio dei geni responsabili dell'infertilità nel modello murino ha permesso di conoscere a fondo i processi di spermatogenesi, maturazione spermatica, capacitazione e fertilizzazione (Matzuk et al. 2008).

Circa 400 geni essenziali per la fertilità sono stati scoperti nel topo. La maggioranza di questi geni sono stati identificati usando modelli di topi *knockout* e in minor numero, modelli *knockin*, transgenici e ENU mutageni.

4.5.1 Difetti premeiotici

Nei mammiferi, sebbene la spermatogenesi inizi nella vita fetale, le cellule germinali arrestano la loro attività mitotica per poi riprendere con l'avvento della pubertà la loro capacità proliferativa e di differenziazione. Le cellule staminali interessate nel processo di spermatogenesi sono chiamate spermatogoni. Queste sono cellule germinali primordiali, di forma tondeggianti e con un nucleo grande e scarsamente cromofilo, che subiscono una serie di divisioni mitotiche alla base dei tubuli seminiferi.

Nel topo, gli spermatogoni iniziano a proliferare e a differenziarsi a quattro giorni dopo la nascita e si dividono continuamente mediante mitosi per incrementare il numero di spermatociti di primo ordine.

Difetti premeiotici sono in grado di determinare la completa distruzione della spermatogenesi così come si è osservato nella sindrome a sole cellule del Sertoli, presente nel 15,7% di uomini con azoospermia (McLachlan et al. 2007). Molti geni sono implicati nei processi di spermatogenesi, apoptosi e regolazione del ciclo cellulare ed è stato dimostrato che sono responsabili di infertilità maschile. In figura 4.1 sono elencati esempi di geni essenziali per lo sviluppo di cellule germinali implicate nello studio del modello murino.

Gene	Proposed function	Knockout phenotype	Fertility status
<i>Etv5</i> (<i>Erm</i>) (Ets variant gene 5)	Transcription factor	Azoospermia; failed to maintain spermatogonia	Male infertility
<i>Bax</i> (BCL2-associated X protein)	Regulation of apoptosis	Premeiotic germ cell arrest	Male infertility
<i>PI3k</i> (phosphoinositide-3-kinase)	Phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway	Impaired spermatogonia proliferation and increased apoptosis of spermatogonia	Male infertility
<i>Nanos2</i> (Nanos homolog 2 (<i>Drosophila</i>))	Germ cell differentiation	Germ cell apoptosis and complete loss of spermatogonia	Male infertility
<i>Ddx4</i> (<i>Vasa</i>) (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4)	Germ cell proliferation and differentiation	Impaired premeiotic germ cells differentiation and increased apoptosis of spermatogonia	Male infertility
<i>Dazl</i> (Deleted in azoospermia-like)	Germ cell proliferation and differentiation	Azoospermia; few spermatogonia enter meiosis, and those that do fail to proceed beyond pachytene	Male/female infertility

Fig. 4.1 Esempi di geni essenziali per lo sviluppo di cellule germinali implicate nello studio del modello murino (Jamsai and O'Bryan, 2011)

4.5.2 Difetti meiotici

La meiosi è un processo di divisione cellulare riduzionale, che porta alla formazione di gameti aploidi a partire da cellule diploidi. Ogni spermatocita di primo ordine duplica il proprio DNA e inizia la divisione meiotica. Con la prima divisione meiotica, da ogni spermatocita di primo ordine si formano due spermatociti di secondo ordine, cellule aploidi per numero di cromosomi, ma con quantità $2c$ di cromosomi. Con la seconda divisione meiotica ogni spermatocita di secondo ordine si divide in due spermatidi, cellule completamente aploidi ma ancora indifferenziate (Roeder 1997). Nella profase della prima divisione meiotica avvengono una serie di passaggi cruciali:

- ✓ condensazione cromosomica che continua per tutta la profase con la formazione di cromosomi spessi e corti (DSB), spermatociti leptotene;
- ✓ appaiamento dei cromosomi omologhi duplicati per formare le tetradi, spermatociti zigoteni;
- ✓ scambio di materiale genetico, attraverso un processo di frattura e successiva saldatura tra i cromosomi non fratelli dei due cromosomi omologhi, definito crossingover, spermatociti pachiteni;
- ✓ separazione dei cromosomi omologhi che restano in contatto laddove si è verificato il *crossing-over*, spermatociti diploteni;
- ✓ condensazione completa dei bivalenti con separazione degli stessi a livello dei chiasmi, spermatociti diacinesi

Lo scambio genetico ha luogo attraverso la formazione di DSB seguita da un crossover di materiale genetico tra coppie di cromosomi omologhi. Questo porta al riassortimento di alleli materni e paterni e alla produzione di spermatozoi aploidi diversi geneticamente. La formazione e la riparazione di DSB meiotici è un processo fondamentale che guida la diversità genetica. A causa della complessità del processo meiotico, un gran numero di geni è coinvolto nella sua regolazione. Difetti in questo processo possono portare a fallimento meiotico, produzione di gameti aneuploidi e infertilità. Inoltre, gameti aneuploidi possono determinare morte embrionale e difetti dello sviluppo nella prole (Handel et al. 2010). In figura 4.2 sono riportati alcuni esempi di geni essenziali implicati nella meiosi nello studio del modello murino.

Gene	Proposed function	Knockout phenotype	Fertility status
<i>Spo11</i> (Sporulation protein, meiosis-specific, SPO11 homolog (S. cerevisiae))	Programmed DSB formation	Impaired DSB formation and recombination initiation	Male/female infertility
<i>Mei1</i> (Meiosis defective 1)	Programmed DSB formation	Impaired DSB formation and recombination initiation	Male/female infertility
<i>Atm</i> (Ataxia telangiectasia mutated homolog (human))	DSB sensing and repairing	Impaired chromosomal synapsis and chromosome fragmentation	Male/female infertility
<i>Dmc1</i> (Dosage suppressor of mek1 homolog, meiosis-specific homologous recombination (yeast))	Meiotic recombination	Impaired chromosomal synapsis	Male/female infertility
<i>H2afx</i> (H2A histone family, member X)	Assembly of specific DSB repair complexes	Meiosis arrested at pachytene stage	Male infertility/female subfertility
<i>Tripl13</i> (Thyroid hormone receptor interactor 13)	Meiotic recombination and DSB repair	Impaired DSB repair	Male/female infertility
<i>Mlh1</i> (MutL homolog 1 (E. coli))	Mismatch repair	Impaired meiotic recombination	Male/female infertility
<i>Mlh3</i> (MutL homolog 3 (E. coli))	Mismatch repair	Impaired chromosomal synapsis	Male/female infertility
<i>Pms2</i> (Postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae))	Mismatch repair	Impaired chromosomal synapsis	Male infertility
<i>Msh4</i> (MutS homolog 4 (E. coli))	Mismatch repair	Impaired chromosomal synapsis	Male/female infertility
<i>Msh5</i> (MutS homolog 5 (E. coli))	Mismatch repair	Impaired chromosomal synapsis and synaptonemal complexes formation	Male/female infertility
<i>Exo1</i> (Exonuclease 1)	Mismatch repair	Dynamic loss of chiasmata and apoptosis	Male/female infertility
<i>Cdk2</i> (Cyclin-dependent kinase 2)	Cell cycle regulation	Meiosis arrest at prophase I and atrophy of the testes and ovaries	Male/female infertility
<i>Ccna1</i> (Cyclin A1)	Cell cycle regulation	Meiosis prophase I arrest and increased germ cell apoptosis	Male infertility
<i>Fkbp6</i> (FK506-binding protein 6)	Homologous chromosomes synapsis	Meiosis arrest at pachytene stage	Male/female infertility
<i>Psmc3ip</i> (<i>Hop2</i> , <i>Tbip1p</i>) (Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3, interacting protein)	Homologous chromosomes synapsis	Meiosis arrest	Male/female infertility
<i>Dnmt3l</i> (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like)	DNA methylation	Meiosis arrest and epigenetic defects	Male infertility; heterozygous progeny of homozygous females die by midgestation
<i>Siah1</i> (Seven in absentia 1A)	Protein ubiquitination and degradation	Meiosis prophase I arrest	Male infertility/female subfertility
<i>Prdm9</i> (<i>Meisetz1</i>) (PR domain containing 9)	Histone H3 methyltransferase that controls epigenetic events required for meiotic prophase	Impaired chromosomal synapsis and sex body formation	Male/female infertility
<i>Rec8</i> (Rec8 homolog (yeast))	Synaptonemal complex formation	Abnormal synaptonemal complexes	Male/female infertility
<i>Sycp1</i> (Synaptonemal complex protein 1)	Synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation	Impaired chromosomal synapsis	Male/female infertility
<i>Sycp2</i> (Synaptonemal complex protein 2)	Synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis	Impaired axial element formation	Male infertility/female subfertility
<i>Sycp3</i> (Synaptonemal complex protein 3)	Axial/lateral elements and synaptonemal complex formation and chromosomal synapsis	Impaired axial/lateral elements and synaptonemal complexes formation	Male infertility/female subfertility
<i>Syca1</i> (Synaptonemal complex central element protein 1)	DSB repair	Impaired DSB repair	Male/female infertility
<i>Syca2</i> (Synaptonemal complex central element protein 2)	Synaptonemal complex formation, homologous recombination and DSB repair	Impaired chromosomal synapsis and sex body formation	Male/female infertility
<i>Smc1b</i> (Structural maintenance of chromosomes 1B)	Segregation of chromosomes	Impaired sister chromatid cohesion formation and chromosomal synapsis	Male/female infertility
<i>Eif4g3</i> (Eukaryotic translation initiation factor 4γ, 3)	Translational regulation	Meiotic arrest; spermatocytes failed to exit prophase via G2/M1 transition	Male infertility

Fig. 4.2 Esempi di geni essenziali implicati nella meiosi nello studio del modello murino (Jamsai and O'Bryan, 2011)

4.5.3 Difetti postmeiotici o spermiogenesi

Dopo il completamento della meiosi, le cellule germinali aploidi, chiamate spermatidi, subiscono una serie di processi di differenziazione collettivamente noti come spermiogenesi per dare origine a spermatozoi maturi. La spermiogenesi determina una serie di modificazioni morfologiche importanti, come la condensazione della cromatina, la formazione dell'acrosoma, la rimozione citoplasmatica, la formazione della coda e la spermiiazione.

Nella fase di formazione della testa dello spermatozoo, la forma caratteristica tipica di ciascuna specie si ottiene mediante il rimodellamento della cromatina e l'azione del complesso *acroplaxome-manchette*. In particolare, istoni che impacchettano il DNA nella maggior parte delle cellule sono rimossi e sono sostituiti prima con proteine di transizione (TPs) e poi protamine (Prms) per formare un nucleo altamente condensato e trascrizionalmente inattivo. Infatti, nei modelli murini *knockout* TP (Tp1 e Tp2) che Prm (Prm1 e Prm2), il raggiungimento del rapporto corretto di queste proteine è essenziale per la formazione di spermatozoi normali e idonei alla fecondazione (Cho et al. 2001; Yu et al. 2000; Zhao et al. 2001; Adham et al. 2001). Dati clinici associati suggeriscono che il raggiungimento del rapporto corretto di Prms è essenziale per la fertilità maschile umana (Carrell et al. 2007; Oliva et al. 2006).

Parallelamente ai cambiamenti del pacchetto nucleare, i dati raccolti suggeriscono che il nucleo spermatico allungato sia modellato attraverso processi che coinvolge il complesso *acroplaxome-manchette* (Kierszenbaum et al. 2004).

L'*acroplaxome* è una struttura che si trova tra la membrana acrosomiale e la membrana nucleare. Contiene proteine strutturali come la F actina e sembra essere coinvolto nella progressiva estrusione della testa, così come nell'ancoraggio dell'acrosoma (Kierszenbaum et al. 2003; Liska et al. 2009). Inoltre, l'*acroplaxome* è collegato alla manchette, che a sua volta è composto da un anello marginale intorno al nucleo e una struttura microtubulare *like-fring* e che si estende nel citoplasma distale.

Diversi studi microscopici sui modelli murini, suggeriscono che queste strutture sono parte integrante della formazione di una testa normale di spermatozoo (Akhmanova et al. 2005; Nayernia et al. 2003; Zhang et al. 2009). Ulteriori dati riportano che le manchette sono coinvolte nel trasporto di proteine necessarie per la formazione della coda dello spermatozoo in un

processo noto come trasporto intramanchette (Nayernia et al. 2003; Zhang et al. 2009; Kierszenbaum 2002).

I modelli murini sono stati di fondamentale importanza per definire i meccanismi di formazione della coda di spermatozoo, grazie a cui è stato possibile conoscere l'eziologia di diverse patologie umane (Escalier et al. 2006). Negli ultimi anni, in particolare, la ricerca ha illustrato l'importanza della funzione degli assonemi, non solo per la motilità spermatica, ma anche per la funzione ciliare in una vasta gamma di tessuti somatici, importanti per la salute umana.

L'assonema, struttura di base della coda dello spermatozoo, è costituito da un sistema di nove coppie di microtubuli disposte concentricamente intorno a due microtubuli centrali, rivestito alla periferia dalla membrana plasmatica. Afzelius et al. nel lavoro pubblicato nel 1975, hanno dimostrato che assonemi di forma anomala determinano sterilità e disordini in altri tessuti ciliati, come polmone, cervello e reni in una sindrome nota come discinesia ciliare primaria. Solo nell'ultima decade sono stati rivelati i geni responsabili di quest'alterazione (Hornef et al. 2006; Loges et al. 2009; Zariwala et al. 2006). Ad oggi, grazie all'uso del modello murino, è nota un'anomalia di funzione/formazione delle ciglia (coda dello spermatozoo) che, almeno nel topo, può essere ricondotta ad un range di geni che sono coinvolti nello sviluppo dell'assonema dello spermatozoo. Questi geni e modelli includono: Tektin 2, coinvolto nella formazione del braccio di dineina dell'assonema (Tanaka et al. 2004); Alms1 e molti altri geni, coinvolti nella funzione basale e iniziale di crescita dell'assonema (Arsov et al. 2006; Collin et al. 2005); Gene di Catsper, coinvolti nella regolazione del Ca^{2+} e nell'insorgenza della motilità iperattivata (Ren et al. 2001; Quill et al. 2003; Qi et al. 2007; Jin et al. 2007); Slo3, coinvolto nel flusso K^+ e nella regolazione della capacitazione e iperpolarizzazione (Santi et al. 2010); Gapds e Pfkfb3, coinvolti nella formazione della via glicolitica per le strutture accessorie della coda spermatica e la generazione di ATP per garantire il movimento dell'assonema (Danshina et al. 2010; Miki et al. 2004).

La spermiazione è un processo regolato ormonalmente nel quale gli spermatozoi sono rilasciati nel lume dei tubuli seminiferi. Questo comporta il distacco di spermatidi allungati dalle cellule del Sertoli e la rimozione della maggior parte del citoplasma nella regione del collo in corpi residuali (Beardsley et al. 2003; de Kretser 1994).

Diversi modelli *knockout* di geni includenti cromatina, condensazione nucleare, esclusione citoplasmatica, la trasduzione del segnale e il trasporto

delle proteine hanno dimostrato di contribuire alla sterilità maschile. In figura 4.3 sono riportati esempi di geni essenziali per la spermiogenesi, la maturazione epididimale, la capacitazione e la fertilizzazione implicati negli studi del modello murino.

Gene	Proposed function	Knockout phenotype	Fertility status
<i>Sperm1</i> (Sperm maturation 1)	Sperm tail cytoplasmic removal	Deformed sperm head and tail structure and impaired spermiogenesis	Male infertility
<i>Gopc</i> (Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing)	Acrosome biogenesis	Fragmented acrosomes; globozoospermia (round-headed spermatozoa)	Male infertility
<i>Pim1</i> and <i>Pim2</i> (Prothymine 1 and 2)	Sperm chromatin condensation	Haploinsufficiency effect; sperm derived from spermatogenic cells with one copy of the mutated allele are immature and unable to fertilize eggs	Chimera male/female infertility
<i>Tnp1</i> (Transition protein 1)	Sperm chromatin condensation	Subtle sperm morphology abnormalities and reduced motility	Male subfertility
<i>Tnp2</i> (Transition protein 2)	Sperm chromatin condensation	Impaired chromatin condensation, sperm head abnormalities and reduced sperm motility	Male subfertility
<i>Tss46</i> (S44k) (Testis-specific serine kinase 6)	Chromatin remodeling	Abnormal sperm head morphology, reduced DNA compaction in spermatozoa and impaired sperm motility	Male infertility
<i>Cadml1</i> (Tslc1) (Cell adhesion molecule 1)	Cell adhesion, differentiation and apoptosis	Sperm tail maturation arrest, degenerated and sloughed off into the lumen	Male infertility
<i>Piv2</i> (Nectin 2) (Polarisus receptor-related 2)	Cell adhesion	Abnormal sperm head and sperm tail midpiece structure, impaired zona binding, and lack of oocyte penetration	Male infertility
<i>Csm222</i> (Casein kinase 2, alpha prime polypeptide)	Sperm head morphogenesis	Oligospermia (low sperm counts) and globozoospermia	Male infertility
<i>Rara</i> (Retinoic acid receptor, alpha)	Ligand-induced transcription factor	Sloughing of immature germ cells in the lumen of seminiferous tubules	Male infertility
<i>Parah1b1</i> (Lis1) (Pleiotropic-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b)	Acrosome and tail biogenesis	Impaired acrosome and tail formation; the basal tail cuff at the point of insertion but fail to add axonemes to elongate the tail structure	Male infertility
<i>Meig1</i> (Meiosis-expressed gene 1)	Sperm tail biogenesis, assembly of the acrosomes/flagella	Absent sperm flagella, abnormal sperm head, disrupted microtubular organelle essential for sperm head and flagella formation	Male infertility
<i>Tekt2</i> (Tektin-4) (Tektin 2)	Sperm tail biogenesis, dynein arm formation in the acrosome	Bending of the sperm flagella and marked defects in motility and primary ciliary dyskinesia	Male infertility
<i>Acdy10</i> (G40) (Adenylylate cyclase 10)	Sperm motility	Normal sperm counts and morphology with severely impaired motility	Male infertility
<i>Gapds</i> (Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatozoal)	Generation of energy supply for sperm motility	Normal sperm counts and morphology with impaired motility (loss of forward progression motility)	Male infertility
<i>Pgk2</i> (Phosphoglycerate kinase 2)	Generation of energy supply for sperm motility	Impaired progressive motility	Male subfertility
<i>Agrg1</i> (Hrb) (ARHGAP with FG repeats 1)	Acrosome biogenesis	Globozoospermia	Male infertility
<i>Pick1</i> (Protein interacting with C kinase 1)	Vesicle trafficking from the Golgi apparatus to the acrosome	Fragmented acrosomes Globozoospermia	Male infertility
<i>Vdac3</i> (Voltage-dependent anion channel 3)	Ion transport for sperm tail formation	Normal sperm counts, abnormal sperm tail structure and markedly reduced motility	Male infertility
<i>Catsper1</i> , <i>Catsper2</i> , <i>Catsper3</i> , <i>Catsper4</i>	Sperm motility and fertilization (ion channels)	Normal sperm counts, normal morphology, markedly reduced motility and unable to fertilize intact eggs	Male infertility
<i>Capaz3</i> (Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 3)	Sperm tail cytoplasmic extrusion	Excess cytoplasm and impaired motility	Male infertility
<i>Dnahc1</i> (Dynein, axonemal, heavy chain 1)	Cilia and flagella function; axoneme movement	Normal sperm counts, normal morphology, markedly reduced forward motility	Male infertility and primary ciliary dyskinesia
<i>Izumo1</i> (Izumo sperm-egg fusion 1)	Membrane fusion	Defect in sperm-egg fusion	Male infertility
<i>Akap4</i> (A kinase (PRKA) anchor protein 4)	Sperm tail assembly (scaffold protein)	Normal sperm counts, normal morphology, markedly reduced motility	Male infertility
<i>Prsk4</i> (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4)	Acrosome reaction and sperm-egg interaction	Impaired fertilization	Male subfertility
<i>Kcnu1</i> (Slc3a) (Potassium channel, subfamily U, member 1)	Capacitation and acrosome reaction (ion transportation)	Impaired motility, abnormal sperm morphology (hairpin shape), impaired sperm capacitation and acrosome reaction	Male infertility
<i>Adam3</i> (Cyrtasin)	Cell adhesions (plasma membrane protein)	Defect in sperm to bind to the zona pellucida	Male infertility
<i>Cgpr</i> (Calmegn)	Folding and transport of integral membrane proteins (testis-specific chaperone)	Impaired sperm-zona pellucida adhesion	Male infertility
<i>Adam2</i> (Fertilin-β)	Cell adhesions (plasma membrane protein)	Impaired sperm-egg membrane adhesion, sperm-egg fusion, migration from the uterus into the oviduct, and binding to the egg zona pellucida	Male subfertility

Fig. 4.3 Esempi di geni essenziali per la spermiogenesi, la maturazione epididimale, la capacitazione e la fertilizzazione implicati negli studi del modello murino (Jamsai and O'Bryan, 2011)

4.5.4 Maturazione post testicolare e difetti di fertilizzazione

Lo spermatozoo, dopo il processo di spermiiazione, è considerato morfologicamente maturo ma non abile alla fecondazione, cosa che avverrà solo dopo la fase di maturazione epididimale. Questo processo riguarda una serie di modificazioni morfo-fisiologiche, quali la rimozione della goccia protoplasmatica e la modificazione della composizione della membrana plasmatica (Girouard et al. 2009; Hoskins et al. 1978; Jones 1998; Lin et al. 2006).

Dopo la maturazione epididimale, lo spermatozoo, per essere abile alla fecondazione, deve subire il processo di capacitazione nel tratto riproduttivo femminile. La capacitazione determina una serie di segnali di trasduzione e di modificazioni proteiche necessari per favorire la reazione acrosomiale e garantire il legame con la zona pellucida dell'ovocita.

Durante il processo di capacitazione si osserva la rimozione dei fattori inibitori derivati dal liquido seminale che rivestono gli spermatozoi nell'epididimo. Questa fase è caratterizzata dalla perdita del colesterolo e di glicoproteine di membrana e dall'aumento del calcio intracitoplasmatico, e della fosforilazione di tirosina nelle code spermatiche e nelle proteine della testa (Baker et al. 2010; Ficarro et al. 2003; Platt et al. 2009).

La capacitazione è caratterizzata, inoltre, dalla capacità dello spermatozoo di manifestare motilità iperattivata e legarsi all'ovocita durante la reazione acrosomiale. La motilità iperattivata, che è caratterizzata da un aumento del battito della coda, è fondamentale per lo spermatozoo per spostarsi dalla membrana dell'ovidutto, dove è temporaneamente stoccato, e penetrare la zona pellucida dell'oocita durante la reazione acrosomiale. I canali ionici, compreso il *CA_t Sper*, ricoprono un ruolo centrale nella via dell'iperattivazione spermatica attraverso la regolazione del flusso di CA^{2+} . La reazione acrosomiale è caratterizzata da perdita di membrana e riduzione di livelli di colesterolo e non necessita di alcuno stimolo se non quello di un adeguato livello di calcio (Florman et al. 2008; Jungnickel et al. 2001). I glucosamminoglicani, presenti nel liquido tubarico, stimolano la reazione acrosomiale, attivando la conversione della pro-acrosina in acrosina e stimolando gli enzimi di superficie.

Durante il processo di esocitosi acrosomiale, vengono rilasciati gli enzimi idrolitici, come spermiolisine e acrosina, in grado di digerire la zona pellucida dell'oocita permettendo così allo spermatozoo di penetrarla. Lo spermatozoo raggiunge lo spazio perivitellino dove avviene la fusione della

propria membrana plasmatica con quella dell'oocita (Ikawa et al. 2010; Nixon et al. 2007; Vjugina et al. 2008).

Nel modello murino sono stati riconosciuti diversi geni in grado di regolare la maturazione testicolare, la capacitazione ed il potere fertilizzante degli spermatozoi. A differenza dei difetti premeiotici e meiotici, la maggioranza dei geni che determinano difetti post meiotici e post testicolari si manifestano clinicamente in problemi specifici di infertilità maschile (figura 4.3).

4.6 Conclusioni

Nel campo della riproduzione, attraverso l'uso di modelli murini, sono stati scoperti un centinaio di geni coinvolti nella fertilità e molti sono stati processati per essere identificati e caratterizzati al fine di poter ottenere: trattamenti per l'infertilità, sviluppare precise diagnosi e formulare contraccettivi per i maschi con effetti indesiderati minimi.

Sebbene l'uso di modelli animali sia ideale per l'analisi della funzione genica in vivo, i difetti fenotipici osservati in modelli animali geneticamente modificati possono essere influenzati da diversi background genetici e fattori ambientali, quali infezioni virali e batteriche, esposizione a forti suoni ed effetti dietetici e materni (Beckers et al. 2009). È importante che questi fattori siano valutati in modo appropriato per prevenire un'errata interpretazione dei risultati.

La disponibilità di sequenze complete del genoma di umani, topi e numerosi organismi ha aperto una nuova era di analisi funzionale genica. Utilizzando modelli murini, i biologi riproduttivi hanno rivelato con successo centinaia di geni essenziali per la fertilità e molti sono in procinto di essere identificati e caratterizzati.

- Acevedo-Arozena A, Wells S, Potter P, Kelly M, Cox RD et al. ENU mutagenesis, a way forward to understand gene function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9: 49–69.
- Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Gottges E, Topaloglu O, Dixkens C et al. Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 513–20.
- Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O, Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol* 1975; 66: 225–32.
- Akhmanova A, Hoogenraad CC. Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 47–54.
- Arsov T, Silva DG, O'Bryan MK, Sainsbury A, Lee NJ et al. Fat aussie—a new Alstrom syndrome mouse showing a critical role for ALMS1 in obesity, diabetes, and spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 1610–22.
- Baker MA, Reeves G, Hetherington L, Aitken RJ. Analysis of proteomic changes associated with sperm capacitation through the combined use of IPG-strip prefractionation followed by RP chromatography LC-MS/MS analysis. *Proteomics* 2010; 10: 482–95.
- Beardsley A, O'Donnell L. Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats. *Biol Reprod* 2003; 68: 1299–307.
- Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; 244: 1288–92.
- Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 1989; 5: 70–6.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 2007; 13: 313–27.
- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001; 28: 82–6.
- Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S et al. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* 2009; 7: e1000112.
- Collin GB, Cyr E, Bronson R, Marshall JD, Gifford EJ et al. *Alms1*-disrupted mice recapitulate human Alstrom syndrome. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2323–33.
- Cooke HJ, Saunders PT. Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 790–801.

- Danshina PV, Geyer CB, Dai Q, Goulding EH, Willis WD et al. Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) is essential for sperm function and male fertility in mice. *Biol Reprod* 2010;82: 136–45.
- de Kretser DM, Baker HW. Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3443–50.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meehan T, O'Bryan MK, Phillips DJ et al. Inhibins, activins and follistatin: actions on the testis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 180: 87–92.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 1: 1–8.
- de Kretser DM. Clinical male infertility. I. Prevalence of and progress in understanding male infertility. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 3–8.
- de Kretser DM. Male infertility. *Lancet* 1997; 349: 787–90.
- Duangporn Jamsai and Moira K O'Bryan. Mouse models in male fertility research. *Asian Journal of Andrology* (2011) 13, 139–151; 2010.
- Escalier D. *Knockout* mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 449–61.
- Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F et al. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem* 2003; 278: 11579–89.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 503–10.
- Georgel P, Du X, Hoebe K, Beutler B. ENU mutagenesis in mice. *Methods Mol Biol* 2008; 415: 1–16.
- Geyer CB, Inselman AL, Sunman JA, Bornstein S, Handel MA et al. A missense mutation in the *Capza3* gene and disruption of F-actin organization in spermatids of *repro32* infertile male mice. *Dev Biol* 2009; 330: 142–52.
- Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 2009; 80: 965–72.
- Handel MA, Lessard C, Reinholdt L, Schimenti J, Eppig JJ. Mutagenesis as an unbiased approach to identify novel contraceptive targets. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250: 201–5.
- Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 124–36.

- Harris T, Marquez B, Suarez S, Schimenti J. Sperm motility defects and infertility in male mice with a mutation in Nsun7, a member of the Sun domain-containing family of putative RNA methyltransferases. *Biol Reprod* 2007; 77: 376–82.
- Hornef N, Olbrich H, Horvath J, Zariwala MA, Fliegau Met al. DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 120–6.
- Hoskins DD, Brandt H, Acott TS. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Fed Proc* 1978; 37: 2534–42.
- Hrabe de Angelis M, Balling R. Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat Res* 1998; 400: 25–32.
- Jamsai D, O'Bryan MK. Genome-wide ENU mutagenesis for the discovery of novel male fertility regulators. *Syst Biol Reprod Med* 2010; 56: 246–59.
- Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D et al. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 2007; 77:37–44.
- Jones R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1998; 53: 73–84.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 499–502.
- Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B, Bradley A. Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1955–63.
- Kennedy CL, O'Bryan MK. N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis and male fertility research. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 293–301.
- Kennedy CL, O'Connor AE, Sanchez-Partida LG, Holland MK, Goodnow CC et al. A repository of ENU mutant mouse lines and their potential for male fertility research. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 871–80.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 4628–40.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome–acroplaxome–manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 2004; 67: 271–84.
- Kierszenbaum AL. Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 1–4.

- Lessard C, Lothrop H, Schimenti JC, Handel MA. Mutagenesis-generated mouse models of human infertility with abnormal sperm. *Hum Reprod* 2007; 22: 159–66.
- Lessard C, Pendola JK, Hartford SA, Schimenti JC, Handel MA et al. New mouse genetic models for human contraceptive development. *Cytogenet Genome Res* 2004; 105: 222–7.
- Lin M, Lee YH, Xu W, Baker MA, Aitken RJ. Ontogeny of tyrosine phosphorylation signaling pathways during spermatogenesis and epididymal maturation in the mouse. *Biol Reprod* 2006; 75: 588–97.
- Liska F, Gosele C, Rivkin E, Tres L, Cardoso MC et al. Rat hd mutation reveals an essential role of centrobilin in spermatid head shaping and assembly of the head-tail coupling apparatus. *Biol Reprod* 2009; 81: 1196–205.
- Loges NT, Olbrich H, Becker-Heck A, Haffner K, Heer A et al. Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 883–9.
- Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008; 14: 1197–213.
- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de K et al. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *J Androl* 2002; 23: 149–62.
- McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* 2007; 22: 2–16.
- Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 16501–6.
- Morris RS, Gleicher N. Genetic abnormalities, male infertility, and ICSI. *Lancet* 1996; 347: 1277.
- Nayernia K, Vauti F, Meinhardt A, Cadenas C, Schweyer S et al. Inactivation of a testis-specific *Lis1* transcript in mice prevents spermatid differentiation and causes male infertility. *J Biol Chem* 2003; 278: 48377–85.
- O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. *The Endocrine Regulation of Spermatogenesis*. San Diego, CA: Elsevier; 2005. pp1177–290.

- O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* 2010; 93: 1–12.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 417–35.
- Platt MD, Salicioni AM, Hunt DF, Visconti PE. Use of differential isotopic labeling and mass spectrometry to analyze capacitation-associated changes in the phosphorylation status of mouse sperm proteins. *J Proteome Res* 2009; 8: 1431–40.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1219–23.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE et al. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 14869–74.
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10: 383–93.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001; 413: 603–9.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J et al. High-efficiency delete mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 2000; 25: 139–40.
- Roeder GS. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* 1997; 11: 2600–21.
- Santi CM, Martinez-Lopez P, de la Vega-Beltran JL, Butler A, Alisio A et al. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 2010; 584: 1041–6.
- Schneider M, Forster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H et al. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *Faseb J* 2009; 23: 3233–42.
- Skinner M, Griswold M. *Sertoli Cell Biology*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2005. p494.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985; 317: 230–4.
- Sun F, Palmer K, Handel MA. Mutation of Eif4g3, encoding a eukaryotic translation initiation factor, causes male infertility and meiotic arrest of mouse spermatocytes. *Development* 2010; 137: 1699–707.

- Tanaka H, Iguchi N, Toyama Y, Kitamura K, Takahashi T et al. Mice deficient in the axonemal protein Tektin-t exhibit male infertility and immotile-cilium syndrome due to impaired inner arm dynein function. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 7958–64.
- Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 503–12.
- Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM et al. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4683–8.
- Zariwala MA, Leigh MW, Ceppa F, Kennedy MP, Noone PG et al. Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia: evidence of founder effect in a common mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 858–66.
- Zhang Z, Shen X, Gude DR, Wilkinson BM, Justice MJ et al. MEIG1 is essential for spermiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 17055–60.
- Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y et al. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7243–55.

Capitolo 5

Valutazione della riduzione del danno testicolare e spermatico
indotto da *Cannabis Sativa* (Marijuana) nel topo dopo
somministrazione orale di *Lepidium Mejenii* (MACA)

5.1 Introduzione

Nel corso dell'ultimo decennio, l'impiego di medicine alternative, olistiche, nutraceutiche e fitoterapiche ha risvegliato l'interesse della comunità scientifica. Sin dagli albori della civiltà l'uso di piante per fini terapeutici, anche per problemi di tipo riproduttivo, è ampiamente diffuso, in Persia, India, Europa e Nord America (Ghadiri et al. 2004).

Ad oggi, molti lavori confermano che lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nello sviluppo dell'ipofertilità. L'utilizzo di diverse sostanze ad azione antiossidante è ampiamente testato per migliorare le condizioni di ipofertilità, sia maschile che femminile.

Lepidium Meyenii, chiamata in gergo comune MACA, è un tubero riconosciuto dal popolo andino e impiegato dal popolo Inca per il suo potere antiossidante e per le sue capacità di migliorare le funzioni riproduttive sia maschili che femminili. MACA è consumata in Perù da 400 anni sia come alimento che come medicamento; infatti, è noto il suo utilizzo nel trattamento dei reumatismi, dei problemi respiratori, degli squilibri ormonali, nella stimolazione del metabolismo e della memoria, per le sue proprietà lassative ed infine per il trattamento di depressione, anemia, leucemia, AIDS, cancro ed alcolismo (Kilham, 2000; Wang et al. 2007).

In letteratura sono descritti 13 fenotipi di MACA caratterizzati da diversi colori degli ipocotili che vanno dal bianco al nero e che presentano diverse proprietà biologiche (Tello et al. 1992; Gonzales et al. 2005, 2006a; Rubio et al. 2006). Gli effetti degli ipocotili più citati sono quelli di tipo rosso, giallo e nero (Gonzales et al. 2006b, 2007, 2009). I dati bibliografici mostrano principalmente come questi tre fenotipi primari di MACA sono in grado di determinare diversi effetti biologici. La varietà di MACA rossa agisce sull'iperplasia prostatica benigna nei topi, sperimentalmente sull'osteoporosi indotta (Gonzales et al. 2014) e sulla conta spermatica, migliorandone i parametri (Gonzales et al. 2006b), mentre MACA nera e gialla mostrano migliori risultati sulla spermatogenesi, sulla memoria, sull'affaticamento, con aumento di memoria e apprendimento nei topi (Rubio et al. 2007). Inoltre, MACA nera riduce i livelli di glucosio, abbassa la pressione sanguigna e determina un miglioramento della salute generale dei soggetti trattati. (Gonzales et al. 2013b).

Il suo effetto afrodisiaco, nonché il suo potere di migliorare le capacità riproduttive di chi lo assume sono stati verificati scientificamente (Gonzales

et al. 2003; Valentová et al. 1997). Studi effettuati nel topo hanno dimostrato che la somministrazione orale di ipocotili polverizzati di MACA in diverse dosi per 21 giorni sui ratti stimola positivamente il comportamento sessuale, sia durante trattamenti acuti che cronici, indipendentemente dalla sua azione sull'attività locomotoria spontanea (Zheng et al. 2000; Lembè et al. 2014). Inoltre, MACA si è dimostrata in grado di contrastare gli effetti spermiotossici indotti dall'acetato di piombo nei ratti (Rubio et al. 2006). Altri studi dimostrano che MACA è in grado di migliorare la qualità del seme di stallone e la sua refrigerabilità (Del Prete et al. 2015).

Il riconoscimento scientifico delle sue proprietà ha indotto scienziati e clinici ad inserire ufficialmente MACA tra i medicinali per il trattamento dell'ipofertilità maschile umana (Ghanem et al. 2009).

Anche le proprietà medicamentose di marijuana e cannabinoidi sono state ampiamente dimostrate e riconosciute. I medicinali a base di *Cannabis* si sono dimostrati utili nell'alleviare disordini autoimmunitari, quali sclerosi multipla, artrite reumatoide e altre patologie infiammatorie ed inoltre giocano un ruolo importante nel trattamento di alcune patologie neurologiche, quali la malattia di Alzheimer e la Sclerosi laterale amiotrofica. Infine, recenti ricerche ne hanno dimostrato la capacità di ridurre la diffusione di cellule neoplastiche (Tkaczyk et al. 2011).

Tali cannabinoidi presentano un alto profilo di sicurezza in relazione ai rischi di tossicità acuta, ma non si può dire lo stesso della tossicità cronica (Tkaczyk et al. 2011). Effetti tossici, dovuti ad un uso cronico, sono stati riconosciuti anche sulle performance riproduttive. La medicina medioevale persiana intraprese studi scientifici volti a categorizzare le piante medicinali impiegate in Africa ed in Cina, gettando le fondamenta per le scienze e le conoscenze farmaceutiche in quest'ambito e ha inserito tali sostanze tra le sostanze anticoncezionali (Avicenna, 1988). Infatti, successivamente, è stato dimostrato e confermato che *Cannabis Sativa* e *Ruta Graveolens* inducono ipofertilità (Avicenna, 1988; Sailani et al. 2007).

Attualmente, l'uso illegale di *Cannabis Sativa* e di cannabinoidi è largamente diffuso ed in crescita, proprio in soggetti in età riproduttiva per motivi ricreazionali, sociali, medicali e spirituali. Contemporaneamente i problemi di ipofertilità di coppia aumentano sempre di più, e per un terzo sono ascrivibili alla componente maschile. L'uso illecito di droghe e la liberalizzazione di queste sostanze in un numero sempre maggiore di stati rappresenta un importante causa di ipo/infertilità maschile ed include l'uso

di androgeni anabolici, marijuana, oppioidi, cocaina e metanfetamine (Fronczak et al. 2012).

Numerosi studi hanno dimostrato l'effetto negativo dell'assunzione quotidiana di marijuana sulla fertilità maschile sia in animali da laboratorio (Park et al. 2004) che nell'uomo (Eisenberg et al. 2015).

Un recente studio condotto in Danimarca, volto a valutare l'idoneità allo svolgimento del servizio militare di giovani uomini chiamati alle armi tra il 2008 ed il 2012 ha rivelato che il 45% di 1.215 uomini, che avevano fatto uso di Marijuana in maniera continuativa una volta a settimana nei tre mesi antecedenti la visita, presentava una bassa concentrazione di spermatozoi nell'ejaculato (28%) oltre che un basso numero totale di spermatozoi nell'ejaculato (29%) (Gundersen et al. 2015).

Uno studio precedente, invece, aveva dimostrato che l'astinenza da marijuana per 4 settimane, dopo 4 settimane di assunzione non apportava miglioramenti alla ridotta qualità del seme (Hembree III et al. 1999).

L'uso di marijuana rappresenta dunque una delle cause di infertilità maschile e va correlata all'azione dei cannabinoidi rilasciati da *Cannabis Sativa*. Il sistema endocannabinoidale è infatti coinvolto nella complessa regolazione della riproduzione maschile: gli endocannabinoidi endogeni rilasciati si legano a recettori cannabinoidi, mantenendo un equilibrio precario.

La presenza di *Endocannabinoids receptors* (ECS) in tutti i tratti dell'apparato genitale maschile così come il coinvolgimento degli endocannabinoidi nella fisiologia riproduttiva sono stati ampiamente dimostrati (duPlessis et al. 2015). Partendo da questo presupposto è stata formulata l'ipotesi che i cannabinoidi esogeni, quali quelli contenuti nella marijuana, competono a livello recettoriale con gli endogeni creando un disequilibrio in grado di interferire con la fertilità (Amoako et al. 2013). Non sorprende, quindi, che numerosi studi dimostrano che i cannabinoidi esogeni hanno un effetto negativo sulla fertilità maschile (duPlessis et al. 2015).

Questo studio ha lo scopo di ampliare le conoscenze riguardanti l'azione spermiotossica di *Cannabis Sativa* nel topo e di testare la capacità di MACA di ridurre tale effetto deleterio, in modo da dare un contributo importante alla risoluzione di problemi di infertilità legati al fattore maschile, visto il loro aumento legato alla crescita del consumo di *Cannabis Sativa*.

5.2 Materiali e metodi

I protocolli animali utilizzati in questo lavoro sono stati valutati e approvati dal Comitato Etico ed Animale (OPBA) di CEINGE, Biotecnologie Avanzate S.C.A.R.L. (Napoli, Italia) e dal Ministero della Salute italiano (numero dell'autorizzazione 659 del 31.08.17, secondo le linee guida FELASA e le linee guida definite dalla direttiva del Consiglio delle Comunità europee (2010/63 / UE).

5.2.1 Animali

In tale studio sono stati utilizzati 29 topi adulti C57/BL (Charles River) di 6 settimane di età. I topi sono stati tenuti per tutta la durata dell'esperimento in condizioni standardizzate di sterilità (25°C, 60-70% di umidità, ciclo luce/buio 12h) e stabulati per 2 settimane per stabilire le condizioni fisiologiche (acclimatazione). Durante tutto lo studio, i topi sono stati alimentati con cibo da laboratorio Mucedola (Mucedola s.r.l - Italia), dieta di mantenimento, e acqua di rubinetto ad libitum.

5.2.2 Disegno sperimentale

I 29 animali sono stati suddivisi in 4 gruppi:

- gruppo CONTROLLO, (6 topi) non ha ricevuto nessun trattamento;
- gruppo THC, (9 topi) ha ricevuto 10 mg/kg di Δ^9 -THC in 0,1 ml di olio di sesamo per via sottocutanea per 30 giorni;
- gruppo MACA, (10 topi) ha ricevuto MACA 50 mg/Kg per via orale per 30 giorni;
- gruppo THC+MACA, (5 topi) ha ricevuto 10 mg/kg di Δ^9 - THC per via sottocutanea e 50 mg/Kg di MACA per somministrazione orale per 30 giorni.

I controlli sullo stato di salute dei topi sono stati effettuati con cadenza giornaliera. Il peso, lo stato di salute generale ed eventuale stato di disidratazione dei topi è stato monitorato quotidianamente. Per ogni topo è stato effettuato un prelievo ematico all'inizio e alla fine del trattamento dalla vena cava posteriore previa anestesia con un ago da 24G e siringa da 1ml e sono stati prelevati 100 μ l. Al termine della sperimentazione, gli animali

sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale previa anestesia generale con isofluorano 4% ed Ossigeno 2Lt/min.

5.2.3 Reagenti e farmaci

Gli ipocotili di MACA gialla utilizzati per questo esperimento sono stati raccolti nel distretto di Junin negli altopiani andini del Perù (4100 m sul livello del mare) e macinati fino a ottenere una farina con una dimensione delle particelle di 0,8 mm. A seguito della tradizionale essiccazione in pieno campo, la farina di MACA è stata ottenuta da ipocotili esposti per due mesi a cicli di temperature estreme, condizioni di luce intensa e pressione atmosferica tipica dell'ambiente ad alta quota (>3500m). Dopo tale essiccazione all'aperto, gli ipocotili sono stati selezionati, lavati, polverizzati e confezionati per l'uso.

(-)-*trans*- Δ^9 -THC solution, 1,0 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL, materiale di riferimento certificato, Cerilliant, codice T005, utilizzato per questo esperimento, è stato acquistato presso Sigma – Aldrich S.R.L. (Autorizzazione Ministeriale n°659/2017-PR Risp. A Prot. D5A89.16 del 08/02/2017; rif. BO n°114 del 14.03.2018 del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzione Animali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", e recapitato presso il CEINGE-Biotecnologie Avanzate in data 11.03.2019).

5.2.4 Valutazione del materiale seminale

I testicoli e gli epididimi sono stati immediatamente espianati, dopo sacrificio degli animali. Gli epididimi sono stati separati dai testicoli ed immersi in 500 μ l di una soluzione tampone fosfato-salino (*Phosphate-Buffered Saline*, *PBS*) per il recupero degli spermatozoi dalla coda epididimale per 30 minuti a 37 °C. La concentrazione spermatica (SC) è stata determinata con una camera contaglobuli di Bürker; la motilità degli spermatozoi totali (TM), rapidi (RPM) e lenti progressivi (SPM) è stata valutata posizionando 10 μ l di sospensione seminale preriscaldata a 37° C su un vetrino preriscaldato posizionato su tavolino termostato a 37 °C ed esaminati al microscopio ottico di ricerca invertito Nikon TE 2000 (Nikon, Italia). Le motilità totali e progressive sono state valutate da due osservatori esperti con esperienza indipendente in modo cieco con buona concordanza

utilizzando un microscopio a contrasto di fase con uno campione riscaldato a 37 °C con ingrandimento di 100 X su dieci campi selezionati casualmente per ciascun campione.

5.2.5 Istopatologia e morfometria

Testicoli, fegato, rene e colon sono stati espianati subito dopo l'eutanasia e conservati in formalina tamponata neutra al 10% (codice 05-01007Q, Bio-Optica, Milano, Italia), disidratati e incorporati in paraffina (codice 06-7920, Bio-Optica, Milano, Italia). I blocchi di paraffina sono stati tagliati in sezioni spesse 4 µm e colorati con ematossilina ed eosina (HE) per la valutazione morfologica.

Per la valutazione istologica del fegato, dei reni e del colon, diversi parametri sono stati semiquantitativamente valutati separatamente da due patologi con esperienza indipendente (O.P. e D.DB.) in modo cieco con buona concordanza (Cohen's $\kappa = 0,913$, $P < 0,001$).

Per l'esame istologico del fegato, sono state analizzate tre categorie principali di caratteristiche istologiche: steatosi, infiammazione e necrosi. Il sistema di classificazione è stato adattato da Kleiner et al. (2005) come precedentemente descritto (Annunziata et al. 2020). Il sistema di classificazione di Kleiner considera le seguenti variabili istologiche: gravità della steatosi (quantificata dalla valutazione a bassa e media potenza del coinvolgimento parenchimale da parte della steatosi):

- ✓ punteggio 0, <5%; punteggio 1, 5-33%; punteggio 2, 33-66%, punteggio 3, > 66%;
- ✓ posizione (modello di distribuzione predominante): zona 3, punteggio 0; zona 1, punteggio 1; azonale, punteggio 2;
- ✓ infiammazione: infiammazione lobulare (valutazione complessiva di tutti i fuochi infiammatori): punteggio 0, nessun fuoco; punteggio 1, <2 fuochi per $\times 200$ campo di ingrandimento; punteggio 2, 2-4 fuochi per campo di ingrandimento $\times 200$; punteggio 3, > 4 fuochi per $\times 200$ campo di ingrandimento;
- ✓ necrosi: punteggio 0, presente; punteggio 1, assente.

Per i reni, le caratteristiche istologiche esaminate sono state: 1) degenerazione epiteliale, 2) atrofia glomerulare, 3) alterazioni vascolari, 4) fibrosi stromale e 5) atrofia tubulare. Quando presente, il danno è stato

valutato in modo semiquantitativo come 0: nessuno, 1: lieve, 2: moderato, 3: grave (Aktoz et al. 2012).

Per il colon, il sistema istologico del punteggio è stato adattato da Coretti et al. (2018) come segue:

a) la gravità dell'infiltrazione delle cellule infiammatorie è stata valutata dalla percentuale di densità dei leucociti nell'area della lamina propria e stimata in un rappresentante di campo ad alta potenza (HPF) della sezione (0 per nessun segno di infiammazione, 1 per minimo <10%, 2 per lieve 10-25% con neutrofili sparsi, 3 per moderato 26-50%, 4 per marcato > 51% con infiltrato denso);

b) L'entità dell'infiammazione è stata stimata come espansione dell'infiltrazione dei leucociti (0 per nessuno, 1 per mucosa, 2 per mucosa e sottomucosa e 3 per livello mucoso, sottomucoso e transmurale).

La morfometria del testicolo è stata eseguita come precedentemente descritto da altri autori (Mehraein et al. 2010; Abarikwu et al. 2019), con alcune modifiche. Le microfotografie dei 4 gruppi sono state eseguite con un microscopio ottico (Nikon eclipse E600) collegato a un sistema di microfotografia (fotocamera digitale Nikon DMX1200). Per l'analisi morfometrica, la scala di impostazione e la conversione di valori da pixel a micrometri sono state ottenute da un'immagine di distanza nota in micrometri. Sezioni trasversali di testicoli con almeno 20 tubuli seminiferi rotondi o quasi rotondi sono state scelte in modo casuale per misurare diametri tubolari e altezza dell'epitelio seminifero per ciascun animale indipendentemente dallo stadio del ciclo dell'epitelio seminifero (Mehraein et al. 2010), usando immagini ottenute a ingrandimenti 100x. Il diametro (D) dei tubuli seminiferi è stato misurato attraverso gli assi minore e maggiore dei tubuli prendendo la media di due diametri, D1 e D2. La stessa sezione di tessuto utilizzata per misurare i diametri tubolari è stata utilizzata per misurare l'altezza dell'epitelio seminifero. Per questa misurazione, due linee perpendicolari in ciascun campo sono state disegnate dalla membrana basale (tunica propria) al lume tubulo (bordo luminale); la media di questi due valori era considerata l'altezza del tubulo seminifero.

Per la valutazione e la quantificazione dell'indice di spermatogenesi tubulare, è stato applicato un sistema di punteggio in dieci punti formulato da Johnsen (1970) e utilizzato sia in patologia umana che sperimentale per la sua buona riproducibilità (Teixeira et al. 2019). I criteri di Johnsen sono

stati stabiliti in base al profilo delle cellule incontrate lungo i tubuli seminiferi che vanno da nessuna cellula alla spermatogenesi completa.

5.2.6 Analisi dei dati

Per la valutazione del materiale seminale, i dati sono stati analizzati per la normalità con il Shapiro-Wilk normality test. Il confronto per ogni parametro tra i gruppi è stato eseguito mediante l'analisi della varianza multivariata (MANOVA) e LSD (least significant difference) di Fisher come post hoc.

Per la valutazione dei parametri istologici e morfologici, i dati sono stati analizzati utilizzando il test t di Student (a due code) utilizzando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Il livello di significatività è stato fissato a $p < 0.05$.

5.3 Risultati

5.3.1 Valutazione del materiale seminale

La media e la deviazione standard (SD) per tutti i parametri seminali per ogni gruppo: concentrazione spermatica (SC), motilità totale degli spermatozoi (TM), percentuali di spermatozoi rapidi progressivi (RPM) e dei lenti progressivi (SPM), sono riportate in tabella 5.1.

	GRUPPI			
Parametri seminali	CONTROLLO	THC	MACA	THC+MACA
SC ($\times 10^6$ spz/ml)	50.5 $\pm$ 8.4 ^a	23.1 $\pm$ 3.6 ^b	36.6 $\pm$ 6.1 ^c	54 $\pm$ 8.3 ^a
TM (%)	76.7 $\pm$ 2.6 ^a	33 $\pm$ 2.5 ^b	55.8 $\pm$ 6.2 ^c	79.4 $\pm$ 4.4 ^a
RPM (%)	69.2 $\pm$ 3.8 ^a	15.8 $\pm$ 5.5 ^b	37.8 $\pm$ 4.7 ^c	51.6 $\pm$ 4.7 ^d
SPM (%)	5.8 $\pm$ 2 ^a	5.9 $\pm$ 1.8 ^a	15.5 $\pm$ 6 ^b	13.6 $\pm$ 2.5 ^b

Tabella 5.1 Media e deviazione standard di SC, TM, RPM, SPM nei gruppi CONTROLLO, THC, MACA E THC+MACA. Le lettere (a-d) indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi (post hoc $p < 0.05$)

Nella tabella sono riportate la media e la deviazione standard (SD) di tutti i parametri spermatici valutati: concentrazione del seme (SC, $\times 10^6$ spz/ml), motilità spermatica totale (TM; %), percentuale di spermatozoi rapidi progressivi (RPM; %), percentuale di spermatozoi lenti progressivi (SPM; %). Per ognuno di questi parametri spermatici, la distribuzione nei diversi gruppi di studio (CONTROLLO, THC, MACA e THC+ MACA) è rappresentata nei diagrammi a scatola (*box plot*): la linea centrale rappresenta la mediana, la scatola è definita dal 1° e dal 3° interquartile, i “baffi” rappresentano il minimo e il massimo, mentre gli asterischi sono gli “outliers”.

La concentrazione spermatica e la motilità totale si riducono significativamente soprattutto nel gruppo THC ($p < 0.001$ per entrambi i parametri) e anche nel gruppo MACA ($p < 0.001$ per entrambi i parametri); mentre non c'è differenza statistica tra il gruppo CONTROLLO e il gruppo a cui è stata somministrata MACA in seguito a somministrazione di THC

Valutazione della riduzione del danno testicolare e spermatico
indotto da *Cannabis Sativa* (Marijuana) nel topo dopo
somministrazione orale di *Lepidium Mejenii* (MACA)

($p=0.38$ e $p=0.31$, rispettivamente). La percentuale di spermatozoi rapidi progressivi si riduce in maniera significativa ($p<0.001$) in tutti i gruppi rispetto al gruppo CONTROLLO. Invece, la percentuale di spermatozoi lenti progressivi resta invariata nel gruppo THC ($p=0.979$), mentre è aumentata sia nel gruppo che ha avuta la sola somministrazione di MACA ($p>0.001$), sia nel gruppo in cui la MACA è stata somministrata in seguito al THC ($p<0.05$); in questi ultimi due gruppi risulta statisticamente uguale ($p=0.385$).

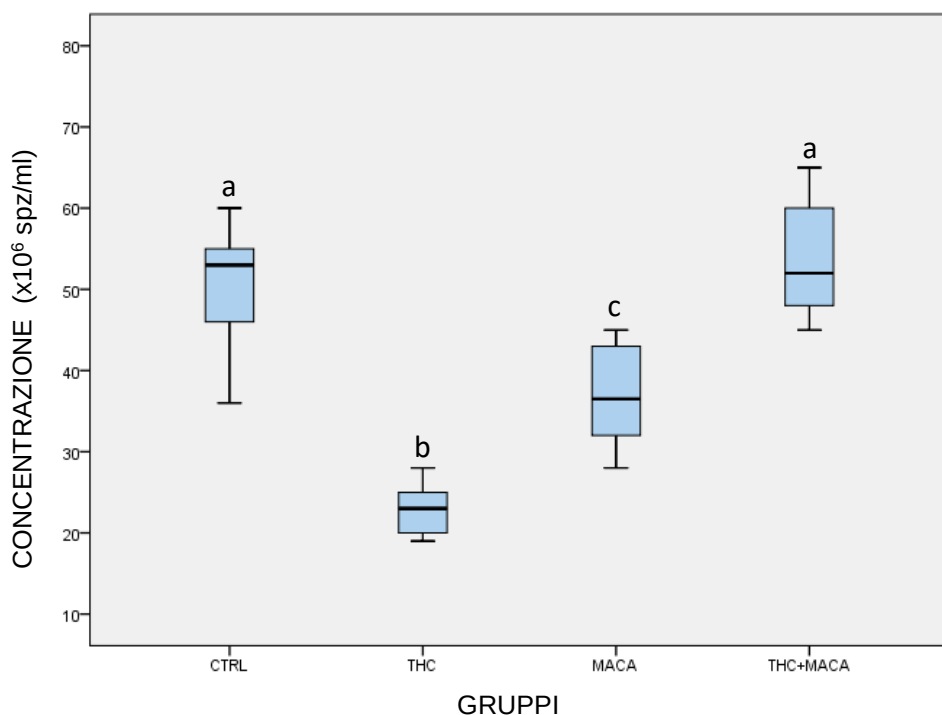


Fig. 5.1 SC dei gruppi CONTROLLO, THC, MACA e THC+MACA rappresentata nel diagramma a scatola (box plot): la linea centrale rappresenta la mediana, la scatola è definita dal 1° e dal 3° interquartile, i “baffi” rappresentano il minimo e il massimo, mentre gli asterischi sono gli “outliers”. Le lettere (a-c) indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi (post hoc $p<0.05$)

Valutazione della riduzione del danno testicolare e spermatico
indotto da *Cannabis Sativa* (Marijuana) nel topo dopo
somministrazione orale di *Lepidium Mejenii* (MACA)

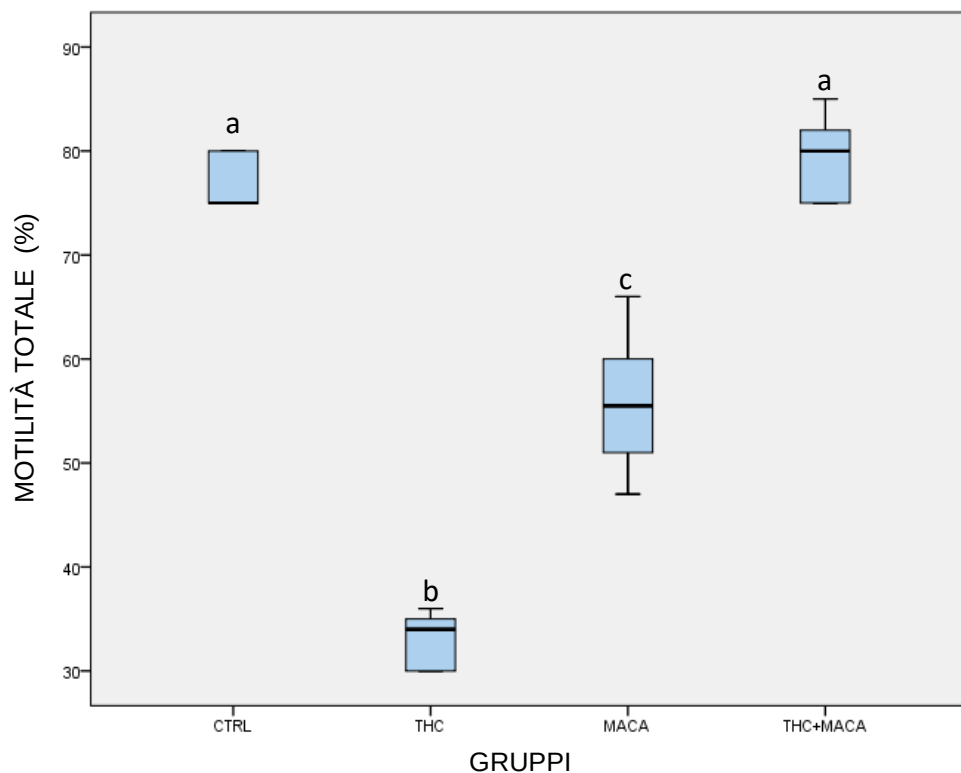


Fig. 5.2 TM dei gruppi CONTROLLO, THC, MACA e THC+MACA rappresentata nel diagramma a scatola (box plot): la linea centrale rappresenta la mediana, la scatola è definita dal 1° e dal 3° interquartile, i “baffi” rappresentano il minimo e il massimo, mentre gli asterischi sono gli “outliers”. Le lettere (a-c) indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi (post hoc $p < 0.05$)

Valutazione della riduzione del danno testicolare e spermatico
indotto da *Cannabis Sativa* (Marijuana) nel topo dopo
somministrazione orale di *Lepidium Mejenii* (MACA)

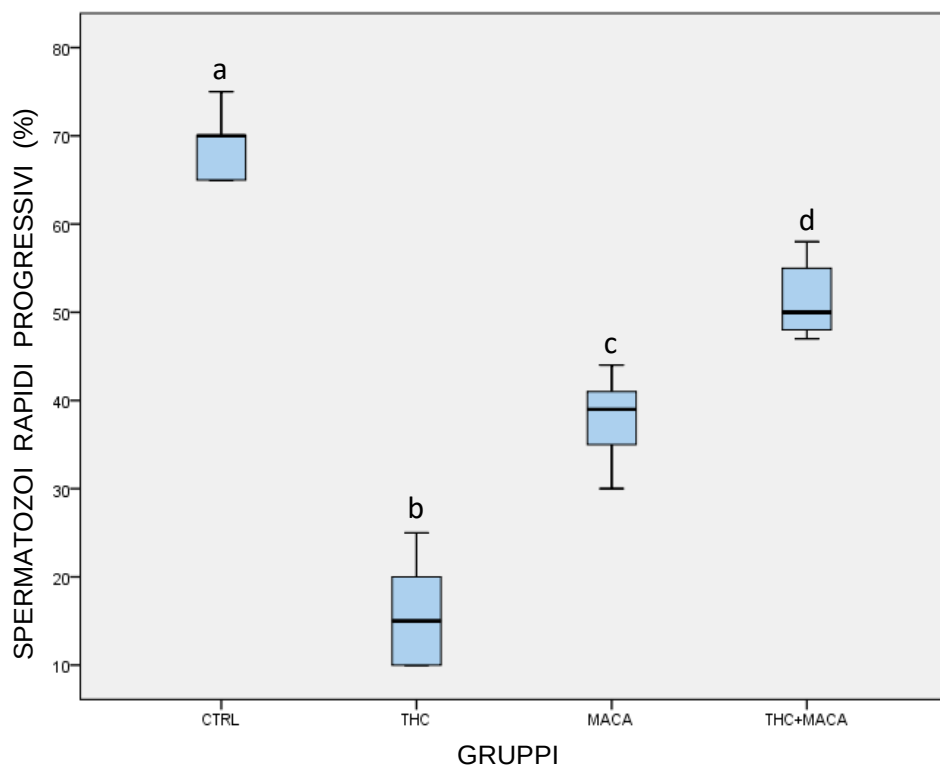


Fig. 5.3 RPM dei gruppi CONTROLLO, THC, MACA e THC+MACA rappresentata nel diagramma a scatola (box plot): la linea centrale rappresenta la mediana, la scatola è definita dal 1° e dal 3° interquartile, i “baffi” rappresentano il minimo e il massimo, mentre gli asterischi sono gli “outliers”. Le lettere (a-d) indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi (post hoc $p < 0.05$)

Valutazione della riduzione del danno testicolare e spermatico indotto da *Cannabis Sativa* (Marijuana) nel topo dopo somministrazione orale di *Lepidium Mejenii* (MACA)

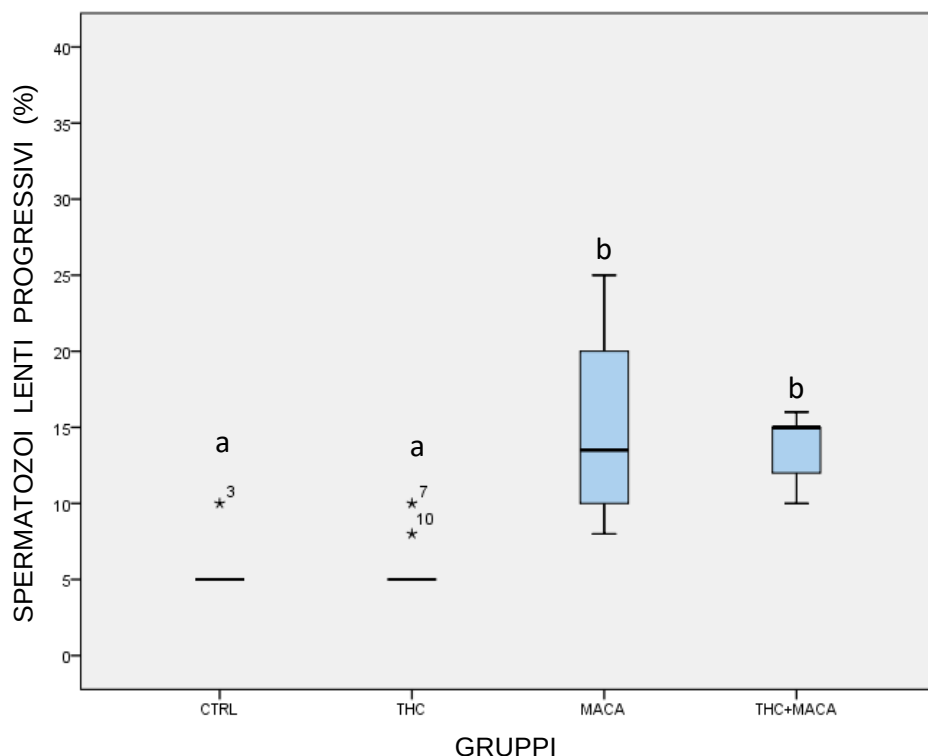


Fig. 5.4 SPM dei gruppi CONTROLLO, THC, MACA e THC+MACA rappresentata nel diagramma a scatola (box plot): la linea centrale rappresenta la mediana, la scatola è definita dal 1° e dal 3° interquartile, i “baffi” rappresentano il minimo e il massimo, mentre gli asterischi sono gli “outliers”. Le lettere (a-b) indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi (post hoc $p < 0.05$); *= outliers.

5.3.2 Istopatologia e morfometria

L'esame istologico di sezioni di fegato, rene e cieco fissate in formalina e incluse in paraffina non ha mostrato evidenti cambiamenti istopatologici per i parametri selezionati e nessuna differenza significativa tra i gruppi.

La valutazione istologica dei testicoli dei topi del gruppo CONTROLLO non ha mostrato alterazioni. Questi presentano una normale istoarchitettura che consiste in tubuli seminiferi uniformi, ben organizzati con spermatogenesi completa e normale tessuto connettivo interstiziale. I tubuli seminiferi presentano un epitelio intatto con tutti i complementi delle cellule spermatogenetiche. Gli spermatozoi maturi riempiono il lume dei tubuli e il tessuto interstiziale ha una normale distribuzione delle cellule di Leydig (figura 5.4).

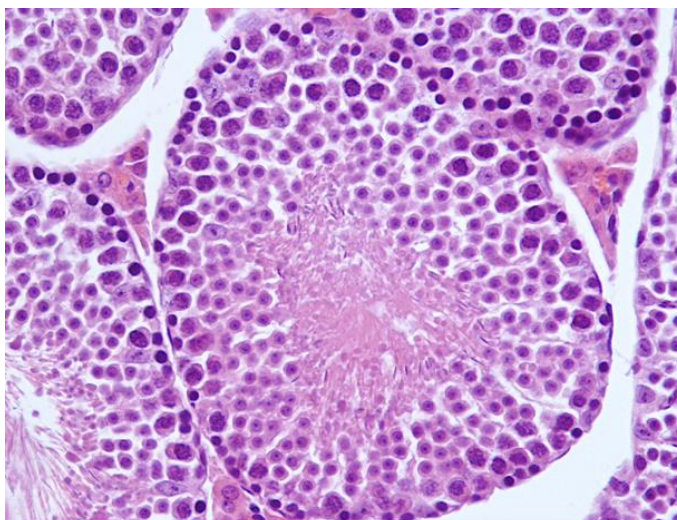
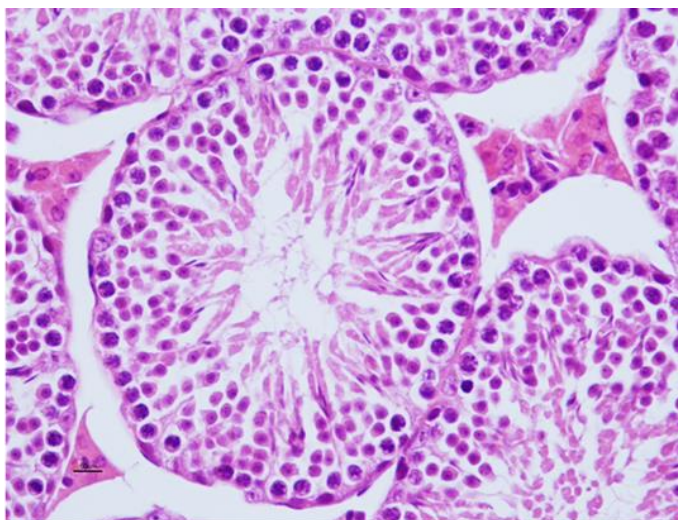


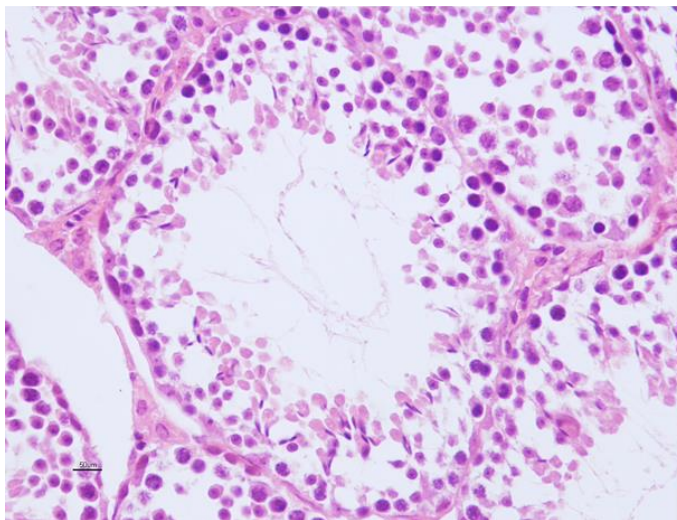
Fig. 5.4 Valutazione istologica dei testicoli di topo del gruppo CONTROLLO. Normale istologia testicolare con tubuli seminiferi uniformi, ben organizzati e spermatogenesi completa. Ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 40x.

Nel gruppo MACA, non sono state osservate alterazioni gravi e significative nel parenchima testicolare né nella spermatogenesi (figura 5.5).



*Fig. 5.5 Valutazione istologica dei testicoli di topo del gruppo MACA.
Non significative alterazioni del parenchima testicolare e della spermatogenesi.
Ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 40x.*

Nel gruppo THC, alle sezioni trasversali testicolari circa il 45% del parenchima testicolare mostra alterazioni da lievi a moderate, che consistono principalmente in distacchi multifocali dell'epitelio germinale, membrana basale irregolare e deformata, deformazione e degenerazione tubulare, tubuli seminiferi ristretti con aumento del diametro luminale (figura 5.6).



*Fig. 5.6 Valutazione istologica dei testicoli di topo del gruppo THC.
Evidenti distacchi multifocali dell'epitelio germinale, membrana basale irregolare e
deformata, deformazione e degenerazione tubulare, tubuli seminiferi ristretti con aumento
del diametro luminale. Ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 40x.*

Nel gruppo THC+MACA, le sezioni trasversali del testicolo hanno mostrato una istoarchitettura generale del parenchima testicolare normale con tubuli seminiferi sparsi rivestiti da epitelio intatto e spermatogenesi normale. Un numero scarso di tubuli seminiferi, pari al 25% circa del parenchima testicolare totale, ha mostrato lievi alterazioni come il distacco dell'epitelio germinale e una ridotta popolazione di spermatozoi maturi (figura 5.7).

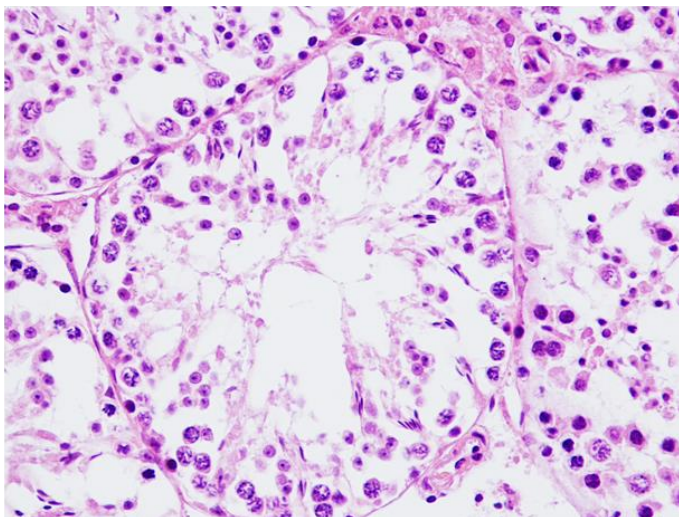


Fig. 5.7 Valutazione istologica dei testicoli di topo del gruppo THC+MACA. Pochi distacchi dell'epitelio germinale e ridotta popolazione di spermatozoi maturi. Ematossilina ed eosina, ingrandimento originale 40x.

Nelle misurazioni morfometriche, il diametro tubolare ha avuto un ispessimento crescente significativo nei gruppi THC e THC+MACA rispetto al gruppo MACA e al gruppo CONTROLLO ($p < 0,05$). Inoltre, l'altezza dell'epitelio seminifero è diminuita significativamente nei gruppi THC rispetto ai gruppi MACA e THC+MACA ($p < 0,01$). L'indice spermatogenetico aveva un livello di 10 (spermatogenesi completa con molti spermatozoi) nel gruppo di CONTROLLO e nel gruppo MACA, ma è passato ad un livello di 9 (molti spermatozoi presenti, ma l'epitelio germinale si è disorganizzato con marcato decadimento o obliterazione del lume) nei gruppi THC e THC+MACA. Pertanto, nel gruppo THC è stata osservata una leggera ma non significativa riduzione dell'indice spermatogenetico rispetto ai gruppi MACA e THC+MACA.

Le sezioni trasversali epididimali dei gruppi di controllo, nonché i gruppi sperimentali MACA, THC e THC+MACA non hanno mostrato alterazioni significative: il lume epididimale è risultato pieno di spermatozoi e l'epitelio presenta una membrana basale intatta, tubuli epididimali, epitelio colonnare pseudostratificato e aree interstiziali.

5.4 Discussione

L'infertilità è definita in medicina umana come l'incapacità di concepire dopo 12 mesi di rapporti regolari non protetti (L.C. Callister et al. 2010) e risulta oggi un problema contemporaneo in crescita. Il maschio è responsabile di circa il 60% dell'infertilità umana nelle coppie in età riproduttiva (Zhang et al. 2014). La diagnosi clinica o la predizione dell'infertilità maschile si basa principalmente sulle valutazioni seminali secondo le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che prevede la valutazione di una serie di parametri spermatici tra cui il numero, la motilità e la morfologia degli spermatozoi (M. Practice Committee of the American Society for Reproductive 2015). In base a tali parametri, le forme di infertilità maschile sono classificate abitualmente in anomalie qualitative (astenozoospermia, teratozoospermia e necrospermia) e quantitative (azoospermia, criptozoospermia e oligoastenozoospermia) (M. Practice Committee of the American Society for Reproductive 2015). Sebbene le analisi del seme forniscano valori predittivi e diagnostici di infertilità non sono in grado di fornire eziologie specifiche dell'infertilità maschile. La ricerca di biomarker dell'infertilità è all'ordine del giorno nella comunità scientifica. Finora, i potenziali biomarker rilevati per l'infertilità maschile si sono concentrati principalmente sui metaboliti legati allo stress ossidativo (SO) (Tremellen 2008). Molti antiossidanti e specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono risultati ottimi biomarker dell'infertilità (Mostafa et al. 2009). Lo SO, derivante dall'eccessiva produzione e formazione di ROS legato ad un sistema antiossidante compromesso, è infatti responsabile di numerose anomalie spermatogenetiche.

Lo studio dei prodotti metabolici degli spermatozoi e la loro correlazione con i parametri spermatici può fornire importanti informazioni circa i meccanismi eziopatogenetici dell'infertilità. Infatti, la generazione di ROS è stata correlata ad alcuni parametri seminali come la concentrazione, la motilità e la percentuale di spermatozoi con normale morfologia (Said et al. 2004).

La correlazione tra stress ossidativo e ipofertilità maschile è stata ampiamente indagata e confermata. Numerosi sono gli antiossidanti testati e alcuni dei quali inseriti nei trattamenti di routine in medicina riproduttiva. In tale contesto, l'approccio nutraceutico è sempre più spesso impiegato, anche se non sempre basato su adeguate fonti scientifiche.

Un recente studio prospettico di coorte ha riferito che il 30% di coppie sterili si è affidata a forme di medicina alternativa, come ad esempio la fitoterapia o l'agopuntura (Smith et al. 2010). Un altro sondaggio ha mostrato che dal 22% al 66% degli intervistati ha utilizzato la medicina complementare e alternativa per migliorare l'infertilità (Coulson et al. 2005; Stankiewicz et al. 2007; Zini et al. 2004).

Tra i fitoterapici ad azione antiossidante utilizzati per il trattamento dell'infertilità, sta raggiungendo un impiego sempre maggiore MACA, *Lepidium Meyenii*. MACA è una pianta peruviana che è utilizzata come alimento supplementare e medicinale sia nell'uomo che negli animali. Numerosi studi *in vivo* hanno dimostrato che MACA ha attività spermatogenetiche e migliora la fertilità, migliorando i parametri spermatici e il comportamento sessuale (Clement et al. 2012; Lentz et al 2006; Bogani et al. 2006; Chung et al. 2005; Clement et al 2010; Gonzales et al. 2004; Gonzales et al 2001; Rubio et al. 2006). Nell'uomo diversi studi, hanno dimostrato che MACA è in grado di aumentare la conta spermatica, migliorare la motilità e la libido (Lee et al. 2011; Shin et al. 2010). I meccanismi di azione attraverso cui MACA sia in grado di migliorare i parametri spermatici non sono ancora chiari, tuttavia sembra che l'attività afrodisiaca di MACA sia da ricercare nella sua frazione lipidica, costituita da acidi grassi e macamidi (Gonzales et al. 2013; Melnikovova et al. 2014). Diversi studi condotti *in vitro* e *in vivo* su MACA su differenti cellule in coltura, ad esempio macrofagi, epatociti e neuroni, confermano gli effetti citoprotettivi (Sandoval et al. 2002; Valentova et al. 2006; Pino-Figueroa et al. 2010, 2011). L'attività antiossidante di MACA sembra essere dovuta alla capacità di eliminazione dei radicali liberi e di fornire citoprotezione durante lo SO (Sandoval et al. 2002). Ricerche recenti hanno mostrato che gli estratti di metanolo di MACA hanno un effetto antiossidante sui neuroni, aumentando così la vitalità cellulare (Rodriguez-Huaman et al. 2017).

I diversi fenotipi di ipocotili di MACA (rosso, giallo e nero) mostrano differente composizione chimica e diversa risposta biologica. Gli studi condotti nel topo e nel ratto dimostrano che i migliori risultati sulla spermatogenesi nei topi sono risultati dalla somministrazione di MACA gialla e nera (Rubio et al.al. 2007).

Nel nostro studio si è scelto di utilizzare MACA gialla ad una dose di 50 mg/Kg per via orale per una durata di trattamento di 30 giorni. La dose è stata calcolata in base a studi sulle dosi minime efficaci riportate per i ratti

(Zheng et al. 2000; Cicero et al. 2001, 2002; Gonzales et al. 2004) e su studi sull'uomo (Gonzales et al. 2001, 2002).

La somministrazione di MACA a queste dosi nel nostro studio ha determinato un lieve peggioramento della concentrazione e dei vari parametri della motilità spermatica, ma con un aumento del numero di spermatozoi lenti a discapito di quelli rapidi. Questo risultato non è in accordo con studi precedenti, in cui la somministrazione di MACA determina un aumento del numero totale di spermatozoi nei ratti adulti (Gonzales et al. 2004, 2006), nei tori peri-puberi (Clement et al. 2010), nel cavallo (Del Prete et al. 2015) e nell'uomo (Gonzales et al. 2001). Inoltre, è riportato che MACA nera e gialla sono in grado di migliorare la motilità spermatica (Gonzales et al. 2013a, b) e la spermatogenesi (Clement et al. 2010, 2012) senza influenzare i livelli ormonali (Balick & Lee, 2002; Melnikovova et al. 2015). Tuttavia, Ohta et al. (2016) hanno recentemente rilevato che, in seguito ad un trattamento con un estratto idroalcolico di diversi ecotipi di MACA nei ratti maschi, la concentrazione sierica di testosterone aumenta probabilmente in relazione alla maggiore capacità di produzione di testosterone da parte delle cellule di Leydig. Il meccanismo d'azione di MACA non è ancora chiaro, ma è stato ipotizzato che alcune proprietà di MACA siano correlate alla frazione lipidica contenente acidi grassi e macamidi (Melnikovova et al. 2012). Nel nostro studio la sola somministrazione di MACA ha determinato un calo della concentrazione totale e di tutti i parametri della motilità, che potrebbero essere spiegati da un'interferenza di MACA su un sistema in cui già fisiologicamente è presente un equilibrio tra la produzione di ROS e di antiossidanti endogeni. Infatti, l'azione di MACA in un sistema danneggiato dalla somministrazione di THC si traduce in un miglioramento dei parametri spermatici. La concentrazione spermatica e la motilità totale sono equivalenti a quelle del gruppo CONTROLLO e le percentuali di spermatozoi motili sono migliorate rispetto al gruppo danneggiato dal THC, ma non al punto da essere equivalenti al gruppo CONTROLLO. MACA ha migliori proprietà nei sistemi ossidanti-antiossidanti compromessi, come nei casi di danno testicolare. Studi precedenti sulla somministrazione di MACA riportano risultati positivi simili in seguito ai danni riproduttivi causati dalla somministrazione di *malathion* e di acetato di piombo (Bustos-Obregón et al. 2005, 2007; Rubio et al. 2006).

È opinione comune che l'abuso ricreativo di cannabis abbia effetti dannosi sulla fertilità maschile (Battista et al. 2015). Questo è un aspetto cruciale, non solo perché la marijuana è una delle sostanze di abuso più comunemente usate (World Drug Report 2016), ma anche perché il numero di pazienti che usano cannabis a scopi medicinali è cresciuto negli ultimi anni. In effetti, i dati ufficiali mostrano che ci sono più di 1 milione di utenti negli Stati Uniti dove la marijuana medica è legale (Number of Legal Medical Marijuana Patients, 2016). Pertanto, tutti questi utenti dovrebbero conoscere gli effetti dell'uso cronico di cannabis sulla loro fertilità. Tuttavia, sembra improbabile una riduzione del consumo di cannabis, in quanto vi sono prove crescenti che i composti di cannabinoidi sono in grado di alleviare alcuni disturbi, come mostrato nell'ultimo rapporto della National Academies of Sciences (National Academies of Sciences and Medicine, 2017).

La maggior parte degli studi *in vitro* e *in vivo* condotti sugli uomini negli anni '70 ha discusso del ruolo empirico che la marijuana svolge nel distruggere l'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo, la spermatogenesi e la funzione spermatica interessando in primis motilità, capacitazione e reazione acrosomiale (du Plessis et al. 2015).

Per quanto riguarda la sperimentazione *in vitro*, l'incubazione acuta di spermatozoi con THC o agonisti dei cannabinoidi ha ridotto la capacità di fertilizzazione degli spermatozoi inibendone la reazione acrosomiale (Schuel et al. 1987; Schuel et al. 1994; Chang et al. 1993; Berdyshev et al. 1999) e determinando una diminuzione della motilità spermatica (Hong et al. 1982; Rossato et al. 2005; Whan et al. 2006; Amoako et al. 2013). L'incubazione degli spermatozoi di rana (Cobellis et al. 2006) e topi (Morgan et al. 2012) con alcuni agonisti dei cannabinoidi ha mostrato una diminuzione della motilità. Infine, l'incubazione degli spermatozoi di verro con agonisti dei cannabinoidi ha mostrato un'inibizione della capacitazione e della reazione acrosomiale (Maccarrone et al. 2005).

In un'interessante review di Nahas (2002), gli autori descrivono in dettaglio le prime sperimentazioni *in vivo*, dal 1974 al 1982, riguardanti l'efficienza della barriera emato-testicolare nel limitare la permanenza del THC nel testicolo. In questi studi, si nota come nell'uomo, i ricercatori hanno correlato l'oligospermia, la diminuzione della spermatogenesi, la ridotta motilità o i cambiamenti strutturali degli spermatozoi all'uso cronico di marijuana. Gli esperimenti condotti su scimmie, cani, topi, ratti e rospi, usando 1-100 mg/kg di marijuana inalata o iniettata o il suo estratto per un

periodo di 1-45 giorni, hanno mostrato oligospemia, anomalie degli spermatozoi e lesioni testicolari. Sono presenti in letteratura lavori che descrivono come l'utilizzo di THC, a dosi di 5-10 mg/kg per via intraperitoneale nei topi per 1-5 giorni, sia in grado di determinare anomalie spermatiche e inibizione della spermatogenesi (Nahas et al. 2002; Dalterio et al. 1982). Fino al 2011, sono stati pubblicati lavori dove la somministrazione orale di 3-6 mg/kg di pasta di marijuana sciolta in acqua per 36 giorni in topi, ha determinato anomalie nell'anatomia testicolare, diminuzione del numero e della motilità spermatica, nonché alterazioni dei livelli sierici degli ormoni sessuali e del sistema cannabinoide dei testicoli (Banerjee et al. 2011). In un secondo studio, la somministrazione di 50 mg/kg di THC intraperitoneale nei topi maschi poco prima dell'accoppiamento, ha causato una riduzione del 20% delle dimensioni della vescicola embrionale (Morgan et al. 2012). Inoltre, la somministrazione intraperitoneale di un potenziale agonista di cannabinoidi (HU-210), farmaco cannabinoide sintetico, ha dimostrato che il suo uso a lungo termine riduce il numero totale di spermatozoi, la motilità e il numero di cellule del Sertoli, nonché la spermatogenesi a 6h, 2, 4 o 7 settimane nei ratti (Lewis et al, 2012). I nostri risultati sono in accordo con quanto già riportato in letteratura, la somministrazione di THC ha determinato una riduzione drastica della concentrazione e dei parametri spermatici, oltre che un'alterazione di quasi la metà del parenchima testicolare e alterazione dei tubuli seminiferi.

La dose di THC utilizzata nel nostro lavoro è di gran lunga al di sotto di quella che è stata definita nella specie murina dose letale 50 (LD50 in topi IV 42.4 mg/kg, intraperitoneale 455 mg/kg, IG 481 mg/kg) (Forney, 1971), ma maggiore rispetto a quelle solitamente impiegate in studi clinici in medicina umana (0.5-2.0 mg/kg/die THC per 30 giorni - 6 mesi) (Ball et al. 2015; deVries et al. 2016; Reichenbach ZW et al. 2015). La nostra scelta è però assolutamente compatibile con le dosi impiegate in studi preclinici sulle capacità riproduttive maschili *in vivo* nei topi (Δ^9 -THC 4-64 mg/kg, via intraperitoneale 0.1 ml/topo) (Blumstein et al. 2014; Sido et al. 2015; Ricci et al. 2007; Tilak 1984; Zimmerman 1986). È stata utilizzata la dose che in studi preclinici nella stessa specie *in vivo* è stata definita “*high dose*” al fine di massimizzarne l'effetto (Patra et al. 1991). Esistono pochi studi epidemiologici su come l'uso della cannabis possa influire sulla fertilità negli uomini.

L'uso di cannabis nei 3 mesi precedenti la raccolta del campione di seme costituisce un fattore predisponente per alterata spermioistogenesi (Pacey et al. 2014). Uno studio prospettico condotto su giovani danesi ha concluso che il fumo regolare di marijuana (più di una volta a settimana) è associato a concentrazione e conta spermatica inferiore di quasi il 30% (Gundersen et al. 2015). In altri lavori retrospettivi, l'unico parametro alterato negli uomini di coppie sterili che fumano marijuana era il volume eiaculato, che era più basso rispetto agli ex-fumatori o ai non fumatori (Lotti et al. 2016). Infine, Lewis et al. (2012) hanno identificato alterazioni di alcuni componenti del sistema endocannabinoide negli spermatozoi infertili rispetto agli spermatozoi fertili. Mentre studi condotti in centri di riproduzione, hanno notato che soggetti che hanno fumato marijuana 1 anno prima della procedura di fecondazione *in vitro*, avevano un minor numero di trasferimenti embrionali e, sebbene il tasso di impianto non fosse alterato, l'uso di marijuana per oltre 10 volte nella loro vita ha portato una riduzione del peso alla nascita dei bambini (Klonoff-Cohen et al. 2006). Sarebbe interessante completare il nostro studio con la valutazione delle percentuali di embrioni/gravidanze prodotti in seguito alla sola somministrazione di THC e di MACA dopo esposizione a THC.

Quindi, visti i risultati ottenuti, l'uso di cannabis non è sempre consigliato per problemi riguardanti la fertilità maschile. Tuttavia, diversi ricercatori hanno messo in dubbio questa conclusione perché non tutti gli studi mostrano risultati dannosi (Iversen, 2000) ed inoltre non è dimostrato che la marijuana generi danni permanenti alla funzione riproduttiva (Iversen, 2000; Zimmer et al. 1995).

Il tempo di somministrazione del THC, utilizzato in questo studio, è stato valutato in base ai dati presenti in letteratura. López-Cardona, nel suo articolo pubblicato nel 2018, ha testato la cronicità del trattamento di THC nei topi, valutando la concentrazione di THC nel cervello e nei testicoli dopo 30 giorni di trattamento, trovando una maggiore concentrazione di THC nei testicoli rispetto al cervello (López-Cardona et al. 2018). Dopo un periodo di *washout* di 5 giorni, la concentrazione di THC è diminuita significativamente, al di sopra del 95%, in entrambi i tessuti (Laprairie et al. 2012).

Vi è un largo consenso sulla riduzione della concentrazione spermatica epididimale dopo il trattamento con cannabinoidi (Kolodny et al. 1974; Hembree et al. 1976; Banerjee et al. 2011; Lewis et al. 2012;). Nello studio

condotto da Lopez, si è notata una diminuzione della concentrazione spermatica nei topi trattati con THC, anche se non significativa, come in altri studi (Huang et al. 1978; Hembree et al. 1978). Si è ipotizzato che la diminuzione di testosterone dopo il trattamento cronico con cannabis possa essere la causa che determini la diminuzione della concentrazione spermatica (Kolodny et al. 1974), anche se vi sono molte controversie sull'effetto dei cannabinoidi sulla produzione di testosterone (Zimmer et al. 1995; Hembree et al. 1976). Da qui, l'ipotesi più plausibile sembra essere che i cannabinoidi abbiano un effetto diretto sulla spermatogenesi (Hembree et al. 1978).

I risultati istologici da noi ottenuti sono in accordo con quanto descritto da Lopez-Cardora. Nel suo lavoro del 2018, a livello istologico riscontra un'attività spermatogenetica completa in più dell'80% dei tubuli di topi trattati con THC e non si notano differenze nella morfologia delle cellule del Sertoli e di Leydig nei gruppi analizzati. Inoltre, il numero di tubuli/testicolo ritrovati senza spermatozoi, la quantità di cellule del Sertoli vacuolate, la quantità di corpi residui di cellule del lume e/o di “cellule giganti” sinciziali intraluminari è molto bassa e senza differenze significative tra topi trattati e non trattati.

In altri lavori, invece, sono descritte alterazioni della spermatogenesi, ma è stato usato il *Continuing Medical Education* (CME) e non è stata specificata la composizione degli estratti di cannabis (Banerjee et al. 2011; Dixit 1981; Dixit et al. 1974; Hembree et al. 1978; Dixit et al. 1977; Dixit et al. 1977), tranne nel lavoro di Huang e collaboratori, in cui la spermatogenesi era alterata e la composizione di marijuana era 1,75/0,029% THC/CBD (Hembree et al. 1978).

Infine, l'incubazione *in vitro* di spermatociti pachitene e di spermatidi rotondi con cannabinoidi puri ha soppresso la sintesi macromolecolare. Questo potrebbe spiegare la riduzione della conta spermatica dopo un trattamento con cannabinoidi, sebbene le cellule spermatiche isolate in topi trattati con THC *in vivo* non abbia mostrato alcuna riduzione della sintesi macromolecolare (Tilak et al. 1984). I parametri comunemente usati per valutare la fertilità sono la motilità e i parametri cinetici degli spermatozoi. In alcuni casi, è possibile prevedere se gli spermatozoi saranno in grado di penetrare il muco cervicale *in vivo*, il cumulo ooforo e la zona pellucida dell'ovocita in un tentativo di fecondazione *in vitro* (Mortimer, 2000).

Nel nostro studio, gli spermatozoi epididimali, prelevati a 7 giorni dalla fine del trattamento in animali trattati con THC, hanno riportato un calo di tutti i parametri presi in esame, quali concentrazione, motilità totale, progressiva rapida e lenta, rispetto al gruppo CONTROLLO e a quello MACA. In letteratura, ancora una volta esistono pareri discordanti. Lopez-Cardona (2018) afferma nel suo studio che non vi è stata una differenza significativa riguardo i parametri di valutazione seminale tra il gruppo THC e il gruppo CONTROLLO, mentre esistono studi in cui è stata descritta una riduzione della motilità spermatica dopo un trattamento cronico con CEM (Banerjee et al. 2011) o HU-210 (Lewis et al. 2012). La spiegazione proposta da Lopez-Cardona (2018) per questi differenti risultati sta nel tempo trascorso tra la sospensione del THC/CEM/HU-210 e il sacrificio degli animali. Nei lavori in accordo con i nostri risultati, gli animali sono stati sacrificati a meno di 24 ore dall'ultima somministrazione di THC mentre Lopez, nel suo lavoro, ha sacrificato i topi 5 giorni dopo l'ultima dose. Studi sull'incubazione acuta *in vitro* degli spermatozoi con cannabinoidi dimostrano una riduzione della motilità degli spermatozoi (Hong et al. 1982; Rossato et al. 2005; Whan et al. 2006; Amoako et al. 2013; Agirregoitia et al. 2010; Cobellis et al. 2006; Morgan et al. 2012), a differenza degli studi condotti sull'uomo, dove l'uso di marijuana non ha portato a una riduzione significativa della motilità spermatica (Hembree et al. 1976; Hembree et al. 1978; Burkman et al. 2003). Il danno spermatico sarebbe ascrivibile esclusivamente ad azione diretta del THC sullo spermatozoo già maturo. Invece il danno gametotossico di THC è stato ampiamente dimostrato a vari livelli del ciclo spermatogenetico (Nahas, 2002). I risultati da noi ottenuti concorderebbero con tali ipotesi gametotossiche del THC.

Lo studio di Mandal e Das (2010), è stato il primo a mettere in relazione la gonadotossicità di *Cannabis Sativa* con lo stress ossidativo, basandosi sulla malondialdeide come indice di generazione di ROS e superossido dismutasi, catalasi e glutathione perossidasi come indici di capacità antiossidante totale (TAC). Il metodo utilizzato in questo studio (cioè il punteggio ROS-TAC) è preferibile perché combina TAC e ROS nella stima dello stato di stress ossidativo.

Oltre alla riduzione dei parametri seminali, l'aumento di ROS e la diminuzione di TAC e ROS-TAC nei ratti trattati con cannabis supporta la tesi secondo cui la spermatotossicità associata alla *Cannabis Sativa* è correlata allo stress ossidativo (Wolff et al. 2015), ma contrariamente a

quanto riportato da Abdel-Salam et al. (2014) che associa alla cannabis una riduzione dello stress ossidativo e un aumento del danno d'organo nei topi iniettati con endotossina. Gli spermatozoi sono cellule sensibili alle specie reattive dell'ossigeno a causa della loro ricchezza di acidi grassi polinsaturi e alla loro scarsa capacità trascrizionale. Lo stress ossidativo deriva da uno squilibrio tra pro-ossidanti e antiossidanti nel corpo (Poljsak et al. 2013; Rahal et al. 2014). Recentemente, è stato riportato un legame causale tra teratozoospermia e stress ossidativo (Agarwal et al. 2014; Ayaz et al. 2015), probabilmente per induzione di apoptosi, danno al DNA e alterazioni di proteine e lipidi (Agarwal et al. 2014; Sharma et al. 2013; Sharma et al. 2013a). Alti livelli di ROS sono stati riscontrati in circa il 40-88% di uomini sterili (Lewis et al. 1995). Inoltre, i livelli di ROS rappresentano un fattore predittivo di infertilità maschile con un'accuratezza del 80% (Ikawa et al. 1997); infatti, sono state riscontrate concentrazioni di antiossidanti minori nel plasma seminale di uomini sterili rispetto alle loro controparti fertili (Lewis et al. 1995; Pasqualotto et al. 2000; Pahune 2013).

Nel nostro lavoro è stato possibile osservare come la somministrazione di MACA abbia contenuto lo stress ossidativo indotto dalla somministrazione di THC. Attraverso la valutazione dei parametri seminali scelti, quali concentrazione totale, motilità totale, progressiva rapida e lenta, si è notato un miglioramento significativo nei soggetti in cui è stata somministrata MACA dopo THC, rispetto ai gruppi in cui sono stati somministrati singolarmente MACA e THC.

L'effetto benefico di MACA potrebbe essere spiegato attraverso la sua concentrazione di macamidi e macaeni, che rappresentano un gruppo diversificato di acidi grassi saturi e polinsaturi (Wang et al. 2007; Wu et al. 2013). Gli spermatozoi richiedono un elevato contenuto di PUFA per fornire alla membrana plasmatica la fluidità essenziale per l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale necessarie ai processi di fecondazione (Wathes et al. 2007). I cambiamenti ossidativi indotti dallo stress nella composizione dei PUFA degli spermatozoi, in particolare nel rapporto n-6 a n-3, causano cambiamenti nell'architettura della membrana che alterano la permeabilità della membrana e la fluidità delle sue funzioni (Cross, 2003; Maldjian et al. 2005). L'integrazione dietetica con PUFA in associazione con vitamina C o E, come antiossidanti nel cibo, aumenta la qualità dello sperma di conigli (Castellini et al. 2004), polli (Surai, 2000), galli (Cerolini et al. 2005), cinghiali (Liu et al. 2015), quaglia giapponese (Al-Daraji et al. 2010),

montoni (Alizadeh et al. 2014; Jafaroghli et al. 2014), capre (Dolatpanah et al. 2008) tori (Kaka et al. 2015) e stalloni (Del Prete, 2018). Senza antiossidanti aggiunti per preservare il cibo dall'ossidazione, la somministrazione di PUFA produce risultati contrastanti (De Graaf et al. 2007; Grady et al. 2009; Fair et al. 2014), molto probabilmente a causa della perossidazione del contenuto lipidico degli alimenti (Cerolini et al. 2006).

I ROS sono la causa principale del danno al DNA spermatico (Aitken & De Iuliis, 2007). Wnuk et al. (2010) hanno trovato una correlazione negativa tra la capacità antiossidante totale degli stalloni e il danno al DNA spermatico, così come Del Prete et al. (2018) descrivono una riduzione del danno al DNA spermatico a 72 ore di conservazione dopo integrazione alimentare con MACA. L'unica ipotesi ragionevole è che MACA influenzi i livelli di antiossidanti enzimatici nel plasma seminale e lo stato di antiossidanti sistemici, proteggendo gli spermatozoi dallo stress ossidativo. Per chiarire questo potenziale effetto di MACA sulla capacità antiossidante sistemica, sono necessarie però ulteriori analisi come la valutazione di marker apoptotici (caspase e mapkinase) mediante immunofluorescenza, citofuorimetria di flusso, western blotting (Brum et al. 2008; Ortega-Ferrusola et al. 2008). La conservazione dell'integrità dell'acrosoma potrebbe essere associata alla capacità di MACA di alleviare l'effetto dei ROS sulla fosforilazione delle proteine coinvolte nel meccanismo di reazione dell'acrosoma (Cocchia et al. 2011).

Poiché questo studio è il primo a esplorare i potenziali antiossidanti di MACA associati al consumo cronico di *Cannabis Sativa*, sono necessari ulteriori studi che indaghino lo stato ROS, TAC ed il punteggio ROS-TAC per verificarne il possibile effetto antiossidante (d-ROMs Test, Radicals Oxygen Metabolites Test).

5.5 Conclusioni

Questo studio conferma gli effetti negativi del THC sui parametri seminali murini e, inoltre, dimostra per la prima volta come la somministrazione *in vivo* di MACA sia in grado di contrastare gli effetti negativi del THC sui parametri seminali nel topo.

- Abarikwu, S. O., Wokoma, A. F., Mgbudom-Okah, C. J., Omeodu, S. I., & Ohanador, R. (2019). Effect of Fe and Cd co-exposure on testicular steroid metabolism, morphometry, and spermatogenesis in mice. *Biological trace element research*, 190(1), 109-123.
- Abdel-Salam OME, Nada SA, Salem NA, El-Shamarka ME, Omara E. Effect of *Cannabis Sativa* on oxidative stress and organ damage after systemic endotoxin administration in mice. *Comp. Clin. Pathol.* 2014;23:1069–1085.
- Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J. Men's Health.* 2014;32:1–17.
- Agirregoitia E, Carracedo A, Subirán N, Valdivia A, Agirregoitia N, Peralta L, Velasco G, Irazusta J, The CB(2) cannabinoid receptor regulates human sperm cell motility, *Fertil. Steril.* 93 (2010) 1378–1387.
- Aktoz, T., Durmus-Altun, G., Usta, U., Torun, N., Ergulen, A., & Atakan, I. H. (2012). Radioiodine-induced kidney damage and protective effect of amifostine: An experimental study. *Hippokratia*, 16(1), 40–45.
- Amoako AA, Marczylo TH, Marczylo EL, Elson J, Willets JM, Taylor AH, et al. Anandamide modulates human sperm motility: implications for men with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia, *Hum. Reprod.* 28 (2013) 2058–2066.
- Annunziata, C., Lama, A., Pirozzi, C., Cavaliere, G., Trinchese, G., Di Guida, F., ... & Murru, E. (2020). Palmitoylethanolamide counteracts hepatic metabolic inflexibility modulating mitochondrial function and efficiency in diet-induced obese mice. *The FASEB Journal*, 34(1), 350-364.
- Avicenna A. QanoondarTeb.Soroosh Press: Tehran, Iran, 1988.
- Ayaz A, Agarwal A, Sharma R, Arafa M, Elbardisi H, Cui Z. Impact of precise modulation of reactive oxygen species levels on spermatozoa proteins in infertile men. *Clin. Proteomics.* 2015;12:4. <http://dx.doi.org/10.1186/1559-0275-12-4>.
- Ball S, Vickery J, Hobart J, Wright D, Green C, Shearer J, Nunn A, Cano MG, MacManus D, Miller D, Mallik S, Zajicek J. The Cannabinoid Use in Progressive Inflammatory brain Disease (CUPID) trial: a randomiseddouble-blind placebo-controlled parallel-group multicentre trial and economic evaluation of cannabinoids to slow progression in multiple sclerosis. *Health Technol Assess.* 2015, 1-187.
- Banerjee A, Singh A, Srivastava P, Turner H, Krishna A, Effects of chronic bhang (cannabis) administration on the reproductive system of male mice, *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 92 (2011) 195–205.

- Battista N, Bari M, Maccarrone M, Endocannabinoids and reproductive events in health and disease, *Handb. Exp. Pharmacol.* 231 (2015) 341–365.
- Berdyshev EV, Inhibition of sea urchin fertilization by fatty acid ethanolamides and cannabinoids, *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122 (1999) 327–330.
- Blumstein GW, Parsa A, Park AK, McDowell BLP, Arroyo-Mendoza M, Girguis M, Adler-Moore JP, Olson J, Buckley NE Effect of Delta-9-Tetrahydrocannabinol on Mouse Resistance to Systemic *Candida albicans* Infection *PLoS One*. 2014, 9(7),103288.
- Bogani P, Simonini F, Iriti M, Rossoni M, Faoro F, Poletti A, Visioli, *Lepidium Meyenii* (Maca) does not exert direct androgenic activities, *J.Ethnopharmacol.* 104 (3) (2006) 415–417.
- Bustos-Obregón E., Yucra S., Gonzales G.F. *Lepidium meyenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice. *Asian journal of andrology* 2005, 7(1), 71-76.
- Bustos-Obregón E., Del Río F. C., Sarabia, L. Morphometric Analysis of Mice Testicular Tubules after Administration of Malathion and Maca. *International Journal of Morphology* 2007, 25(2).
- Callister LC, Global infertility: are we caring yet? *MCN Am. J. Matern. ChildNurs.* 35 (2010) 174.
- Chang MC, Berkery D, Schuel R, Laychock SG, Zimmerman AM, Zimmerman S, Schuel H, Evidence for a cannabinoid receptor in sea urchin sperm and its role in blockade of the acrosome reaction, *Mol. Reprod. Dev.* 36 (1993) 507–516.
- Chung F, Rubio J, Gonzales C, Gasco M, Gonzales GF, Dose-response effects of *Lepidium Meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats, *J. Ethnopharmacol.* 98 (1–2) (2005) 143–147.
- Cicero AFG, Bandieri E & Arletti R. (2001) *Lepidium Meyenii* Walp. improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *J Ethnopharmacol* 75, 225–229.
- Cicero AFG, Piacente S, Plaza A, Sala E, Arletti R & Pizza C. (2002) Hexanic MACA extract improves rat sexual performance more effectively than methanolic and chloroformic MACA extracts. *Andrologia* 34, 177–179.
- Clement C, Kneubühler J, Urwyler A, Witschi U & Kreuzer M. (2010) Effect of MACA supplementation on bovine sperm quantity and quality followed over two spermatogenic cycles. *Theriogenology* 74, 173–183.

- Clement C, Kneubühler J, Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Shao Y, Huang ZY, Lu Y, Yan SJ, Qien LC & Zheng QY. (2000) Effect of a lipidic extract from *Lepidium Meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 55, 598–602.
- Cobellis G, Cacciola G, Scarpa D, Meccariello R, Chianese R, Franzoni MF, Mackie K, Pierantoni R, Fasano S, Endocannabinoid system in frog and rodent testis: type-1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase activity in male germ cells, *Biol. Reprod.* 75 (2006) 82–89.
- Coretti L, Cristiano C, Florio E, Scala G, Lama A, Keller S, (2017). Sex-related alterations of gut microbiota composition in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. *Scientific reports*, 7, 45356.
- Coulson C, Jenkins J., Complementary and alternative medicine utilisation in NHS and private clinic settings: a United Kingdom survey of 400 infertility patients, *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* 2 (1) (2005) 5.
- Dalterio S, Badr F, Bartke A, Mayfield D, Cannabinoids in male mice: effects on fertility and spermatogenesis, *Science* 216 (1982) 315–316.
- Del Prete C., Tafuri S., Ciani F., Pasolini M.P., Ciotola F., Albarella S., Carotenuto D., Peretti V., Cocchia N. Influences of dietary supplementation with *Lepidium meyenii* (Maca) on stallion sperm production and on preservation of sperm quality during storage at 5 C. *Andrology* 2018, 6(2), 351-361.
- deVries M, Van Rijckevorsel DC, Vissers KC, Wilder-Smith OH, Van Goor H. Single dose delta-9-tetrahydrocannabinol in chronic pancreatitis patients: analgesic efficacy, pharmacokinetics and tolerability. *Br J Clin Pharmacol.* 2016, 81(3),525-37.
- Dixit VP, Effects of *Cannabis Sativa* extract on testicular function of *Presbytis entellus entellus*, *Planta Med.* 41 (1981) 288–294.
- Dixit VP, Gupta CL, Agrawal M, Testicular degeneration and necrosis induced by chronic administration of cannabis extract in dogs, *Endokrinologie* 69 (1977a) 299–305.
- Dixit VP, Jain HC, Verma OP, Sharma AN, Effects of cannabis extract on the testicular function of the toad *Bufo andersonii* Boulenger, *Indian J. Exp. Biol.* 15 (1977) 555–557.
- Dixit VP, Sharma VN, Lohiya NK, The effect of chronically administered cannabis extract on the testicular function of mice, *Eur. J. Pharmacol.* 26 (1974) 111–114.
- duPlessis SS, Agarwal A, Syriac A. Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2015, 32(11), 1575-1588.

- Eisenberg ML. Invited commentary: the association between marijuana use and male reproductive health. *American journal of epidemiology* 2015, 182(6), 482-484.
- Fields E, Chard J, James D, Treasure T; Guideline Development Group, Fertility (update): summary of NICE guidance, *BMJ* 346 (2013) f650.
- Forney RB. Toxicology of marihuana. *Pharmacol Rev.* 1971, 23(4), 279-84. Review.
- Fronczak CM, Kim ED, Barqawi AB. The insults of illicit drug use on male fertility. *Journal of andrology* 2012, 33(4), 515-528.
- Ghadiri MK, and Gorji A. Natural remedies for impotence in medieval Persia. *International journal of impotence research* 2004, 16(1), 80-83.
- Ghanem H, Shamloul R. An evidence-based perspective to the medical treatment of male infertility: a short review. *Urologiainternationalis* 2009, 82(2), 125-129.
- Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S & Gonzales GF. (2006) Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium Meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *J Ethnopharmacol* 103, 448–454.
- Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. 2006. Effect of Black MACA (*Lepidium Meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. *Andrologia*. 38(5):166–172.
- Gonzales G, Gasco M, Cordova A, Chung A, Rubio J & Villegas L. (2004) Effect of *Lepidium Meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). *J Endocrinol* 180, 87–95
- Gonzales GF, Cordova A, Gonzales C, Chung A, Vega K & Villena A. (2001) *Lepidium Meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian J Androl* 3, 301–304.
- Gonzales GF, Cordova A, Vega K, Chung A, Villena A, Go~nez C & Castillo S. (2002) Effect of *Lepidium Meyenii* (MACA) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. *Andrologia* 34, 367–372.
- Gonzales GF, Cordova A, Vega K, Chung A, Villena A, Gonez C. 2003. Effect of *Lepidium Meyenii* (Maca) a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *J Endocrinol*. 176(1):163–168.
- Gonzales GF, Gasco M, Cordova A, Chung A, Rubio J, Villegas L. 2004. Effect of *Lepidium Meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). *J Endocrinol*. 180(1):87–95.

- Gonzales GF, Gasco M, Malheiros-Pereira A, Gonzales-Castañeda C. 2008. Antagonist effect of *Lepidium Meyenii* (Red Maca) on prostatic hyperplasia in adult mice. *Andrology*. 40(3): 179–185.
- Gonzales GF, Gonzales C, Gonzales-Castañeda C. 2009. *Lepidium Meyenii* (Maca): A Plant from the Highlands of Peru – from Tradition to Science. *Forsch Komplementmed*. 16(6):373–380.
- Gonzales GF, Gonzales-Castañeda C & Gasco M. (2013b) A mixture of extracts from Peruvian plants (black MACA and yacon) improves sperm count and reduced glycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Toxicol Mech Methods* 23, 509–518.
- Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, Fernandez G, Yucra S, Rubio J, Yi P, Gasco M. 2005. Red MACA (*Lepidium Meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 3:1–5.
- Gonzales GF, Rubio J, Chung A, Gasco M, Villegas L. 2003. Effect of alcoholic of *Lepidium Meyenii* (Maca) on testicular function of male rats. *Asian J Androl*. 5(4):349–352.
- Gonzales GF, Ruiz A, Gonzales C, Villegas L, Cordova A. 2001. Effect on *Lepidium Meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis in male rats. *Asian J Androl*. 3(3):231–233.
- Gonzales GF, Vasquez V, Rodriguez D, Maldonado C, Mormontoy J, Portella J, Pajuelo M, Villegas L, Gasco M, Mathur PP. 2007. Effect of two different extract of Red MACA in male rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. *Asian J Andrology*. 9(2):245–251.
- Gonzales GF, Vasquez VB, Gasco M. 2013. The transillumination technique as a method for the assessment of spermatogenesis using medicinal plants: the effect of extracts of Black MACA (*Lepidium Meyenii*) and camu camu (*Myrciaria dubia*) on stages of the spermatogenic cycle in male rats. *Toxicol Mech Methods*. 23(8):559–565.
- Gonzales GF, Villaorduna L, Gasco M, Rubio J & Gonzales C. (2014) MACA (*Lepidium Meyenii* Walp), una revision sobre sus propiedades biológicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 31, 100–110.
- Gonzales GF. 2006c. Biological effects of *Lepidium Meyenii*, Maca, a plant from the highlands of Peru. In: Singh VK, Boardwalk R, Govil JN, Sharma RK, editors. *Natural Products. Series: Recent Progress in Medical Plants*. India: Stadium Press; 15:217–242.
- Gonzales GF. 2012. Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium Meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012:193496.

- Gonzales-Arimborgo C, Yupanqui I, Montero E, Alarcon-Yaquette D, Zevallos-Concha A, Caballero L, Gasco M, Zhao J, Khan I, Gonzales GF. 2016. Acceptability, safety, and efficacy of oral administration of extracts of black or red MACA (*Lepidium Meyenii*) in adult human subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Pharmaceuticals* (Basel). 9(3):49.
- Gundersen TD, Jorgensen N, Andersson AM, Bang AK, Nordkap L, Skakkebaek NE, Priskorn L, Juul A, Jensen TK, Association between use of marijuana and male reproductive hormones and semen quality: a study among 1,215 healthy young men, *Am. J. Epidemiol.* 182 (2015) 473–481.
- Hembree III WC, Nahas GG, Zeidenberg P, Huang HF. Changes in human spermatozoa associated with high-dose marihuana smoking. In *Marihuana and medicine 1999*(pp. 367-378). Humana Press.
- Hembree WC 3rd, Nahas GG, Zeidenberg P, Huang HF, Changes in human spermatozoa associated with high dose marihuana smoking, *Adv. Biosci.* 22–23 (1978) 429–439.
- Hembree WC, Zeidenberg P, Nahas GG, *Marihuana's Effects on Human Gonadal Function. Marihuana, Chemistry, Biochemistry, and Cellular Effects*, Springer, New York, 1976, pp. 521–532.
- Hong CY; Chaput De Saintonge DM; Turner P; Fairbairn JW, Comparison of the inhibitory action of delta-9-tetrahydrocannabinol and petroleum spirit extract of herbal cannabis on human sperm motility, *Hum. Toxicol.* 1 (1982) 151–154.
- Huang HF, Nahas GG, Hembree WC 3rd, Effects of marihuana inhalation on spermatogenesis of the rat, *Adv. Biosci.* 22–23 (1978) 419–427.
- Ikawa M, Wada I, Kominami K, Watanabe D, Toshimori K, Nishimune Y, et al.. The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility. *Nature.* 1997;387:607–611.
- Isiaka Abdullateef Alagbonsi, Luqman Aribidesi Olayaki. Role of oxidative stress in *Cannabis Sativa*-associated spermatotoxicity: Evidence for ameliorative effect of combined but not separate melatonin and vitamin C. *Middle East Fertility Society Journal* 22 (2017) 136–144
- Iversen LL, *Sex Hormones and Reproduction. The Science of Marijuana*, Oxford University Press, Oxford, 2000, pp. 68–69.
- Johnsen, S. G. (1970). Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone Research in Paediatrics*, 1(1), 2-25.

- Joy JE, Watson SJ Jr., Benson JA Jr, Physiological Harms: Tissue and Organ Damages. Marijuana and Medicine: Assessing the Science Base, National Academy Press, Washington, DC, 1999, pp. 122–125.
- Kilham, C., 2000. What is Maca? *Total Health* 22(2), 48-49.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313-1321.
- Klonoff-Cohen HS, Natarajan L, Chen RV, A prospective study of the effects of female and male marijuana use on in vitro fertilization (IVF) and gamete intrafallopian transfer (GIFT) outcomes, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194 (2006) 369–376.
- Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G, Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marihuana use, *N. Engl. J. Med.* 290 (1974) 872–874.
- Lee MS, Shin BC, Yang EJ, Lim HJ, Ernst E, MACA (*Lepidium Meyenii*) fortreatment of menopausal symptoms: a systematic review, *Maturitas* 70 (3)(2011) 227–233.
- Lembè DM, Gasco M, Gonzales GF. Synergistic effect of the hydroalcoholic extract from *Lepidiummeyenii* (Brassicaceae) and *Fagaratessmannii* (Rutaceae) on male sexual organs and hormone level in rats. *Pharmacognosy research* 2014, 6(1), 80.
- Lentz A.C., Carson III C.C., L. Marson, Does the new herbal supplement “Maca” enhance erectile function or female sexual function? *Semin. Prev. Alt. Med.* 2(2) (2006) 85–90.
- Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 1995;64:868–870.
- Lewis SE, Paro R, Borriello L, Simon L, Robinson L, Dincer Z, Riedel G, Battista N, Maccarrone M, Long-term use of HU210 adversely affects spermatogenesis in rats by modulating the endocannabinoid system, *Int. J. Androl.* 35 (2012) 731–740.
- Lewis SE, Rapino C, Di Tommaso M, Pucci M, Battista N, Paro R, Simon L, Lutton D, Maccarrone M, Differences in the endocannabinoid system of sperm from fertile and infertile men, *PLoS One* 7 (2012) e47704.
- Liang W, Menke AL, Driessen A, KoekGH, Lindeman JH, et al. (2014) Establishment of aGeneral NAFLD Scoring System for RodentModels and Comparison to Human LiverPathology. *PLoS ONE* 9(12): e115922. doi:10.1371/journal.pone.0115922

- López-Cardona AP, Ibarra-Lecue I, Laguna-Barraza R, Pérez-Cerezales S, Urigüen L, Agirregoitia N, Gutiérrez-Adán A, Agirregoitia E. Effect of chronic THC administration in the reproductive organs of male mice, spermatozoa and in vitro fertilization. *Biochem Pharmacol.* 2018 Nov;157:294-303. doi: 10.1016/j.bcp.2018.07.045. Epub 2018 Aug 3.
- Lotti F, Corona G, Vitale P, Maseroli E, Rossi M, Fino MG, Maggi M, et al. Current smoking is associated with lower seminal vesicles and ejaculate volume, despite higher testosterone levels, in male subjects of infertile couples, *Hum. Reprod.* 30 (2016) 590–602.
- M. Practice Committee of the American Society for Reproductive, Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion, *Fertil. Steril.* 103 (2015)e18–25.
- Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabò N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M, Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 4393–4404.
- Mandal TK, Das NS. Testicular toxicity in cannabis extract treated mice: association with oxidative stress and role of anti-oxidant enzyme systems. *Toxicol. Ind. Health.* 2010;26:11–23.
- Mehraein, F., & Negahdar, F. (2011). Morphometric evaluation of seminiferous tubules in aged mice testes after melatonin administration. *Cell Journal (Yakhteh)*, 13(1), 1.
- Melnikovova I, Fait T, Kolarova M, Fernandez EC & Milella L. (2015) Effect of *Lepidium Meyenii* Walp. on semen parameters and serum hormone levels in healthy adult men: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015, 1–6.
- Melnikovova I, Havlik J, Fernandez-Cusimamani E & Milella L. (2012) Macamides and fatty acids content comparison in MACA cultivated plant under field conditions and greenhouse. *BLACPMA* 11, 420– 427.
- Melnikovova I, Tomas F, Huml L, Kolarova M, Lapcik O, Cusimamani E, Effect of *Lepidium Meyenii* on semen quality and reproductive hormones level in healthy adult men, *Climacteric* 17 (2014) 87.
- Morgan DJ, Muller CH, Murataeva NA, Davis BJ, Mackie K, Delta9-Tetrahydrocannabinol (Delta9-THC) attenuates mouse sperm motility and male fecundity, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 2575–2583.
- Mortimer ST, CASA—practical aspects, *J. Androl.* 21 (2000) 515–524.

- Mostafa T, Anis T, Imam H, El-Nashar AR, Osman IA, Seminal reactiveoxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele, *Andrologia* 41 (2009) 125–129.
- Nahas GG, Frick HC, Lattimer JK, Latour C, Harvey D, Pharmacokinetics of THC in brain and testis, male gametotoxicity and premature apoptosis of spermatozoa, *Hum. Psychopharmacol.* 17 (2002) 103–113.
- National Academies of Sciences E, and Medicine, *The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research*, The National Academies Press, Washington, DC, 2017.
- Ohta Y, Yoshida K, Kamiya S, Kawate N, Takahashi M, Inaba T, Hatoya S, Morii H, Takahashi K, Ito M, Ogawa H & Tamasa H. (2016) Feeding hydroalcoholic extract powder of *Lepidium Meyenii* (maca) increases serum testosterone concentration and enhances steroidogenic ability of Leydig cells in male rats. *Andrologia* 48, 347–354.
- Pacey AA, Povey AC, Clyma JA, McNamee R, Moore HD, Baillie H, Cherry NM, Modifiable and non-modifiable risk factors for poor sperm morphology, *Hum. Reprod.* 29 (2014) 1629–1636.
- Pahune PP, Choudhari AR, Muley PA. The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. *J. Clin. Diagn. Res.* 2013;7:991–995.
- Park B, McPartland JM, Glass M. Cannabis, cannabinoids and reproduction. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids 2004, 70(2), 189–197.
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts JM, Nelson DR, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology*. 2000;55:881–885.
- Patra PB, Wadsworth RM Quantitative evaluation of spermatogenesis in mice following chronic exposure to cannabinoids. *Andrologia*. 1991, 23(2), 151–6.
- Pino-Figueroa A, Vu H, Kelley CJ & Maher TJ. (2011) Mechanism of action of *Lepidium Meyenii* (Maca): an explanation for its neuroprotective activity. *Am J Neuroprot Neuroreg* 3, 87–92.
- Poljsak B, Suput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic anti-oxidants. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013;2013:11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/956792> 956792.
- ProCon. Number of Legal Medical Marijuana Patients. Number of Legal Medical Marijuana Patients.

- <https://medicalmarijuana.procon.org/view.resource.php?resourceID=0058892016>. p. Last updated on: 3//2016 11:32:03 AM PST.
- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al.. and antioxidants: the interplay. *BioMed Res. Int.* 2014;2014:19. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/761264> 761264.
- Reichenbach ZW, Sloan J, Rizvi-Toner A, Bayman L, Valestin J, Schey R. A 4-week pilot study with the cannabinoid receptor agonist dronabinol and its effect on metabolic parameters in a randomized trial. *Clin Ther.* 2015, 1;37(10), 2267-74.
- Ricci G, Cacciola G, Altucci L, Meccariello R, Pierantoni R, Fasano S, Cobellis G. Endocannabinoid control of sperm motility: the role of epididymus. *Gen Comp Endocrinol.* 2007 Aug-Sep,153(1-3),320-2.
- Rodriguez-Huaman A, Casimiro-Gonzales S, Chavez-Perez JA, Gonzales-Arimborgo C, Cisneros-Fernandez R, Aguilar-Mendoza LA & Gonzales GF. (2017) Antioxidant and neuroprotector effect of *Lepidium Meyenii* (maca) methanol leaf extract against 6-hydroxy dopamine (6-OHDA)-induced toxicity in PC12 cells. *Toxicol Mech Methods* 27, 279–285.
- Rossato M, Ion Popa F, Ferigo M, Clari G, Foresta C, Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 984–991.
- Rubio J, Dang H, Gong M, Liu X, Chen SL & Gonzales GF. (2007) Aqueous and hydroalcoholic extracts of Black MACA (*Lepidium Meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice. *Food Chem Toxicol* 45, 1882–1890.
- Rubio J, Riqueros MI, Gasco M, Yucra S, Miranda S, Gonzales GF. 2006. *Lepidium Meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol.* 44(7):1114–1122.
- Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Mascha E, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility, *Fertil. Steril.* 82 (2004) 871–877.
- Sailani MR, Moeini H. Effect of *Rutagraveolens* and *Cannabis Sativa* alcoholic extract on spermatogenesis in the adult wistar male rats. *Indian Journal of Urology* 2007, 23(3), 257.
- Sandoval M, Okuhama NN, Angeles FM, Melchor VV, Condezo LA, Lao J & Miller MJ. (2002) Antioxidant activity of the cruciferous vegetable MACA (*Lepidium Meyenii*). *Food Chem* 79, 207–213.

- Schuel H, Goldstein E, Mechoulam R, Zimmerman AM, Zimmerman S, Anandamide (arachidonylethanolamide), a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 7678–7682.
- Schuel H, Schuel R, Zimmerman AM, Zimmerman S, Cannabinoids reduce fertility of sea urchin sperm, *Biochem. Cell Biol.* 65 (1987) 130–136.
- Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Du Plessis SS, Gopalan B, Willard B, et al.. Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2013;11:85.
- Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Hamada AJ, Gopalan B, Willard B, et al.. Proteomic analysis of human spermatozoa proteins with oxidative stress. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2013a;11:48.
- Shin BC, Lee MS, Yang EJ, Lim HS, Ernst E, MACA (*L. meyenii*) for improving sexual function: a systematic review, *BMC Complement. Altern. Med.* 10(2010) 44.
- Sido JM, Nagarkatti PS, Nagarkatti M, Coste AT Δ^9 -Tetrahydrocannabinol attenuates allogeneic host-versus-graft response and delays skin graft rejection through activation of cannabinoid receptor 1 and induction of myeloid-derived suppressor cells *J Leukoc Biol.* 2015 Sep, 98(3), 435–447.
- Singh SK, Chakravarty S, Antispermatogetic and antifertility effects of 20,25-diazacholesterol dihydrochloride in mice, *Reprod. Toxicol.* 17 (2003) 37–44.
- Smith JF, Eisenberg ML, Millstein SG, Nachtigall RD, Shindel AW, Wing H, Cedars M, Pasch L, Katz PP; Infertility Outcomes Program Project Group, The use of complementary and alternative fertility treatment incouples seeking fertility care: data from a prospective cohort in the UnitedStates, *Fertil. Steril.* 93 (7) (2010) 2169–2174.
- Stankiewicz M, Smith C, Alvino H, Norman R. The use of complementary medicine and therapies by patients attending a reproductive medicine unit in South Australia: a prospective survey, *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 47 (2)(2007) 145–149.
- Teixeira, T. A., Pariz, J. R., Dutra, R. T., Saldiva, P. H., Costa, E., & Hallak, J. (2019). Cut-off values of the Johnsen score and Copenhagen index as histopathological prognostic factors for postoperative semen quality in selected infertile patients undergoing microsurgical correction of bilateral subclinical varicocele. *Translational andrology and urology*, 8(4), 346.

- Tello J, Hermann M, Calderon A. 1992. La MACA (*Lepidium Meyenii* Walp.): Cultivo Alimenticio Potencial para las Zonas Altoandinas. *Boletín de Lima*. 81:59–66.
- Tilak SK Effects of cannabinoids on macromolecular synthesis in isolated spermatogenic cells. *Pharmacology*. 1984, 29(6), 343-50.
- Tkaczyk M, Florek E, Piekoszewski W. Marihuana and cannabinoids as medicaments. *Przegląd Lekarski* 2011, 69(10), 1095-1097.
- Tremellen K, Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective, *Hum. Reprod. Update* 14 (2008) 243–258.
- UNODOC. World Drug Report 2016. https://www.unodc.org/doc/wdr2016/WDR_2016_ExSum_english.pdf: United Nations Office on Drugs and Crime. 2017; 2016.
- Valentova K, Buckiova D, Kren V, Peknicova J, Ulrichova J & Simanek V. (2006) The in vitro biological activity of *Lepidium Meyenii* extracts. *Cell Biol Toxicol* 22, 91–99.
- Valentová K, Frcek J, Ulrichová J. Yacon (*Small anthussonchifolius*) and MACA (*Lepidium Meyenii*), traditional Andean crops as new functional foods on the European market. *Feedback* 1997, 91.
- Wang Y, Wang Y, McNeil B, Harvey LM. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. *Food Research International* 2007, 40(7), 783-792.
- Whan LB, West MC, McClure N, Lewis SE, Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro, *Fertil. Steril.* 85 (2006) 653–660.
- Wolff V, Schlagowski A, Rouyer O, Charles A, Singh F, Auger C, et al, Tetrahydrocannabinol induces brain mitochondrial respiratory chain dysfunction and increases oxidative stress: a potential mechanism involved in cannabis-related stroke. *BioMed Res. Int.* 2015;2015:7. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/323706> 323706.
- Zhang J, Mu X, Xia Y, Martin FL, Hang W, Liu L, Tian M, Huang Q, Shen H. Shen, Metabolomic analysis reveals a unique urinary pattern in normozoospermic infertile men, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 3088–3099.
- Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Shao YU, Huang ZY, LuY, Yan SJ, Qien LC Zheng QY. Effect of a lipidic extract from *Lepidium Meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 2000, 55(4), 598-602.
- Zimmer LE, Morgan JP, Marijuana Harms Sexual Maturation and Reproduction. *Marijuana Myths Marijuana Facts: A Review Of The Scientific Evidence*, Open Society Institute, New York, 1995, p. 7.

Zimmerman AM, Murer-Orlando ML, Richer CL. Effect of cannabinoids on spermatogenesis in vivo: a cytological study. *Cytobios.* 1986, 45(180), 7-15.

Zini A., Fischer M.A., Nam R.K., Jarvi K., Use of alternative and hormonal therapies in male infertility, *Urology* 63 (1) (2004) 141–143.