



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Dottorato di Ricerca Internazionale in “Medicina Sperimentale  
Clinica e Fisiopatologia Cellulare” – XXVI ciclo  
(Coordinatore: Prof. Enzo S. Vicari)

---

Tesi di Dottorato

**Effetti della nicotina sulla funzione  
spermatICA *in vitro***

**Dott. Giaccone Filippo**

**Tutor**

**Chiar.mo Prof. Aldo E. Calogero**

**Coordinatore**

**Chiar.mo Prof. Enzo S. Vicari**

---

Anno Accademico 2013/2014

# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	4
1.1 Il tabagismo.....	4
1.2 Epidemiologia del fumo di tabacco in Italia.....	8
1.3 Fumo ed infertilità maschile.....	11
1.4 Sostanze prodotte e liberate durante il fumo di tabacco.....	15
1.5 Proprietà chimiche, assorbimento, metabolismo ed escrezione della nicotina.....	21
1.6 Scopo dello studio.....	25
<b>Materiali e Metodi</b> .....	26
2.1 Selezione della casistica.....	26
2.2 Analisi e preparazione del liquido seminale: disegno sperimentale dello studio <i>in vitro</i> .....	27
2.3 Analisi citofluorimetrica.....	30
2.4 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale.....	30

2.5 Esternalizzazione della fosfatidilserina.....	33
2.6 Valutazione del grado di compattazione della cromatina.....	35
2.7 Studio della frammentazione del DNA.....	36
2.8 Analisi statistica.....	37
<b>Risultati</b> .....	38
<b>Discussione</b> .....	45
<b>Conclusione</b> .....	52
<b>Bibliografia</b> .....	54

# INTRODUZIONE

## 1.1 Il tabagismo

Il consumo del tabacco può essere considerato come un'epidemia responsabile di un numero di decessi superiore a quelli causati dall'alcol, dalle droghe, dagli incidenti stradali, dagli omicidi e suicidi messi insieme. Proprio per questo lo si considera come una delle più grandi sfide della storia da combattere in campo di sanità pubblica; l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito difatti, il consumo di tabacco come *“la più grande minaccia per la salute nella Regione Europea”*. Oltre che con il fumo di sigaretta, il tabacco può essere consumato anche fumando sigari, pipe, narghilè e con il tabacco da fiuto (*snuff*), che consiste in tabacco finemente macinato che viene aspirato dalle narici.

Nel mondo i fumatori di tabacco sono 650 milioni e i morti causati del fumo sono 5.4 milioni ogni anno, cifra destinata ad aumentare, difatti si stima che nel 2030 i morti saranno 8 milioni. Nel XX secolo, 100 milioni di persone sono morte a causa del fumo e nel XXI secolo si stima ne moriranno 1 miliardo. Nei paesi

dell'Unione Europea (UE), ogni anno, muoiono prematuramente a causa del fumo 650.000 persone (una cifra superiore alla popolazione di Malta o del Lussemburgo).

Il tabagismo è ampiamente riconosciuto come fattore di rischio per 25 patologie potenzialmente mortali (WHO, 1997), ed in particolare per 4 delle principali cause di morte nei paesi occidentali: cardiopatia ischemica, malattie cerebrovascolari, tumore del polmone, broncopneumopatia cronica (Wald and Hackshaw, 1996; Zaher et al., 2004). L'insorgenza di queste patologie è correlata agli anni di fumo ed alla quantità di tabacco consumato (Peto et al., 2000; Simonato et al., 2001). La stretta correlazione tra fumo e le 25 patologie è stata confermata anche da Laezza nel 1999; egli ha dimostrato che dopo la sospensione del fumo di tabacco si riduce il rischio di contrarre una patologia fumo-correlata, e tra queste:

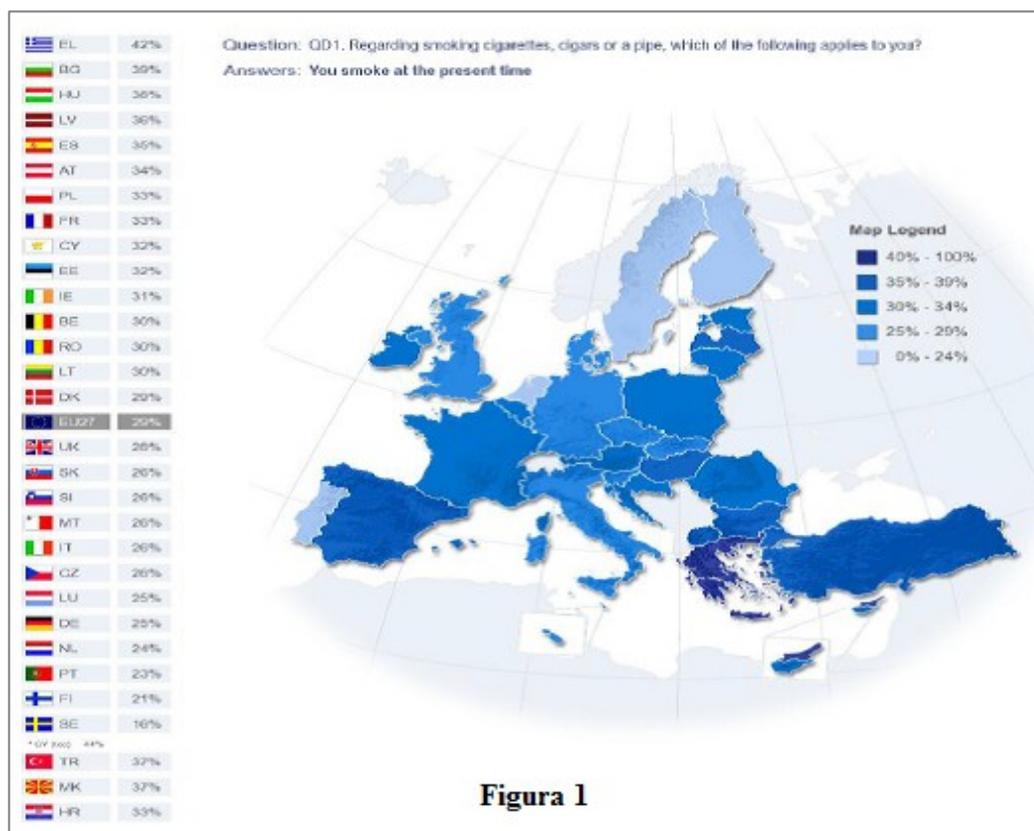
- Cancro della vescica: riduzione del rischio pari a quello di un non fumatore dopo 16 anni dalla sospensione;

- Cancro della laringe: rischio pari a quello di un non fumatore a 10-15 anni dalla sospensione;
- Cancro della cavità orale: rischio ridotto dopo 6 anni e rischio pari a quello di un non fumatore dopo 16 anni dalla sospensione;
- Malattia vascolare periferica: arresto immediato della progressione della malattia;
- Malattia cerebrovascolare: in meno di un anno il rischio diventa pari a quello di un non fumatore;
- Malattia coronarica: riduzione del 50% in meno di un anno e rischio pari a quello di un non fumatore a 10-15 anni;
- Cancro polmonare: riduzione del 60% a 5 anni e del 50-90% a 15-20 anni.

Un altro apparato che sembra risentire degli effetti deleteri del fumo è quello riproduttivo, sia maschile che femminile; negli ultimi anni molti sono stati gli studi che hanno riconosciuto nel fumo una causa di infertilità.

Anche il fumo passivo è responsabile di patologie e morti premature; nel mondo si stima che il fumo passivo provochi 603.000 morti (28% bambini, 26% uomini e 47% donne) e la perdita di 10.9 milioni (61% bambini, 16% uomini e 24% donne) di anni di vita persi in buona salute (DALYs). Il maggior numero di morti attribuite al fumo passivo è causato dagli infarti, dalle infezioni respiratorie minori tra i bambini e l'asma tra gli adulti.

Secondo i dati dell'Eurobarometro 2009 (Figura 1), fuma il 29% degli europei e anche se il numero dei fumatori nella Unione Europea è in calo (erano il 32% nel 2006), queste persone mettono a repentaglio la loro vita e quella di quanti sono esposti al fumo passivo, tanto che, ogni anno, 19.000 europei non fumatori muoiono per effetto dell'esposizione al fumo passivo, a casa o sul luogo di lavoro (Ministero della Salute, 2012).



## 1.2 Epidemiologia del fumo di tabacco in Italia

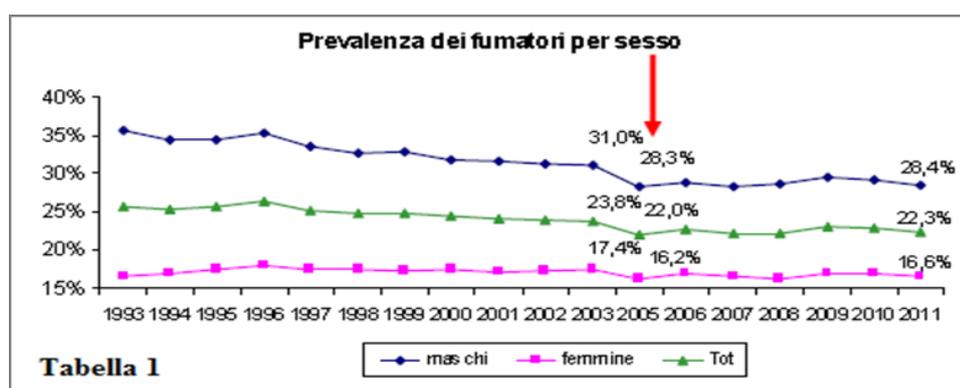
Si stima che in Italia siano attribuibili al fumo di tabacco dalle 70.000 alle 83.000 morti l'anno. Oltre il 25% di questi decessi è compreso tra i 35 ed i 65 anni di età.

La mortalità e l'incidenza per carcinoma polmonare sono in calo tra gli uomini, ma in aumento nelle donne, tra le quali questa patologia ha superato abbondantemente quella del tumore allo

stomaco, divenendo la terza causa di morte per patologie tumorali, dopo mammella e colon-retto.

Anche se negli ultimi 50 anni, il numero di fumatori in Italia, come in tutto il mondo occidentale, è gradualmente diminuito, nel nostro Paese il fumo attivo rimane la principale causa di morbosità e mortalità prevenibile.

Se diamo uno sguardo ai numeri, secondo i dati ISTAT, troviamo che su 52 milioni di abitanti con età superiore ai 14 anni i fumatori sono circa 11.6 milioni (22,3%) di cui 7.1 milioni di uomini (28,4%) e 4.5 milioni di donne (16,6%), (Tabella 1).



Nel 2003, prima della legge 3/2003, la prevalenza dei fumatori era del 23,8% (31% gli uomini e 17,4% le donne) con un calo complessivo del 6,3% (-8,4% gli uomini e -4,6% le donne); è da 10 anni, quindi, che il numero di fumatori in Italia oscilla intorno a valori compresi tra il 22% e il 23%, senza che si riesca ad ottenere una riduzione più significativa. I valori più alti per gli uomini si hanno tra i giovani adulti di età compresa tra i 25 e i 34 anni, con una percentuale del 38,9%, mentre per le donne la classe con una prevalenza più alta è quella tra i 45 e i 54 anni con una percentuale del 23,3%; stabile invece, la prevalenza tra i giovani di età compresa tra i 15 e i 24 anni con un valore di 21,4% (26,5% i maschi e 15,9% le donne).

Dal punto di vista territoriale, la più alta percentuale di fumatori si osserva nell'Italia centrale (24,7%) costante nel tempo, seguono il sud e le isole (21,9%), e il nord (21,5%) che invece sono in calo rispetto agli anni precedenti.

Riguardo i giovanissimi infine, dall'indagine Global Youth Tabacco Survey che nell'anno scolastico 2009/2010 ha coinvolto

1.800 ragazzi di 13, 14 e 15 anni, risulta che il 46% ha ammesso di aver fumato almeno una volta nella vita e il 92% di loro ha dichiarato che i rivenditori non si sono mai rifiutati di vendergli le sigarette nonostante l'età (Ministero della Salute, 2012).

### **1.3 Fumo ed infertilità maschile**

La tredicesima edizione dei quaderni della salute del Ministero della Salute Italiano riporta tra i fattori di rischio per la fertilità maschile anche il fumo di sigaretta (Quaderni del Ministero della Salute, n. 13, 2012).

È quindi ormai ampiamente accettato che il fumo svolge un effetto tossico sull'apparato riproduttivo maschile e ciò è stato dimostrato studiandone gli effetti sul sistema endocrino (Kapoor e Jones, 2005; Tweed et al., 2012), dove il fumo sembrerebbe alterare la produzione di alcuni ormoni in grado di influenzare la spermatogenesi, e sul liquido seminale dove invece sembrerebbe alterare alcuni parametri convenzionali e non convenzionali. La letteratura scientifica riporta numerosi studi che dimostrano una

significativa correlazione tra peggioramento dei parametri seminali e fumo di sigaretta, ma in quasi nessuno di essi è indicato il meccanismo d'azione con cui il fumo espliciti la propria tossicità.

È noto che dalla combustione del tabacco vengono generate più di 4700 sostanze, suddivise in una frazione gassosa (NO, NH<sub>3</sub>, idrocarburi, ecc.) ed una particellare (nicotina, ecc.), quindi i possibili meccanismi di azione sono diversi. Kunzle e colleghi, studiando uomini infertili suddivisi in fumatori e non fumatori, hanno riportato una riduzione della concentrazione, delle forme tipiche e della vitalità degli spermatozoi nei fumatori rispetto ai non fumatori e, nel 2010, Collodel e colleghi hanno confermato questi dati. Anche la motilità nemaspermica sembrerebbe subire l'effetto del fumo (Caserta et al., 2013) ed il numero di leucociti in alcuni studi risulterebbe aumentare (Zhang et al., 2013) determinando un probabile aumento dei radicali liberi dell'ossigeno, noti per essere responsabili di danni sulla membrana e sul DNA degli spermatozoi (Sepaniak et al., 2006; Ghaffari and Rostami, 2012). Alcune delle sostanze liberate durante la combustione del tabacco riescono

inoltre a raggiungere e a concentrarsi nel plasma seminale potendo così agire direttamente sul liquido seminale come dimostrato da Arabi e Moshtaghi (2005). Questi ricercatori esponendo spermatozoi di soggetti non fumatori al plasma seminale di soggetti fumatori hanno constatato un aumento della malondialdeide, marcatore di ossidazione della membrana, una riduzione della motilità e della reazione acrosomiale degli spermatozoi. I dati finora riportati provengono da studi *in vivo* e solo in pochi casi risultano discordanti, per via dei differenti criteri di inclusione dei pazienti, come per esempio la mancata quantificazione delle sigarette fumate o l'inadeguatezza del campione studiato.

Un prezioso contributo, per verificare gli effetti *in vitro* del fumo di sigaretta sugli spermatozoi, è stato fornito nel 2009 dal nostro gruppo di ricerca; i ricercatori hanno evidenziato una riduzione della motilità e del potenziale di membrana mitocondriale, un effetto negativo sulla condensazione della cromatina ed un aumento delle percentuali di spermatozoi in apoptosi (morte cellulare programmata) in uomini con normali

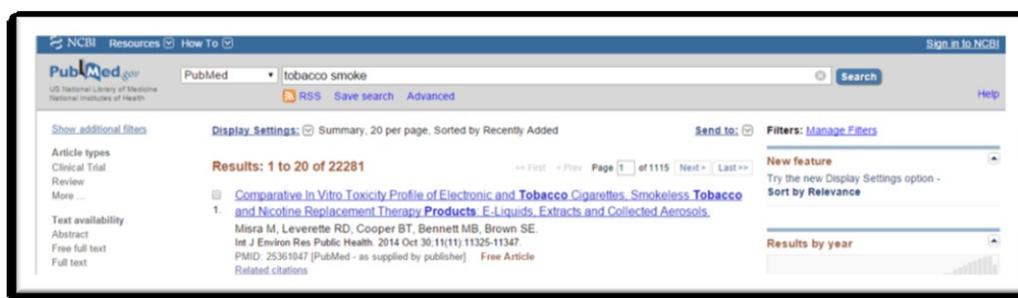
parametri del liquido seminale (normozoospermici) dopo esposizione all'estratto di fumo di sigaretta. Si può affermare quindi che sia *in vivo* che *in vitro* il fumo di sigaretta danneggia gli spermatozoi e che le componenti del fumo possono accumularsi nel plasma seminale. La sfida dei ricercatori è quella individuare, tra le 4700 sostanze che si producono, quelle che sono più tossiche per la fertilità maschile.

Tra queste sostanze il mondo scientifico sta ponendo la maggior attenzione sugli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e sulla nicotina; i primi sono i più importanti rappresentanti della fase gassosa del fumo, mentre la nicotina è la principale rappresentante della fase particellare. Quest'ultima è stata ritrovata in concentrazioni significative nel plasma seminale di uomini fumatori ed in soggetti esposti passivamente al fumo (Vine et al., 1993; Pacifici et al., 1993b; Pacifici et al., 1995). Il fatto che la nicotina sia stata ritrovata nel plasma seminale fa ipotizzare che possa avere un ruolo determinante nella tossicità sul liquido seminale.

## 1.4 Sostanze prodotte e liberate durante il fumo di tabacco

Negli ultimi decenni c'è stato un notevole interesse verso lo studio del tabacco, delle sigarette e più recentemente delle sigarette elettroniche. La letteratura scientifica è ricca di studi finalizzati ad individuare le sostanze, prodotte e liberate durante il fumo di sigaretta, e a studiarne i possibili effetti nocivi sull'uomo.

Inserendo su PubMed "*tobacco smoke*" si trovano difatti più di 20.000 voci bibliografiche.



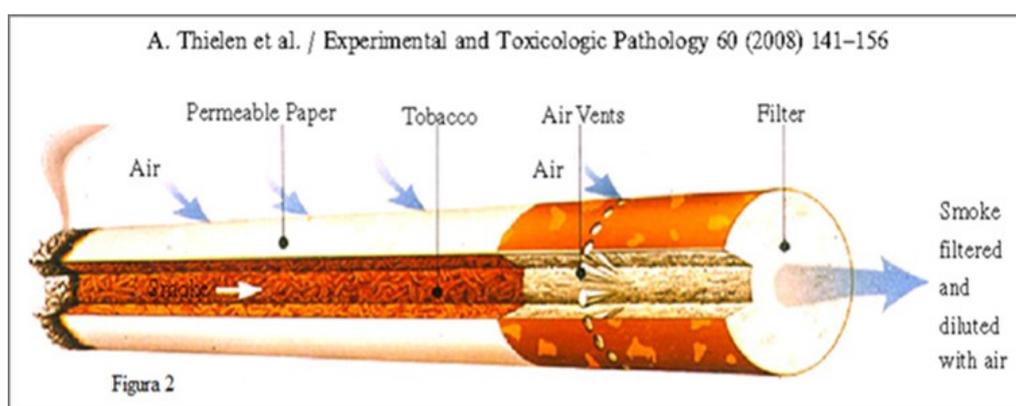
La tossicità del fumo di sigaretta può essere studiata mediante diversi approcci, che comprendono: lo studio della composizione chimica, gli studi *in vitro*, gli studi *in vivo* su cavie, studi clinici ed epidemiologici sull'uomo.

Interessante è l'articolo scientifico pubblicato da Thielen Anja e colleghi nel 2008. In questo lavoro gli autori riportano in

breve le componenti di cui è formata la sigaretta, come avviene la combustione del tabacco durante il fumo, e quali sostanze vengono liberate nell'aria e quelle invece introdotte nel corpo della persona che fuma.

La sigaretta, che noi tutti conosciamo, rappresenta oggi il modo più commerciale di vendere il tabacco; è formata (Figura 2):

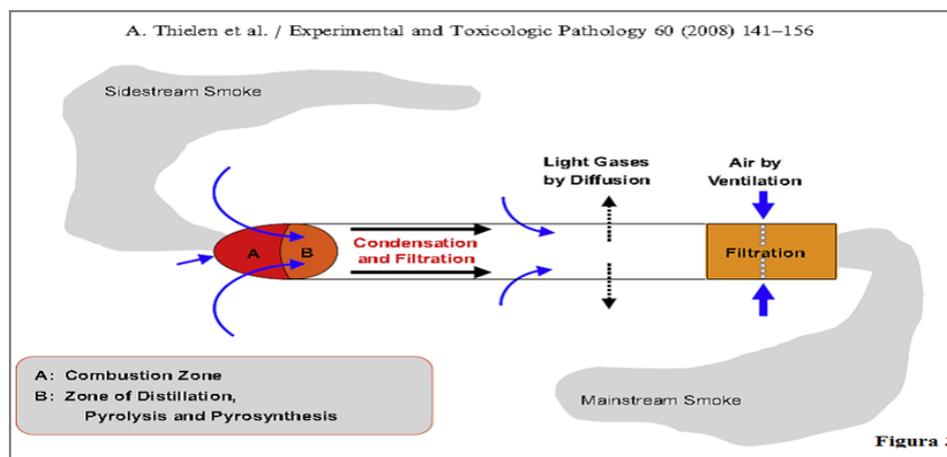
- da una miscela di tabacco costituita soprattutto dal tabacco Virginia, Burley e Oriental;
- da carta permeabile;
- da un filtro (non presente in tutte le sigarette).



Lo sviluppo tecnologico nella produzione delle sigarette comprende: la ricerca della migliore miscela di tabacco, migliorare la filtrazione, migliorare la lavorazione del tabacco, l'aggiunta di additivi e regolare la porosità della carta. Quando si fuma una sigaretta la combustione contempla due eventi, durante la fase in cui si ispira il flusso d'aria centrale della sigaretta viene inalato mentre il flusso laterale d'aria viene rilasciato nell'ambiente circostante. Di solito le sostanze inalate si trovano pure nel flusso laterale anche se in minor quantità (Tabella 2).

<b>Tabella 2. Differenze tra il flusso d'aria centrale e laterale del fumo</b>		
Caratteristiche	Flusso centrale	Flusso laterale
Temperatura nel punto d'origine	850-950 °C	500-650 °C
Dimensione media delle particelle	0.35-0.4 µm	0.15-0.25 µm
Concentrazione di particelle	$10^9-10^{10} \text{ cm}^{-3}$	$\sim 10^5 \text{ cm}^{-3}$
Percentuale di tabacco bruciato	30-40%	50-60 %
Nicotina	>99% nella fase particellare	>95% nella fase gassosa

Molti tipi di reazioni chimiche si verificano mentre brucia una sigaretta. Ci sono due principali regioni dentro la sigaretta che

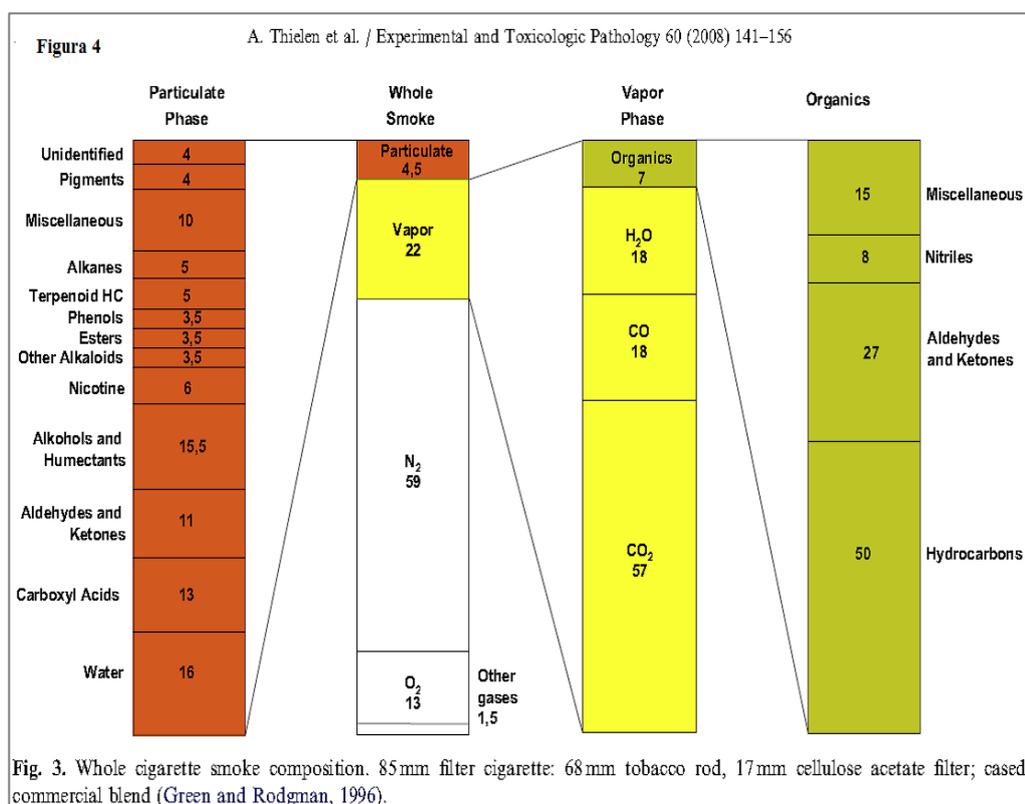


bruciano (Figura 3): una zona in cui avviene la combustione (A) ed una zona in cui avvengono le reazioni di pirolisi, distillazione e pirosintesi (B).

Nella zona interna di combustione, l'ossigeno reagisce con il tabacco che brucia formando anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ), monossido di carbonio (CO) e idrogeno (H). La temperatura all'interno della sigaretta durante l'ispirazione raggiunge valori superiori a  $950^\circ\text{C}$  mentre a valle della zona di combustione, nella zona di pirolisi, distillazione e pirosintesi la temperatura si abbassa; è proprio in questa zona che si generano la maggior parte delle sostanze chimiche, che sono più di 4700. Durante queste reazioni le

sostanze, in base alle proprie caratteristiche chimiche, si distribuiscono o nella fase particellare o nella fase gassosa del fumo. Generalmente una porzione della fase particellare è trattenuta dal filtro della sigaretta, mentre la porzione gassosa attraversa con facilità il filtro.

Thielen e colleghi nel loro articolo riportano una figura che riassume tutte le componenti del fumo di sigaretta che si formano (Figura 4).



In realtà se si considerano pure le sostanze presenti in tracce l'elenco delle sostanze prodotte aumenterebbe di gran lunga. È ovvio che studiare la tossicità delle singole sostanze non sarebbe di certo facile, pertanto come già detto l'attenzione degli studi di ricerca è andata ai principali rappresentanti della fase gassosa e particellare che corrispondono rispettivamente agli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) ed alla nicotina.

Gli IPA sono prodotti dalla combustione e sono sostanze tumorigeniche (Sciacca and Olivieri Conti, 2009). Tra questi dal punto di vista tossicologico viene studiato e ricercato soprattutto il benzopirene, che manifesta una notevole tossicità. I benzopireni sono idrocarburi (con base  $C_{20}H_{12}$ ) della serie aromatica, policiclici a cinque anelli benzenici condensati. Tuttavia numerosi studi hanno messo in evidenza che le molecole di IPA di per sé non sono agenti cancerogeni per l'uomo, ma è richiesta la loro attivazione metabolica affinché possano esercitare i loro effetti mutagenici/carcinogenici (Harvey, 1991).

La nicotina, i cui effetti costituiscono l'oggetto di questo studio, si ottiene durante il fumo di una sigaretta mediante distillazione del tabacco ed è considerata la sostanza più importante poiché è farmacologicamente attiva interagendo con i recettori dell'acetilcolina.

Questi recettori sono canali ionici-dipendenti e sono ampiamente presenti nel cervello ma anche in tessuti non neuronali (Gahring and Rogers, 2005).

### **1.5 Proprietà chimiche, assorbimento, metabolismo ed escrezione della nicotina**

Una review riportante tutte le caratteristiche della nicotina pubblicata nel 2004 da Yildiz Deniz, riporta tutte le informazioni che possono interessare per capire come la nicotina, dal momento in cui si fuma una sigaretta possa raggiungere ed accumularsi nel plasma seminale.

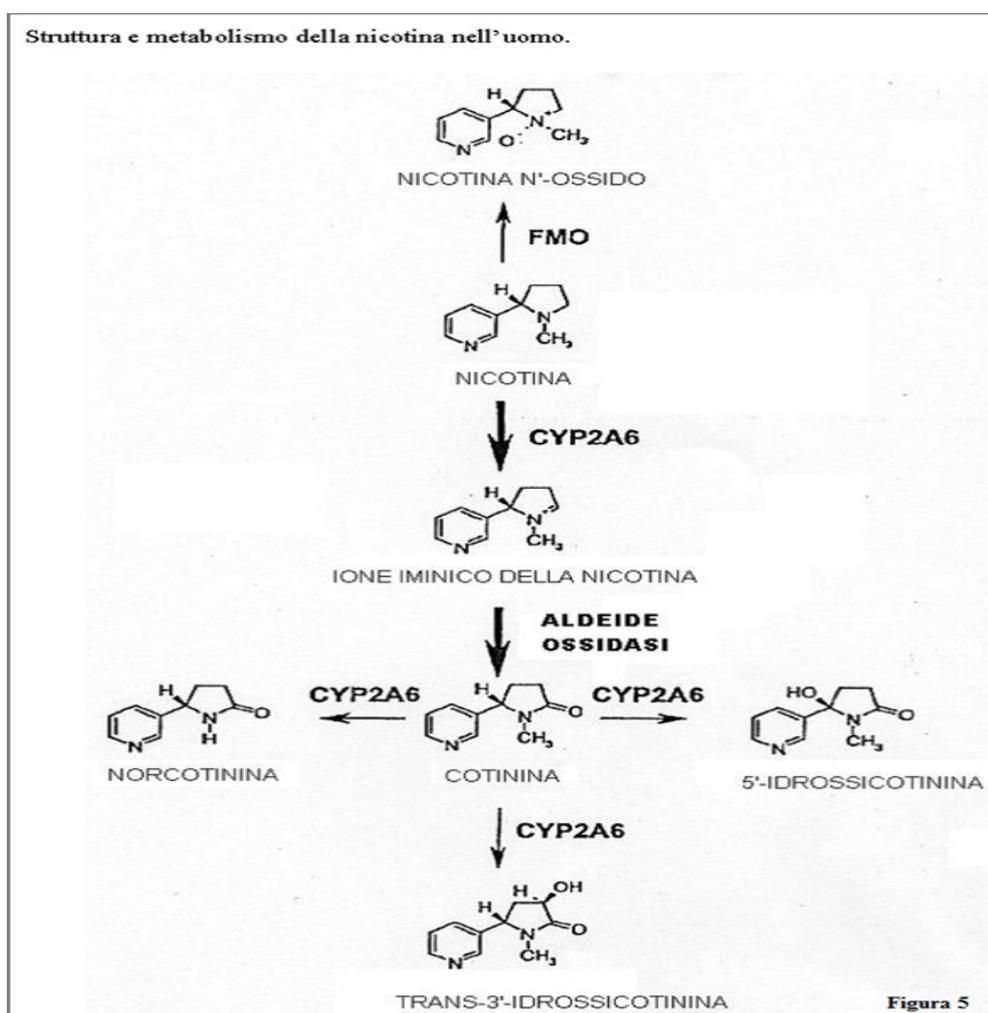
La nicotina è un alcaloide, si comporta come una base debole, ed è composta da un anello piridinico e un anello

pirridolinico. Esistono due stereoisomeri della nicotina: la (S)-nicotina e la (R)-nicotina. La nicotina pura è liquida ed ha un colore chiaro, con un odore caratteristico. In ambiente alcalino è presente in una forma non ionizzata (lipofila), pertanto è meglio assorbibile rispetto all'ambiente acido, dove si trova in una forma ionizzata (idrofila). In condizioni fisiologiche (pH 7,3-7,5), la nicotina non è ionizzata per circa il 31% e dunque il suo passaggio attraverso le membrane biologiche è agevolato. Nei fumatori e in coloro che sono esposti passivamente al fumo la nicotina può essere assorbita attraverso la mucosa orale, anche se nei fumatori la principale via di assorbimento sono gli alveoli polmonari. L'assorbimento attraverso gli alveoli è dipendente dalla quantità di nicotina che si forma durante la fase di distillazione del tabacco. In questi soggetti le concentrazioni di nicotina nel sangue raggiungono 30-40 ng/ml, a differenza di coloro che non inalano il fumo dove invece la nicotina è presente in concentrazioni inferiori, circa 2.5-8.0 ng/ml. La nicotina inoltre può essere assorbita in concentrazioni meno significative dalla pelle, dalla vescica urinaria e a livello

gastrointestinale, dove il pH acido rende per i motivi prima riportati difficile l'assorbimento.

Nell'uomo, la nicotina è metabolizzata attraverso complessi passaggi (Figura 5) dal fegato e in minore quantità dal polmone e dal cervello. Circa il 70-80% della dose viene C-ossidata dal citocromo P-450 a ione 1'(5')-iminico della nicotina che è ulteriormente metabolizzato a cotinina da una aldeide ossidasi citosolica. La nicotina è anche N-ossidata (4%) da una flavina monoossigenasi a nicotina N'ossido. È stata ritrovata una notevole variabilità interindividuale, legata a polimorfismi genici, nella velocità di metabolizzazione della nicotina a cotinina. La cotinina è successivamente convertita a diversi prodotti idrossilati come la trans-3'-idrossicotinina, che è il maggiore metabolita della nicotina trovato nelle urine, la 5'-idrossicotinina e la norcotinina. In successive fasi del metabolismo la nicotina, la cotinina e la trans-3' idrossicotinina vengono glucuronidate. Sia la nicotina che la cotinina sono metabolizzate dal citocromo CYP2A6, che ha un'affinità diversa per i due substrati; ha un'alta affinità per la

nicotina mentre ha una affinità inferiore per la cotinina. Studi effettuati *in vitro* con microsomi di fegato umano e P450 ricombinante hanno confermato che il CYP2A6 è il più importante P450 per la C-ossidazione della nicotina.



Tuttavia, anche il CYP2B6 può catalizzare la C-ossidazione della nicotina, ma con una affinità minore. Infine l'eliminazione della

nicotina avviene attraverso le feci, la saliva, i succhi gastrici, il sudore e le urine. A livello renale, come per l'assorbimento, l'escrezione è influenzata dal pH delle urine. Come risultato si può avere quindi un aumento della *clearance* renale della nicotina quando le urine tendono ad essere acide.

### **1.6 Scopo della studio**

Stabilito che la nicotina è una delle principali sostanze prodotte durante il fumo di tabacco e considerato il suo ritrovamento nel liquido seminale di soggetti fumatori ed in soggetti esposti passivamente al fumo, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti di dosi crescenti di nicotina sulla motilità nemaspermica e sui parametri non convenzionali del liquido seminale.

# MATERIALI E METODI

## 2.1 Selezione della casistica

Lo studio *in vitro* è stato condotto sugli spermatozoi ottenuti da dieci soggetti sani, non fumatori e con normali parametri del liquido seminale (normozoospermici; WHO, 2010). Di ciascun uomo è stata fatta un'approfondita anamnesi e tutti sono stati sottoposti ad una attenta valutazione andrologica con esami strumentali e di laboratorio. Uomini con infiammazioni delle ghiandole sessuali accessorie (La Vignera et al., 2011), con malattie sistemiche (La Vignera et al., 2012), con microorchidismo (volume testicolare <12 ml, Sakamoto et al., 2008), che facessero uso e/o abuso di alcol e/o droga (La Vignera, 2013), che avessero fatto di recente un trattamento ormonale e con pregressa storia di criptorchidismo (La Vignera et al., 2009) o varicocele (La Vignera et al., 2012) sono stati esclusi dalla casistica.

## **2.2 Analisi e preparazione del liquido seminale: disegno sperimentale dello studio *in vitro***

I soggetti normozoospermici arruolati hanno raccolto il liquido seminale tramite ipsoazione, dopo 3-5 giorni di astinenza sessuale. Dopo la liquefazione, è stato analizzato un volume di campione di 10  $\mu$ l, utilizzando vetrini e coprioggetto (22x22 mm) preriscaldati per ridurre eventuali traumatismi agli spermatozoi. I parametri convenzionali del liquido seminale sono stati così valutati come previsto dal manuale di laboratorio WHO per l'esame del liquido seminale 2010, facendo molta attenzione alla motilità. Dopo aver preparato il vetrino sono state pertanto valutate le tre classi di motilità:

- Motilità progressiva (PR): lo spermatozoo si muove attivamente, in modo lineare o in un ampio circolo, indipendentemente dalla velocità;
- Motilità non progressiva (NP): comprende tutti gli altri tipi di motilità in cui non c'è progressione nello spazio, per esempio movimenti che descrivono piccoli circoli oppure quando

l'onda flagellare riesce a spostare appena la testa o ancora quando si osserva soltanto il movimento flagellare;

- Immobilità (IM): nessun movimento.

Dopo aver completato lo spermioγραμμα, i migliori spermatozoi mobili sono stati selezionati mediante tecnica di swim-up. Questa tecnica di selezione prevede il lavaggio di un'aliquota del campione con terreno di Biggers-Whitten-Whittingham (BWW), segue poi una centrifugazione (300-500 g per 10 minuti), l'eliminazione del surnatante ed aggiunta, al pellet che si è formato, di un volume di BWW pari a quello del campione trattato. Quest'ultima fase deve essere fatta con molta attenzione per non rompere il pellet. Il campione così preparato (contenuto in tubi da 15 ml) viene messo ad incubare a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub>, per 45-60 minuti. La scelta dello swim-up come metodo di selezione è dettata dal fatto che questa è esattamente la tecnica consigliata nei campioni normozoospermici (WHO, 2010). Alla fine del periodo di incubazione è stato prelevato il surnatante (dove sono migrati gli

spermatozoi con la migliore motilità) che è stato suddiviso in 4 aliquote, ciascuna contenente un numero di  $5 \times 10^6$  di spermatozoi. A ciascun aliquota è stata aggiunta la nicotina alle seguenti concentrazioni: 0 (controllo), 1, 10 e 100 ng/ml, dopodiché sono state incubate per 3 e 24 ore a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. I valori di pH, misurati per ogni esperimento, non sono risultati significativamente diversi.

Al termine del periodo di incubazione è stata valutata la motilità, mentre mediante citofluorimetria a flusso sono stati valutati i seguenti parametri non convenzionali degli spermatozoi:

- Potenziale di membrana mitocondriale (MMP): valutato mediante colorazione con il colorante cationico JC-1;
- Esternalizzazione della fosfatidilserina (PS) sulla membrana esterna della cellula spermatica: usando colorazione con annessina V e ioduro di propidio (PI);
- Grado di compattazione della cromatina spermatica: valutata con colorazione con PI;

- Grado di frammentazione del DNA nemaspermico: mediante saggio TUNEL.

### **2.3 Analisi citofluorimetrica**

L'analisi citofluorimetrica è stata condotta utilizzando il citofluorimetro EPICS XL (Coulter Electronics, IL, Milano) dotato di raggio laser ad argon a 488 nm. Per la lettura sono stati utilizzati, in base alla metodica da applicare, i rivelatori FL1 per la fluorescenza verde (525 nm), FL2 per quella arancione (575 nm) ed FL3 per quella rossa (620 nm); per ciascun campione, sono stati misurati 100.000 eventi ad una velocità di flusso bassa ed analizzati mediante il software Sistem II™, Versione 3.0.

### **2.4 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale**

La principale funzione dei mitocondri è la sintesi di ATP tramite la fosforilazione ossidativa e la loro funzionalità è associata negli spermatozoi umani ad una buona motilità (Paoli et al., 2011). La funzione mitocondriale è comunemente valutata misurandone il

gradiente elettrico transmembrana mediante sonde cationiche fluorescenti che si accumulano nei mitocondri. Tra le sonde a diposizione in commercio la più affidabile e specifica è la 5.5',6.6'-tetrachloro-1.1',3.3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanineiodide (JC-1) (Amaral & Ramalho-Santos, 2010).

La caduta del potenziale di membrana mitocondriale è uno degli eventi precoci della cascata apoptotica ed è reversibile. Questo fenomeno causa un aumento della permeabilità della membrana con conseguente rilascio di diverse molecole, ad esempio il citocromo c, che svolgono un ruolo fondamentale nell'innesco e nel mantenimento del processo apoptotico stesso. Fisiologicamente, il potenziale di membrana mitocondriale è garantito dalla catena respiratoria mitocondriale, che produce energia gestita come gradiente elettrochimico. Le cellule vitali hanno un elevato potenziale di membrana mitocondriale (MMP), mentre le cellule apoptotiche presentano una caduta di tale potenziale.

La riduzione dell'MMP può essere dunque rilevata mediante l'utilizzo del colorante lipofilico JC-1. Questa molecola è capace di

entrare selettivamente nei mitocondri ed esiste in forma monomerica, emettente a 527 nm; in seguito ad eccitazione a 490 nm e in relazione al potenziale di membrana, JC-1 è capace di formare aggregati caratterizzati da un ampio spostamento nell'emissione (590 nm). Dunque, il colore cambia in modo reversibile dal verde al verdastro-arancione appena la membrana mitocondriale diventa più polarizzata. Nelle cellule vitali con elevato potenziale di membrana, JC-1 si localizza a livello della membrana mitocondriale sotto forma di aggregati che conferiscono una fluorescenza arancione, mentre nelle cellule dove si è verificata una riduzione del potenziale di membrana il colorante rimane a livello citoplasmatico in forma monomerica, conferendo una fluorescenza verde diffusa. Nell'ambito del nostro studio, aliquote contenenti  $1 \times 10^6$ /ml di spermatozoi sono state incubate con JC-1 al buio, per 10 minuti, alla temperatura di 37° C. Al termine del periodo di incubazione, le cellule sono state lavate in PBS e analizzate.

## **2.5 Esternalizzazione della fosfatidilserina**

La PS è un fosfolipide di membrana a carica negativa. Nelle cellule vive si trova nel compartimento interno della membrana plasmatica mentre nelle cellule che hanno avviato un processo di apoptosi passa al compartimento esterno. Alla PS si lega con una notevole affinità l'annessina V che per tale caratteristica rappresenta un ottimo marcatore in grado di rilevare le fasi precoci dell'apoptosi. Lo PI è invece un intercalante del DNA che nelle cellule vitali non è in grado di attraversare la membrana plasmatica mentre nelle cellule che presentano una membrana danneggiata si accumula all'interno. Le due sonde utilizzate assieme sono in grado di dare informazioni sulla vitalità, sull'apoptosi precoce e tardiva degli spermatozoi (Kim et al., 2013).

Nel nostro studio l'esternalizzazione della PS è stata valutata utilizzando l'annessina V, proteina anticoagulante che si lega selettivamente alla PS in presenza di ioni calcio. La marcatura con isotiocianato di fluoresceina (FITC) ha permesso di utilizzare l'annessina V come marker per l'identificazione citofluorimetrica

della PS. Durante l'apoptosi le cellule espongono la PS ancor prima della perdita della semipermeabilità. Di conseguenza, marcandole simultaneamente le stesse cellule con annessina V e PI è possibile distinguere contemporaneamente le cellule vive (con membrana citoplasmatica integra) da quelle in apoptosi o in necrosi. La colorazione con annessina V e PI è stata ottenuta utilizzando un kit disponibile in commercio (Annessina V-FITC Apoptosis, Sigma Chemical). Un'aliquota contenente  $0.5 \times 10^6$ /ml è stata sospesa in 0.5 ml di buffer, contenente 10  $\mu$ l di annessina V-FITC e 20  $\mu$ l di PI, incubata per 10 minuti al buio. Dopo l'incubazione, il campione è stato analizzato immediatamente, mediante i rivelatori FL-1 (FITC) e FL3 (PI). I differenti pattern di colorazione hanno permesso di identificare le differenti popolazioni cellulari, dove FITC negativo e PI negativo indicano le cellule vitali, FITC positivo e PI negativo indicano le cellule in apoptosi precoce con membrana citoplasmatica ancora integra e FITC positivo e PI positivo indicano le cellule in fase tardiva di apoptosi o necrotiche.

## **2.6 Valutazione del grado di compattazione della cromatina**

La compattazione della cromatina è importante per la stabilità del materiale genetico. La si può valutare utilizzando PI che, dopo permeabilizzazione della membrana, riesce a penetrare dentro lo spermatozoo e tanto più la cromatina è compatta tanto meno esso potrà legarsi ad essa. Nel nostro studio la colorazione con PI è stata eseguita dopo permeabilizzazione della membrana cellulare, in modo da permettere l'accesso del fluorocromo nel nucleo. Circa  $1 \times 10^6$  di spermatozoi sono stati incubati con LPR DNA-Prep Reagent contenente 0.1% cianato di potassio, 0.1% NaN, detergenti non ionici, sali e stabilizzanti (Beckman Coulter, IL, Milano, Italia), al buio, a temperatura ambiente per 10 minuti e poi ulteriormente incubati con Stein DNA-Prep Reagent contenente 50 µg/ml di PI (<0.5%), RNAsi A (4 Kunits/ml), <0.1% NaN<sub>3</sub> (Beckman Coulter, IL) al buio e a temperatura ambiente. L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita dopo 30 minuti, mediante il solo rilevatore FL3.

## **2.7 Studio della frammentazione del DNA**

La scarsa frammentazione del DNA degli spermatozoi è fondamentale per la performance riproduttiva (Wang et al., 2012). Tra le metodiche per valutarla vi è il saggio TUNEL. Questa tecnica è basata sull'aggiunta a livello dei filamenti interrotti di DNA, ad opera di un'attività terminil-transferasica (TdT), di un nucleotide marcato (dUTP). Tale enzima viene omesso nel controllo negativo, che ci permette di rilevare l'esatta percentuale di cellule con DNA frammentato. Due metodi possono essere adottati sulla base del controllo negativo 1) Threshold-setting: fissando una soglia sul controllo negativo; 2) Subtraction-blank: sottraendo l'istogramma del controllo negativo da quello del campione in esame.

Nel nostro studio la TUNEL è stata eseguita mediante l'utilizzo di un kit disponibile in commercio (Apoptosis Mebstain kit, Beckman Coulter, Milano). Allo scopo di ottenere un controllo negativo la TdT è stata omessa dalla miscela di reazione; il controllo positivo è stato ottenuto pretrattando gli spermatozoi (circa  $0.5 \times 10^6$ ) con  $1 \mu\text{g/ml}$  di deossiribonucleasi I, non contenente

RNAse, a 37°C per 60 min prima della colorazione. La lettura al citofluorimetro è stata eseguita utilizzando il rivelatore FL1.

## **2.8 Analisi statistica**

I risultati sono riportati come  $media \pm SEM$ . I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di comparazione multipla di Duncan o t di Student. Il software SPSS 9.0 per Windows è stato usato per la valutazione statistica (SPSS Inc., Chicago IL, USA). Una differenza statisticamente significativa è stata accettata quando il valore di p è risultato più basso di 0.05.

# RISULTATI

I valori dei parametri convenzionali del liquido seminale dei 10 uomini sani normozoospermici, prima dell'incubazione con la nicotina, sono riportati nella Tabella 3.

<b>Tabella 3.</b> Parametri convenzionali del liquido seminale dei soggetti sani arruolati per questo studio	
Volume (ml)	3.5±1
Concentrazione (mil/ml)	91.2±63.6
Numero totale di spermatozoi (mil/eiaculato)	305.3±149.2
Motilità progressiva (%)	45.5±13.7
Forme normali (%)	10.1±3.7
Leucociti (mil/ml)	0.52±0.37

Gli effetti di concentrazioni crescenti di nicotina sulla motilità progressiva degli spermatozoi, dopo 3 e 24 ore di incubazione, sono espressi nella Figura 6.

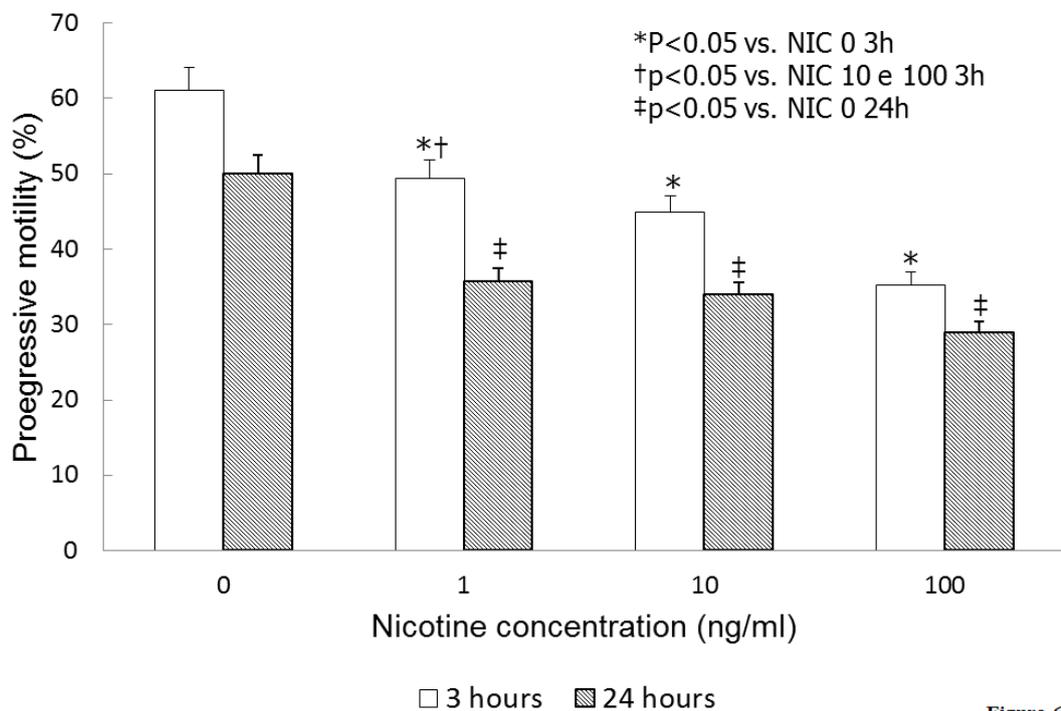


Figura 6

I dati ottenuti dimostrano che la nicotina riduce la motilità progressiva in modo concentrazione-dipendente.

Dopo 3 ore di incubazione, la nicotina inibisce in modo significativo la motilità già alla concentrazione di 1 ng/ml ( $p < 0,05$ , ANOVA a 1-via seguita dal test di Duncan), raggiungendo il massimo effetto alla concentrazione di 100 ng/ml ( $p < 0,05$ , ANOVA a 1-via seguita dal test di Duncan). Dopo 24 ore di incubazione, l'effetto sulla motilità è stato significativo invece a partire da 10 ng/ml di nicotina ( $p < 0,05$ , ANOVA a 1-via seguita dal test di

Duncan). Il minor effetto della nicotina dopo 24 ore, rispetto agli effetti osservati dopo 3 ore, è dovuto al fatto che gli spermatozoi dopo 24 ore di incubazione sono meno mobili ( $p < 0,01$  vs 3 h, t-test di Student).

La nicotina non ha avuto alcun effetto significativo sul MMP degli spermatozoi sia dopo 3 ore che dopo 24 ore di incubazione (dati non mostrati).

Un effetto statisticamente significativo sulla vitalità degli spermatozoi è stato osservato, dopo 3 e 24 ore di incubazione (Figura 7, pannello A), solo alla concentrazione di 100 ng/ml ( $p < 0,05$ , ANOVA a 1-via seguita dal test di Duncan).

Gli effetti della nicotina sull'esternalizzazione della PS sono stati minori (Figura 7, pannello B) e significativi solo alla concentrazione di 100 ng/ml dopo 3 ore, ma non dopo 24 ore di incubazione ( $p < 0,05$ , ANOVA a 1-via seguita dal test di Duncan).

L'esposizione alla nicotina ha determinato un notevole aumento di spermatozoi in apoptosi tardiva (cellule positive alla annessina V e

alla colorazione con PI) alla concentrazione di 100 ng/ml sia dopo 3  
che dopo 24 ore di incubazione (Figura 7, pannello C).

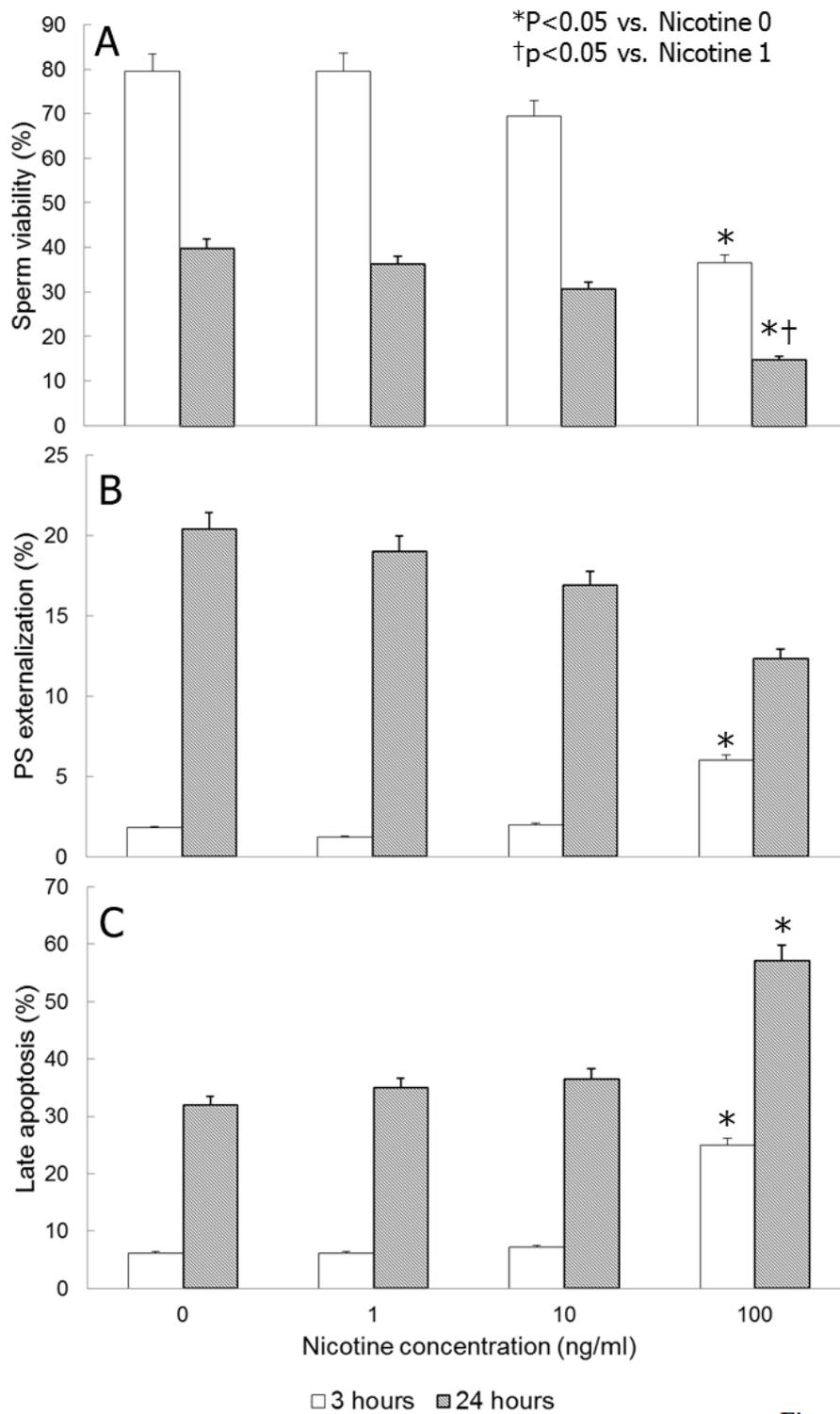
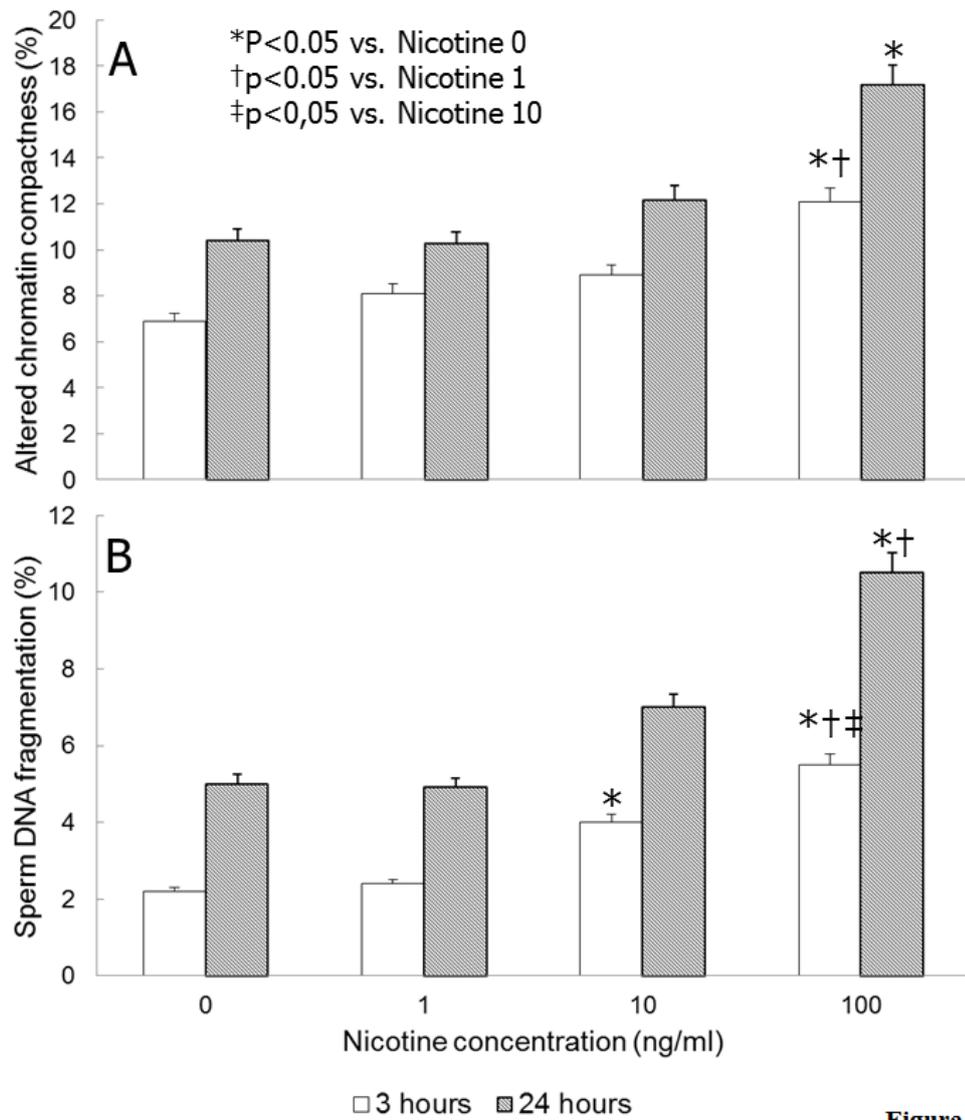


Figure 7

La percentuale di spermatozoi con alterazioni della cromatina è aumentata significativamente alla concentrazione di 100 ng/ml (Figura 8, pannello A) sia dopo 3 che dopo 24 ore di incubazione ( $p < 0,05$ , ANOVA a 1-via seguita dal test di Duncan).

Infine la nicotina ha aumentato notevolmente in modo concentrazione-dipendente la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato dopo 3 e 24 ore di incubazione ( $p < 0,05$ , ANOVA a 1-via seguita dal test di Duncan) (Figura 8, pannello B).



**Figura 8**

## DISCUSSIONE

Gli spermatozoi, dopo l'incubazione *in vitro* con la nicotina, hanno ridotto in modo significativo la loro motilità progressiva. È interessante notare come questo alcaloide già alla più bassa concentrazione (1 ng/ml) abbia un effetto deleterio su questi importanti parametri della funzione nemaspermica. Questa minima quantità, a cui si osserva già un effetto, è circa un decimo di quella che si trova nel plasma seminale di uomini esposti al fumo passivo, dove la concentrazione media di nicotina è di  $10.7 \pm 8.5$  ng/ml (media  $\pm$  SEM). L'effetto sulla motilità è, tuttavia, inferiore a quello osservato in un nostro precedente studio in cui gli spermatozoi sono stati incubati con estratto di fumo di sigaretta (Calogero et al., 2009), suggerendo quindi che anche altre componenti del fumo riducono la motilità degli spermatozoi.

Questo dato è molto simile a quello riportato da Gandini e colleghi, i quali, utilizzando un approccio metodologico simile, hanno dimostrato che il fumo di sigaretta, ma non la nicotina o la cotinina, è in grado di peggiorare i parametri cinetici dei

nemaspermi. In particolare, nel loro studio, questi autori hanno riportato che la nicotina (70 ng/ml) o cotinina non modificano in modo significativo la motilità fino a dopo 24 ore di incubazione (Gandini et al., 1997). Tuttavia, si hanno peggioramenti significativi di tutte le variabili cinetiche quando si utilizzano concentrazioni di nicotina circa 500 volte superiori a quelle trovate nel plasma seminale dei fumatori (35.000 ng/ml). Dati simili a questi sono stati riportati anche da Reddy prima e da Oyeyipo dopo. Questi ricercatori hanno confermato gli effetti della nicotina sulla motilità, ma sempre a concentrazioni superiori rispetto a quelle da noi utilizzate (Reddy et al., 1995; Oyeyipo et al., 2014). I nostri risultati dimostrano e confermano dunque un effetto diretto della nicotina sugli spermatozoi, ma a differenza degli altri studi evidenziano un effetto già alle concentrazioni più basse.

Resta ancora da chiarire con quali meccanismi d'azione la nicotina esplica *in vitro* la propria tossicità, a differenza dei meccanismi d'azione *in vivo*, già in parte studiati sui ratti. Dopo somministrazione di nicotina si è visto che nei ratti trattati, rispetto

ai ratti-controllo non trattati, si verifica una riduzione della motilità degli spermatozoi associata spesso alla riduzione della capacità antiossidante e all'aumento della perossidazione lipidica a livello testicolare (Jana et al., 2010; Oyeyipo et al., 2011). Proprio questi fenomeni potrebbero essere i responsabili della riduzione della motilità.

Anche se il legame tra fumo di sigaretta e infertilità maschile è stato ampiamente dimostrato, non ci sono molti dati sugli effetti della nicotina sui parametri non convenzionali del liquido seminale. Per questo motivo, abbiamo studiato mediante citofluorimetria a flusso gli effetti della nicotina sulla funzione mitocondriale e sull'integrità della cromatina/DNA degli spermatozoi. Dal momento che è stata individuata una stretta correlazione tra la motilità ed il MMP (Paoli et al., 2011), abbiamo verificato se la nicotina avesse un effetto sulla funzione mitocondriale. I nostri dati non hanno individuato alcun effetto significativo su questo parametro, facendo pensare che la nicotina riduca la motilità degli spermatozoi attraverso altri meccanismi d'azione. La letteratura

scientifica riporta, difatti, altri studi con cui si è cercato di comprendere questi meccanismi. Piasecka e Kawiak, ad esempio, hanno dimostrato che alterazioni strutturali a carico dell'assonema possono essere i responsabili dell'acinesia degli spermatozoi (Piasecka and Kawiak, 2003), mentre successivamente Ford ha individuato nell'alterazione della glicolisi, che rappresenta un'altra importante fonte di energia nel flagello; quindi un altro possibile meccanismo in grado di ridurre la motilità dello spermatozoo (Ford, 2006). Kumosani e colleghi hanno scoperto inoltre che il fumo di sigaretta altera l'attività  $Ca^{++}$ -ATPasi con conseguenze deleterie sui parametri cinetici degli spermatozoi. In questo studio, questo effetto è stato associato all'aumento della concentrazione di cadmio ed alla riduzione di quella dello zinco nel liquido seminale (Kumosani et al., 2008). Una perdita di motilità può essere dovuta infine anche all'aumento del numero di spermatozoi non vitali che si verifica dopo l'incubazione con la nicotina. La doppia colorazione con annessina-V e PI usata nel nostro studio, ha infatti mostrato che la nicotina riduce il numero di spermatozoi vitali.

Tuttavia, questo effetto si è verificato quando è stata utilizzata la concentrazione di nicotina più elevata. Con dati concordanti, anche Arabi ha osservato che gli spermatozoi di uomini normozoospermici esposti alla nicotina subiscono una perdita di vitalità, valutata mediante colorazione vitale con eosina (Arabi, 2004), mentre Zavos e colleghi hanno osservato una riduzione della vitalità nemaspermica dopo che gli spermatozoi di uomini non fumatori sono stati esposti al plasma seminale di uomini fumatori (Zavos et al., 1998).

I nostri dati sull'esternalizzazione della PS e sull'apoptosi hanno evidenziato, rispetto agli effetti osservati sulla motilità, un minor effetto sul primo parametro ed un effetto maggiore sul secondo. Gli effetti significativi su questi parametri sono stati osservati comunque solo alla massima concentrazione di nicotina (100 ng/ml). Questi dati suggeriscono che la nicotina ad alte concentrazioni riduce il numero di spermatozoi vitali causando l'esternalizzazione della PS e danneggiandone la membrana. A conferma di ciò, uno studio ha dimostrato che in spermatozoi di

uomini fumatori si verifica un aumento dell'esternalizzazione della PS (valutata con colorazione annessina V positiva) ed un aumento significativo degli spermatozoi in apoptosi (Belcheva et al., 2004).

Dopo l'esposizione degli spermatozoi alla nicotina si è osservato anche un significativo aumento degli spermatozoi con cromatina anormale e con frammentazione del DNA. Dopo 3 h di incubazione, l'effetto su questi parametri è risultato concentrazione-dipendente e significativo a partire da 10 ng/ml. Questa concentrazione è simile a quella ritrovata nel plasma seminale di fumatori e gli effetti da noi riportati sono in accordo con quanto osservato da Arabi, ovvero la rottura del doppio filamento di DNA degli spermatozoi, valutata mediante Comet assay, dopo esposizione alla nicotina (effetti alla concentrazioni di: 0.75 mg~121.680 ng/ml). Poiché è stata osservata anche una correlazione significativa tra il tasso di lipoperossidazione e le percentuali di spermatozoi vitali o di cellule germinali con DNA frammentato, Arabi ha ipotizzato che la nicotina possa essere un agente pro-ossidante con effetti sulla membrana plasmatica degli spermatozoi e sul DNA (Arabi, 2004).

Inoltre, la nicotina sembra alterare il ciclo del metabolismo del glutatione (GSH), sembra peggiorare la morfologia, la motilità e sembra indurre la frammentazione del DNA degli spermatozoi. L'utilizzo di antiossidanti potrebbe pertanto compensare, almeno in parte, l'effetto negativo della nicotina sulla funzione nemaspermica (Arabi and Shareghi, 2005). Anche Belcheva e colleghi (2004) hanno trovato un aumento della frequenza delle rotture del DNA a singola e a doppia elica negli spermatozoi dei fumatori rispetto ai non fumatori, tuttavia, pur osservando una tendenza negativa, questa differenza non ha raggiunto la significatività statistica. Infine, in un recente studio condotto da Fariello e colleghi, questi ricercatori hanno riportato una riduzione dell'integrità del DNA e dell'attività mitocondriale degli spermatozoi, mentre nei maschi fumatori e con varicocele hanno osservato un aumento della perossidazione lipidica. Anche a livello genico, Fariello ha evidenziato gli effetti della nicotina, mostrando una differenza nell'espressione di 20 proteine tra i vari gruppi osservati: gruppo di

controllo, gruppo di non fumatori, gruppo di fumatori moderati e quello di forti fumatori (Fariello et al., 2012).

## CONCLUSIONE

In conclusione, questo studio ha dimostrato come la nicotina, che è uno dei principali componenti del fumo di sigaretta, altera *in vitro* in modo significativo la motilità, la vitalità, la compattazione della cromatina e la frammentazione del DNA degli spermatozoi. Questi effetti deleteri sono stati osservati a diverse concentrazioni, alcuni a concentrazioni molto basse (motilità e frammentazione del DNA), simili a quelle osservate nel plasma seminale di fumatori, e altri parametri (vitalità e apoptosi tardiva) a concentrazioni circa 10 volte superiori a quelli osservati nei fumatori. Pertanto, la nicotina può essere considerata un componente del fumo di sigaretta con effetti nocivi sui parametri convenzionali e non convenzionali del liquido seminale. L'interruzione del fumo di sigaretta deve quindi essere considerato un aspetto fondamentale della strategia

terapeutica per quegli uomini che vogliono intraprendere un percorso finalizzato all'ottenimento di un figlio.

## BIBLIOGRAFIA

- Amaral A, Ramalho-Santos J. Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *Int J Androl*. Vol. 33(1) pp. 180-6. 2010.
- Arabi M, Moshtaghi H. Influence of cigarette smoking on spermatozoa via seminal plasma. *Andrologia*. Vol. 37(4) pp. 119-24. 2005.
- Arabi M, Shareghi B. Anti-fertility effect of nicotine. *Zhonghua Nan Ke Xue*. Vol. 11(5) pp. 323-30. 2005.
- Arabi M. Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia*. Vol. 36(5) pp. 305-10. 2004.
- Belcheva A, Ivanova-Kicheva M, Tzvetkova P, Marinov M. Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. *Int J Androl*. Vol. 27(5) pp. 296-300. 2004.
- Calogero A, Polosa R, Perdichizzi A, Guarino F, La Vignera S, Scarfia A, Fratantonio E, Condorelli RA, Bonanno O, Barone

N, Burrello N, D'Agata R, Vicari E. Cigarette smoke extract immobilizes human spermatozoa and induces sperm apoptosis. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol. 19(4) pp. 564-71. 2009.

- Caserta D, Bordi G, Di Segni N, D'Ambrosio A, Mallozzi M, Moscarini M. The influence of cigarette smoking on population of infertile men and woman. *Arch Gynecol Obstet*. Vol. 287(4) pp. 813-8. 2013.
- Collodel G, Capitani S, Pammolli A, Giannerini V, Geminiani M, Moretti E. Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study. *Journal of Andrology*. Vol. 31(2) pp. 108-13. 2010.
- Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Gozzo FC, Pilau EJ, Fraietta R, Bertolla RP, Andreoni C, Cedenho AP. Effect of smoking on the functional aspects of sperm and seminal plasma protein profiles in patients with varicocele. *Hum Reprod*. Vol. 27(11) pp. 3140-9. 2012.

- Ford WCL. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum Reprod Update*. Vol. 12(3) pp. 269-74. 2006.
- Gahring LC, Rogers SW. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J*. vol. 7(4) pp. E885–94. 2005.
- Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Culasso F, Pacifici R, Zuccaro P, Dondero F. The in-vitro effects of nicotine and cotinine on sperm motility. *Hum Reprod*. Vol. 12(4) pp. 727-33. 1997.
- Ghaffari MA, Rostami M. Lipid peroxidation and nitric oxide levels in male smokers spermatozoa and their relation with sperm motility. *J Reproduction Infertil*. Vol. 13(2) pp. 81-7. 2012.
- Harvey RG Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemistry and Carcinogenicity*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp. 11–87. 1991.
- Jana K, Samanta PK, De DK. Nicotine diminishes testicular gametogenesis, steroidogenesis, and steroidogenic acute

regulatory protein expression in adult albino rats: possible influence on pituitary gonadotropins and alteration of testicular antioxidant status.. *Toxicol Sci.* Vol. 116(2) pp. 647-59. 2010.

- Kapoor D, Jones TH. Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *Eur J Endocrinol.* Vol. 152(4) pp. 491-9. 2005.
- Kim HH, Funaro M, Mazel S, Goldstein M, Schlegel PN, Paduch DA. Flow cytometric characterization of apoptosis and chromatin damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* Vol. 26(4) pp. 393-5. 2013.
- Kumosani TA, Elshal MF, Al-Jonaid AA, Abduljabar HS. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity among infertile and fertile men. *Clin Biochem.* Vol. 41(14-15) pp. 1199-203. 2008.
- Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil and Steril.* Vol. 79(2) pp. 287-291. 2003.

- La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Marziani A, Cannizzaro MA, Lanzafame F, Vicari E. Cryptorchidism and its long-term complications. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. Vol. 13(5) pp. 351-6. 2009.
- La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J Androl*. Vol. 33(2) pp. 145-53. 2012.
- La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Effects of varicocelelectomy on sperm DNA fragmentation, mitochondrial function, chromatin condensation, and apoptosis. *J Androl*. Vol. 33 pp. 389-96. 2012.
- La Vignera S, Condorelli RA, Balercia G, Vicari E, Calogero AE. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian J Androl*. Vol. 15(2) pp. 221-5. 2013.
- La Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, D'Agata R, Calogero AE. Male accessory gland infection and sperm parameters (review). *Int J Androl*. Vol. 34(5 Pt 2) pp. e330-47. 2011.

- Laezza M. Guida al Counseling Antifumo. Regione Emilia-Romagna, AUSL Ferrara, Dipartimento Dipendenze Patologiche. 1999.
- Ministero della Salute. Dipartimento della sanità pubblica e dell'innovazione. Attività per la prevenzione del tabagismo. Rapporto del 2011. 10 gennaio 2012.
- Oyeyipo IP, Maartens PJ, du Plessis SS. In vitro effects of nicotine on human spermatozoa. *Andrologia*. Vol. 46(8) pp. 887-92. 2014.
- Oyeyipo IP, Raji Y, Emikpe BO, Bolarinwa AF. Effects of nicotine on sperm characteristics and fertility profile in adult male rats: a possible role of cessation. *J Reprod Infertil*. Vol. 12(3) pp. 201-7. 2011.
- Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Passa AR, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, Dondero F. Environmental tobacco smoke: nicotine and cotinine concentration in semen. *Environ Res*. Vol. 68(1) pp. 69-72. 1995.

- Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, Dondero F. Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters. *Ther Drug Monit.* Vol. 15(5) pp. 358-63. 1993.
- Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Baldi E, Francavilla S, Lenzi A, Lombardo F, Gandini L. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil Steril.* Vol. 95(7) pp. 2315-9. 2011.
- Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ.* Vol. 321 (7257) pp. 323-9. 2000.
- Piasecka M, Kawiak J. Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochem Cytobiol.* Vol. 41(3) pp. 125-39. 2003.

- Quaderni del Ministero della Salute, n.13, gennaio-febbraio, pag. 52, 2012.
- Reddy A, Sood A, Rust PF, Busby JE, Varn E, Mathur RS, Mathur S. The effect of nicotine on in vitro sperm motion characteristics. *J Assist Reprod Genet.* Vol. 12(3) pp. 217-23. 1995.
- Sakamoto H, Yajima T, Nagata M, Okumura T, Suzuki K, Ogawa Y. Relationship between testicular size by ultrasonography and testicular function: measurement of testicular length, width, and depth in patients with infertility. *Int J Urol.* Vol. 15(6) pp. 529-33. 2008.
- Sciacca S, Oliveri Conti G.. Mutagens and carcinogens in drinking water. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism.* Vol. 2 pp. 157-162. 2009.
- Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology.* Vol. 223(1-2) pp. 54-60. 2006.

- Simonato L, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Boffetta P, Brennan P, Darby SC, Forastiere F, Fortes C, Gaborieau V, Gerken M, Gonzales CA, Jöckel KH, Kreuzer M, Merletti F, Nyberg F, Pershagen G, Pohlabein H, Rösch F, Whitley E, Wichmann HE, Zambon P. Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *Int J Cancer*. Vol. 91(6) pp. 876-87. 2001.
- Thielen A, Klus H, Muller L. Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject. *Exp Toxicol Pathol*. Vol. 60(2-3) pp. 141-56. 2008.
- Tweed JO, Hsia SH, Friedman TC. The endocrine effects of nicotine and cigarette smoke. *Trends in the Endocrinol Metab*. Vol. 23(7) pp. 334-42. 2012.
- Vine MF, Hulka BS, Margolin BH, Truong YK, Hu PC, Schramm MM, Griffith JD, McCann M, Everson RB. Cotinine concentration in semen, urine, and blood of smokers and non-smokers. *Am J Public Health*. Vol. 83(9) pp. 1335-8. 1993.

- Wald NJ, Hackshaw AK. Cigarette smoking: an epidemiological overview. *Br Med Bull*. Vol. 52(1) pp. 3-11. 1996.
- Wang YJ, Li DW, Zhang WL, Zhang RQ, Wang GN, Zhang RR. Correlation of recurrent pregnancy loss with sperm parameters and sperm DNA fragmentation. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. Vol. 29(5) pp. 602-5. 2012.
- WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Fifth edition. 2010.
- World Health Organization. Smoking, drinking and drug taking in European Region. Copenhagen 1997.
- Yildiz D. Nicotine, its metabolism and overview of its biological effects. *Toxicon*. Vol. 43(6) pp. 619-32. 2004.
- Zaher C, Halbert R, Dubois R, George D, Nonikov D. Smoking-related diseases: the importance of COPD. *Int J Tuberc Lung Dis*. Vol. 8(12) pp. 1423-8. 2004.
- Zavos PM, Correa JR, Antypas S, Zarmakoupis-Zavos PN, Zarmakoupis CN. Effects of seminal plasma from cigarette

smokers on sperm viability and longevity. *Fertil Steril*. Vol. 69(3) pp. 425-9. 1998.

- Zhang, Zhu, Li, Yu, Zhang, Liu. Decline of semen quality and increase of leucocytes with cigarette smoking in infertile men. *Iran J Reprod Med*. Vol. 11(7) pp. 589-96. 2013.