

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO DE MARIHUANA Y LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN HOMBRES  
CHILENOS. ASOCIACIÓN CON LA CANTIDAD Y TIEMPO DE CONSUMO DE LA DROGA.**

**OLIVER BRIAN QUINTANA GARCÍA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE**

**MAGISTER EN MORFOLOGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dr. Alexis Parada Bustamante  
Co-Directora de Tesis: Prof. Dra. Marina Díaz Fontdevila

**2018**

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la(el) candidata(o)

OLIVER BRIAN QUINTANA GARCÍA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Morfología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 07/12/2018.

Prof. Dr. Alexis Parada Bustamante  
Director(a) de Tesis  
(Instituto de Investigaciones Materno Infantil - IDIMI)

Prof. Dra. Marina Diaz Fontdevila  
Co-Director(a) de Tesis  
(Instituto de Investigaciones Materno Infantil - IDIMI)

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Ulrike Kemmerling

Prof. Dr. Héctor Contreras

Prof. Dra. Soledad Berrios  
Presidente Comisión

## ÍNDICE

Índice	2
Resumen	4
Abstract	7
1. Introducción	9
A) Espermatogénesis	9
B) Evaluación de la producción de espermatozoides en la clínica	10
C) Morfología espermática según criterio estricto de Kruger	11
D) Disminución de la cantidad y la calidad espermática en los últimos años	13
E) Sistema endocannabinoide	14
F) Rol del Sistema endocannabinoide en la producción de espermatozoides	15
G) Sistema endocannabinoide en el testículo	17
H) Uso de la marihuana en Chile y su relación con alteraciones seminales	20
2. Hipótesis	26
3. Objetivos	26
3.1. Objetivo General	26
3.2. Objetivos Específicos	26
4. Materiales y Métodos	27
A) Reclutamiento de voluntarios	27
B) Información sobre consumo de marihuana y hábitos de vida	28
C) Procesamiento de la muestra seminal	29
D) Morfología espermática	29
E) Análisis estadístico	34

5. Resultados	35
5.1. Caracterización de la población consumidora y no-consumidora	35
5.2. Caracterización de la población consumidora	36
5.3. Comparación entre grupo consumidor y no-consumidor	38
5.3.1. Resultados espermiogramas	38
5.3.2. Resultados de morfología espermática estricta	41
5.3.2.1. Alteraciones en la morfología espermática estricta	45
5.3.2.2. Resultados morfología espermática estricta específica de cabeza	47
5.3.2.3. Resultados morfología espermática estricta específica de pieza media	51
5.3.2.4. Resultados morfología espermática estricta específica de cola	57
6. Discusión	60
7. Conclusiones	65
8. Bibliografía	66
9. Anexos	73

## RESUMEN

Estudios epidemiológicos han determinado que la cantidad y la calidad de los espermatozoides en el eyaculado han disminuido en las últimas décadas. Uno de los parámetros afectados es el aumento en el porcentaje de espermatozoides con alteraciones morfológicas. Se ha propuesto que una de las causas de este último fenómeno es la mayor y constante exposición a diferentes tóxicos medioambientales naturales y/o artificiales. La marihuana es una droga ilícita cuyo consumo se ha incrementado drásticamente en nuestro país en los últimos años. Estudios sugieren que el consumo de marihuana está relacionado a un aumento en el porcentaje de espermatozoides con alteraciones morfológicas. Sin embargo, no se ha evaluado los tipos de alteraciones morfológicas específicas presentes en los espermatozoides de los consumidores de marihuana, lo cual es clave para entender el mecanismo por el cual esta droga ejerce su efecto deletéreo. Además, no se ha evaluado la asociación entre la morfología espermática con la cantidad y años de consumo de la droga.

Con los antecedentes descritos, la hipótesis de este trabajo de tesis fue que *“Hombres chilenos que consumen marihuana tienen una mayor proporción de alteraciones morfológicas específicas en sus espermatozoides en comparación a hombres que no consumen marihuana y este efecto se ve potenciado por un mayor consumo semanal y/o por una mayor cantidad de años de consumo de la droga”*.

Para contrastar nuestra hipótesis, se reclutó un total de 41 hombres (27 consumidores de marihuana y 14 no-consumidores de marihuana), con un rango de edad de 20 a 40 años y que no presentaban antecedentes de alteraciones andrológicas, ni consumo excesivo de alcohol y tabaco. Cada uno de los voluntarios

donó una muestra seminal y completó una encuesta sobre sus estilos de vida, incluyendo la cantidad semanal y los años de consumo de marihuana. A partir de las muestras seminales se evaluó la concentración/ml, el conteo total, la vitalidad y la motilidad progresiva de los espermatozoides presentes en el eyaculado. Por otro lado, se evaluó la morfología espermática registrando la presencia y frecuencia de alteraciones en la cabeza (cónica, piriforme, redonda, vacuolada, alargada, macrocéfalo, microcéfalo, con acrosoma pequeño, con forma de alfiler), pieza media (cuello doblado, inserción asimétrica, ancha, delgada, con citoplasma residual) y cola (corta, doblada, enrollada, doble o triple).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que el consumo de marihuana no está relacionado con alteraciones en el volumen, la concentración espermática, el conteo total, la vitalidad, la motilidad progresiva ni tampoco con el aumento en el porcentaje de espermatozoides con alteraciones morfológicas específicas o totales de los espermatozoides presentes en el eyaculado. Sin embargo, encontramos una significativa correlación positiva entre el número promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente y los años de consumo de marihuana con el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal presente en el eyaculado. Nuestros resultados indican que el consumo de marihuana no está asociado a un aumento en el porcentaje de espermatozoides con alteraciones morfológicas específicas en su estructura. Sin embargo, determinamos que el consumo durante un tiempo prolongado (años) o frecuente (varios cigarrillos a la semana) de marihuana estaría asociado a un aumento en el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal en el eyaculado. Nuestros resultados

deben ser confirmados por estudios futuros los cuales incluyan un mayor número de voluntarios evaluados.

## ABSTRACT

Epidemiological studies have determined that quantity and quality of sperm in the ejaculate have decreased in the last decades. One of the parameters affected is an increased percentage of spermatozoa with morphological alterations. It has been proposed that one of the causes of this last phenomenon is an increased and constant exposure to different natural and/or artificial environmental toxicants. Marijuana is an illicit drug whose consumption has increased drastically in our country in the last years. Studies suggest that marijuana use is related to an increase in the percentage of sperm with morphological alterations. However, the specific morphological alterations in spermatozoa that are associated to marijuana consumption have not been evaluated, which is key to understand the mechanisms by which this drug exerts this deleterious effect. In addition, the association between sperm morphology with the quantity and years of consumption of this drug have not been evaluated.

With this in mind, the hypothesis of this thesis work was *"Chilean men who consume marijuana have higher proportion of specific morphological alterations in their sperm compared to men who do not consume marijuana and this effect is more marked by a increased average week consumption and/or by the years of consumption"*. To test our hypothesis, a total of 41 men were recruited (27 marijuana users and 14 non-marijuana users), with an age range of 20 to 40 years and who did not have a history of andrological alterations nor excessive alcohol or tobacco consumption. Each of the volunteers donated a semen sample and completed a survey about their lifestyles, including average week consumption and years of consumption of this drug.



Concentration/ml, total count, vitality and progressive motility of spermatozoa in the ejaculate were evaluated in seminal samples. On the other hand, sperm morphology was evaluated recording the incidence and frequency of alterations in the head (conical, piriform, round, vacuolated, elongated, macrocephalic, microcephalic, with small acrosome, pin-shaped), middle piece (bent neck, asymmetric insertion, wide, thin, with residual cytoplasm) and tail (short, folded, rolled, double or triple) of analyzed spermatozoa.

The results obtained in this thesis indicate that marijuana consumption is not related with alterations in volume, sperm concentration, total counting, vitality, progressive motility and an increase in the percentage of spermatozoa with specific or total morphological alterations present in the ejaculate. However, there was a significant positive correlation between the average number of marijuana cigarettes consumed weekly and the years of marijuana consumption with the percentage of sperm with abnormal morphology present in the ejaculate. Our results indicate that the marijuana consumption is not associated with an increased percentage of sperm with specific morphological alterations; however, we determined that a prolonged (years) or frequent (several times in the week) consumption of marijuana would be associated with a increase of the percentage of spermatozoa with abnormal morphology in the ejaculate. Our results must be confirmed by future studies which include more volunteers that smoke marijuana.

## 1. INTRODUCCIÓN

### A) Espermatogénesis

La espermatogénesis corresponde al proceso por el cual las espermatogonias originadas desde las células germinales primordiales se transforman en espermatozoides. Este proceso, que comienza en la pubertad, se caracteriza por que al nacimiento del individuo las células germinales se ubican en cordones sexuales de los testículos, las cuales luego son rodeadas por las futuras células de Sertoli (Neto et al, 2016).

Antes de la pubertad los cordones sexuales darán origen a los túbulos seminíferos, mientras que las células germinales primordiales originarán las espermatogonias de dos tipos: "A", las que mediante mitosis forman una reserva continua de células madre (*stem cells*) y que también podrán originar del segundo tipo, "B", que dan origen a los espermatoцитos primarios.

Un componente importante de la estructura testicular es el espacio intersticial, donde se ubican las células de Leydig. Estas células son productoras de hormonas esteroidales, destacando la testosterona, la cual es necesaria para llevar a cabo el proceso espermatogénico. Formando parte del 17-20% del epitelio de los túbulos seminíferos, se encuentra un segundo tipo celular importante para el normal desarrollo de la espermatogénesis, las células de Sertoli. Estas células juegan un rol crucial en el proceso, otorgando sustento metabólico, protección y un espacio físico apto para el desarrollo de los espermatozoides. Por tanto, la función del testículo esencialmente corresponde a la producción de espermatozoides y síntesis de hormonas esteroidales.

Durante la pubertad, el proceso espermatogénico se reanuda por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Las espermatogonias tipo A comienzan el proceso de meiosis I dando origen a los espermatoцитos primarios y luego a los espermatoцитos secundarios. En la meiosis II los espermatoцитos secundarios dan origen a las espermátidas redondas, las cuales son haploides. El siguiente proceso corresponde a la espermiogénesis, que se define como una serie de cambios experimentados por las espermátidas redondas para su transformación a espermatozoides. Estos cambios incluyen: condensación del núcleo y formación de la cabeza, formación del acrosoma desde el aparato de Golgi, formación del cuello, pieza media y cola, y la eliminación de la mayor parte del citoplasma. En la especie humana el tiempo necesario para que una espermatogonia se transforme en un espermatozoide maduro es de alrededor de 64 días (O'Donnell, 2015; Neto et al, 2016).

## **B) Evaluación de la producción de espermatozoides en la clínica.**

La producción normal o anormal de espermatozoides se evalúa a través de la realización de un espermiograma, el cual consiste en obtener una muestra seminal por masturbación luego de una abstinencia sexual de 3 a 5 días. La muestra se deja licuar por aproximadamente 30-60 minutos para luego analizar diferentes características macroscópicas (volumen, color, pH, licuefacción, viscosidad) y microscópicas por parte de un analista especializado. Entre las características microscópicas se evalúa la concentración de espermatozoides por mililitro, la motilidad progresiva y total, y la morfología espermática. De acuerdo con las directrices publicadas por la organización mundial de la salud el año 2010 (WHO, 2010) los rangos mínimos de referencia para considerar una muestra espermática normal son: concentración de espermatozoides

mayor o igual a 15 millones por ml y motilidad espermática progresiva mayor o igual al 32%. En relación a la morfología espermática normal, esta se evalúa a través del criterio estricto de Kruger, y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal en el eyaculado debe ser igual o mayor al 14 %.

### **C) Morfología espermática según criterio estricto de Kruger**

La metodología estricta de Kruger surge en el año 1986 a través de la publicación de un artículo científico que sugirió reemplazar los valores de algunos parámetros utilizados hasta esa fecha para proveer un mejor valor pronóstico en los programas de Fertilización *In Vitro* (FIV). La metodología consiste, en términos generales, en evaluar extendidos de una muestra de semen fresco con tinción de Papanicolau modificada para espermatozoides. Kruger postuló que un espermatozoide debe ser considerado con morfología normal cuando la cabeza tiene una configuración lisa y ovalada, con un acrosoma bien definido que comprende entre el 40-70% del espermatozoide. Largo de cabeza de 5 a 6  $\mu\text{m}$  y diámetro de 2.5 a 3.5  $\mu\text{m}$ . No deben existir defectos en el cuello, pieza media o cola, ni gotas citoplasmáticas que sobrepasen la mitad del tamaño del espermatozoide. Espermatozoides con estructuras límites son clasificados como anormales (Kruger *et al.*, 1986, Kruger *et al.*, 1988).

La metodología estricta de Kruger se considera como uno de los más importantes marcadores de la capacidad fecundante, ya que la cantidad de formas espermáticas morfológicamente normales se relacionan con el éxito de la FIV. Kruger y colaboradores propusieron que una muestra seminal debería considerarse normal a nivel morfológico cuando el porcentaje de espermatozoides con estructura normal en el eyaculado estaba sobre el 14%, ya que se obtenían buenas tasas de fecundación en procedimientos de

FIV cuando se utilizaban muestras seminales que tenían espermatozoides estructuralmente normales sobre ese porcentaje. Por otro lado, si el porcentaje de espermatozoides normales en la muestra se encontraba bajo el 4%, se debía aconsejar otro tipo de técnica de reproducción asistida distinta a la FIV (como por ejemplo la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)), dado que cuando se utilizaban espermatozoides con valores de morfología normal menores al 4% en la técnica de FIV, las tasas de fecundación obtenidas eran significativamente menores (Kruger *et al.*, 1987, Kruger *et al.*, 1988).

Las formas morfológicas normales, según OMS (2010) incluyen:

- Cabezas de forma ovalada con contorno suave y regular. Con un tamaño de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro y 5  $\mu\text{m}$  de largo. Poseen un área acrosomal claramente definida que comprende entre el 40% a 70% de la cabeza, no debe contener vacuolas de gran tamaño, presencia de hasta dos vacuolas que no ocupen sobre el 20% del tamaño de la cabeza. La región acrosomal no debe tener vacuolas.
- Pieza media delgada, regular y con una longitud similar a la de la cabeza. El eje mayor de la pieza media debe estar alineado con el de la cabeza. El citoplasma residual solo se considera anómalo cuando se presenta en exceso (sobre un tercio del tamaño de la cabeza).
- Cola con un calibre uniforme en su longitud, más delgada que la pieza media y de aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  de longitud, sin signos de estar quebrada.

#### **D) Disminución de la cantidad y la calidad espermática en los últimos años**

Un meta-análisis publicado el año 1992 (Carlsen et al, 1992) evidenció a través del análisis retrospectivo de espermigramas realizados entre los años 1940 y 1990 que la concentración de espermatozoides por ml estaba disminuyendo progresivamente en la población mundial. Por ejemplo, la media de espermatozoides por ml en el año 1940 era de 113 millones, mientras que la media encontrada en el año 1990 fue de 66 millones (Carlsen et al, 1992). Entre las causas esgrimidas para este fenómeno se propuso una mayor y constante exposición a diferentes contaminantes ambientales naturales y artificiales los cuales negativamente afectan el proceso espermatogénico (Te Velde et al, 2010). De forma interesante, estudios más recientes no sólo han encontrado una disminución en la concentración de espermatozoides por ml, sino también una disminución en la motilidad y morfología espermática en países de diferentes continentes. Por ejemplo, un estudio realizado en Francia reportó que tanto la concentración de espermatozoides, como la motilidad y morfología espermática habían disminuido significativamente cuando se compararon muestras obtenidas el año 1989 y el año 2005 (periodo de 16 años) (Le Moal et al, 2014), mientras que un estudio realizado en Brasil también encontró una disminución en la concentración de espermatozoides, en la motilidad y morfología espermática cuando se compararon muestras obtenidas en una cohorte de 2300 hombres entre los años 2000-2002 y 2010-2012 (periodo de 10 años) (Borges et al, 2015).

Se han identificado diversos factores genéticos y medioambientales relacionados a un aumento en porcentaje de espermatozoides con defectos estructurales en el eyaculado; como por ejemplo estilos de vida poco saludable, la exposición a pesticidas (Aneck-Hahn et al, 2007), hábito de fumar cigarrillo (Asare-Anane et al, 2016) y el consumo de

alcohol (Gaur et al, 2010). Un factor recientemente relacionado con el aumento de espermatozoides con alteraciones estructurales en el eyaculado es el consumo de marihuana (Pacey et al, 2014), cuyo principio activo es el tetrahidrocannabinol, el cual también modula el sistema endocannabinoide en mamíferos (Pacher et al, 2006).

## **E) Sistema endocannabinoide**

Desde el descubrimiento del Tetrahidrocannabinol (THC) como el principal ingrediente psicoactivo de la marihuana, la posterior clonación de receptores cannabinoides y la identificación de sus ligandos endógenos, nuestra comprensión de las funciones del sistema endocannabinoide (ECS) en un contexto fisiológico ha aumentado considerablemente.

Los endocannabinoides son lípidos naturales que regulan diversas funciones fisiológicas en los vertebrados. El ECS es altamente conservado durante la evolución y está compuesto por varios receptores específicos (receptores cannabinoides tipo-1 y tipo-2), sus ligandos endógenos y una serie de enzimas biosintéticas y degradativas. El hecho de que este sistema sea conservado durante la evolución apunta a que juega un rol de modulación fundamental en funciones celulares y orgánicas básicas. En consecuencia, el ECS es ampliamente expresado en órganos centrales y periféricos de vertebrados, y regulan funciones fisiológicas y de comportamiento.

El sistema básico de señalización del ECS consiste básicamente en al menos 2 receptores unidos a proteína G, conocidos como receptores cannabinoides tipo-1 y tipo-2 (CB1 y CB2); los ligandos endógenos, de los cuales la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) son los mejores caracterizados; y, por último, enzimas sintéticas y degradativas, y transportadores que regulan los niveles de

endocannabinoides y la acción de los receptores. Los endocannabinoides fueron inicialmente aislados desde el cerebro y luego de tejidos periféricos como fluidos reproductivos. Los efectos de AEA y 2-AG, vía CB1 y CB2, dependen de su concentración en el espacio extracelular. Esto es controlado por un transportador de membrana endocannabinoide putativo y por el balance entre las enzimas de degradación o síntesis del ligando. Los receptores CB1 son abundantes en todo el sistema nervioso central de los vertebrados y algunos tejidos periféricos, mientras que los receptores CB2 son principalmente expresados en tejidos periféricos y células inmunes, pero también han sido últimamente descritos en el sistema nervioso central. Estudios en mamíferos han evidenciado que los endocannabinoides también podrían unirse y activar canales receptores de potencial transitorio de tipo-1 (TRVP1). Existe evidencia de que el ECS está involucrado en funciones reproductivas en humanos y animales de ambos sexos (Pacher et al, 2006; Lu et al, 2017).

#### **F) Rol del sistema endocannabinoide en la producción de espermatozoides**

Diversos estudios han mostrado que el sistema endocannabinoide está involucrado en la regulación de la producción del gameto masculino actuando tanto a nivel central como a nivel gonadal. En relación a la regulación a nivel central, se conoce que las funciones reproductivas están bajo el control neuroendocrino por eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Existe un acuerdo general en que la activación del sistema endocannabinoide a nivel central inhibe la liberación de GnRH y por ende disminuye la producción de testosterona a nivel testicular (Pacher et al, 2006; Bovolín *et al.*, 2014). Por otro lado, el hecho que los endocannabinoides estén presentes en el plasma seminal indica que este sistema también se expresa a nivel del sistema reproductor masculino (Amoako *et al.*, 2014). De



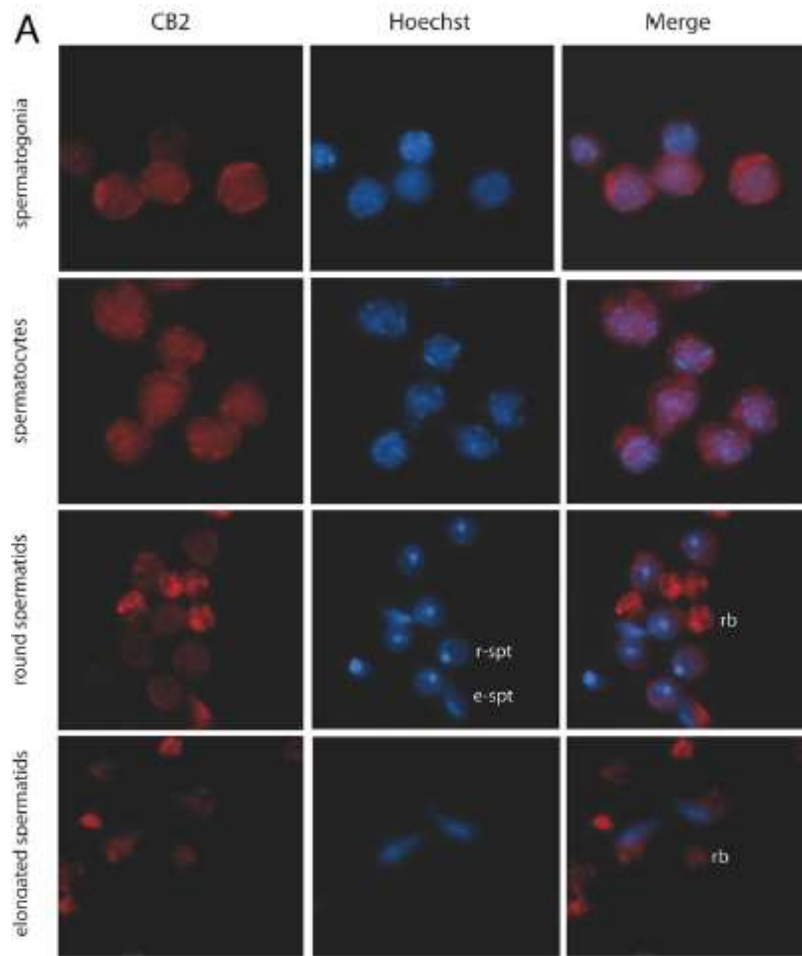
hecho, el testículo posee la habilidad de sintetizar ECBs y expresa además los receptores CB1, CB2 y TRPV1 de este sistema en distintos tipos celulares, incluyendo a la célula espermática en formación (Pacher et al, 2006; Bovolin et al, 2014) y las células de Sertoli, las cuales le dan sostén metabólico y estructural a las células germinales. A través de modelos animales se determinó que el sistema endocannabinoide es crucial para la espermatogénesis, ya que ratones knock out para los receptores endocannabinoides presentan graves alteraciones en el proceso espermatogénico (Bovolin *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado la participación de este sistema en diversos procesos de la fisiología espermática, incluyendo motilidad, reacción acrosomal y la capacitación (Chiocarelli *et al.*; 2010).

De forma interesante, se ha sugerido que el sistema endocannabinoide tiene un importante rol en el proceso de la espermiogénesis (desarrollo acrosomal, organización nuclear y condensación de la cromatina) principalmente a través de la actividad del receptor CB1, ya que, este receptor es expresado en las espermátidas redondas durante el desarrollo del acrosoma y durante la elongación y condensación nuclear. Recientemente se ha analizado la expresión y localización de CB1 y FAAH en células germinales de rana y ratas. Ambas proteínas están presentes en espermátidas redondas y elongadas (o en elongación), sugiriendo la participación del ECS en la espermiogénesis y maduración. La presencia de CB1 y FAAH en el mismo tipo celular sugiere que la presencia de FAAH puede ser necesaria para establecer un tono endocannabinoide óptimo para precisamente conducir la morfogénesis celular de las espermátidas (Bovolin *et al.*, 2014).

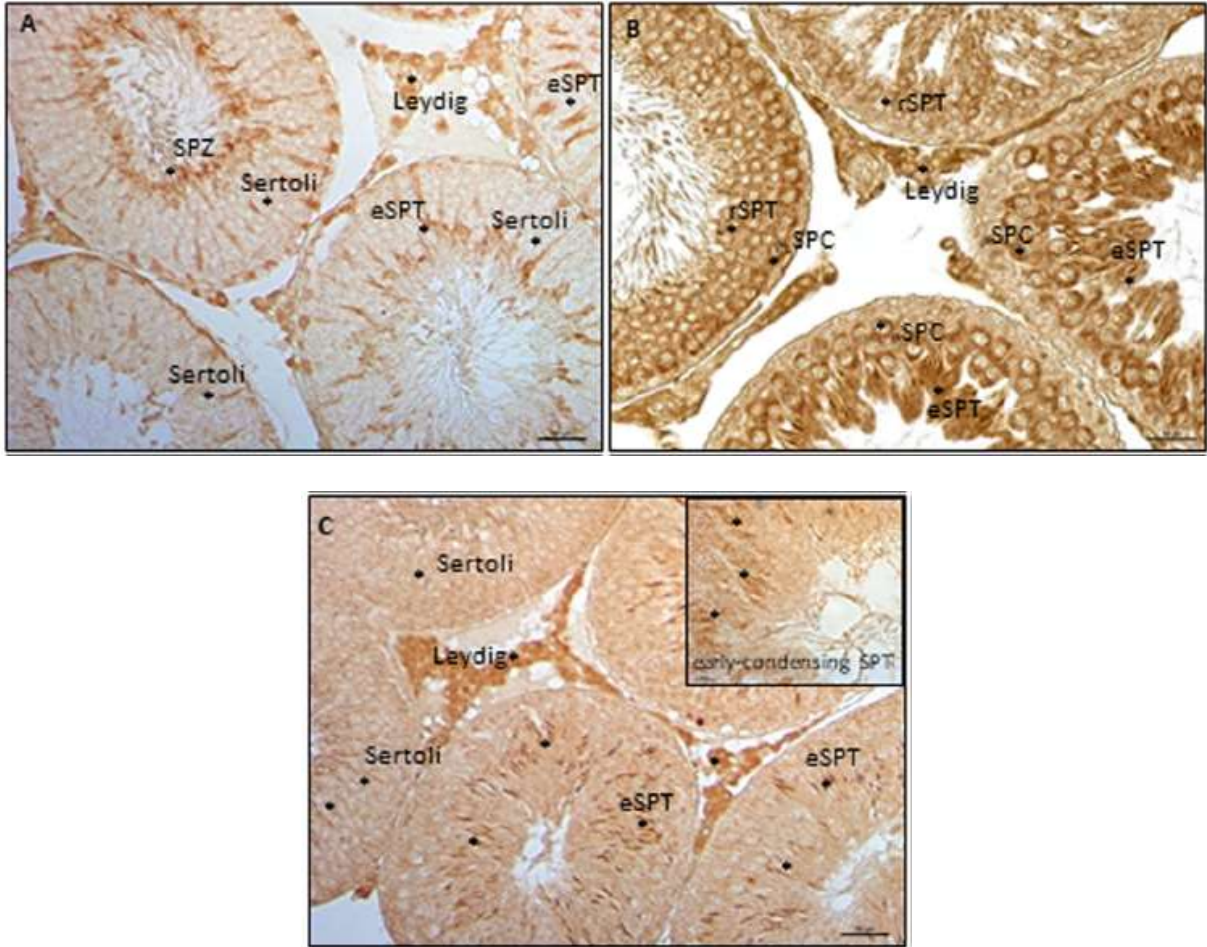
## **G) Sistema Endocannabinoide en el testículo**

Si bien el rol exacto del sistema endocannabinoide durante la espermatogénesis aun no ha sido dilucidado, diferentes estudios han logrado identificar, por variados métodos, elementos de este sistema en diferentes tipos celulares del proceso espermatogénico. En un estudio realizado por Grimaldi et al. (2009) en ratones, se lograron identificar los ligandos del sistema endocannabinoide, anandamida y 2-AG en cultivos celulares primarios de espermatogonias, así como también la expresión de los receptores CB1 y CB2 en los diferentes estadios de células espermatogonias, espermatocitos, espermátidas redondas y espermátidas en elongación (figura 1).

En otro estudio, realizado por Migliaccio et al. (2018) en testículos de ratas, se evaluó la expresión de las enzimas de biosíntesis y degradación (NAPE-PLD: Fosfolipasa D N-acilfosfatidiletanolamina, FAAH: Amida Hidrolasa de Ácidos Grasos y MAGL: Monoacilglicerol lipasa) y de los receptores del sistema endocannabinoide (CB1 y CB2) en células germinales en los túbulos seminíferos (figura 2). Los resultados indicaron que la expresión de los componentes del ECS está relacionada con la progresión en el desarrollo de las células germinales, particularmente el receptor CB2 y 2-AG parecen estar relacionados a las etapas de mitosis y meiosis, mientras que el receptor CB1 y la anandamida parecen estar relacionados con la actividad de las espermatogonias (células madre) y la producción de espermátidas.



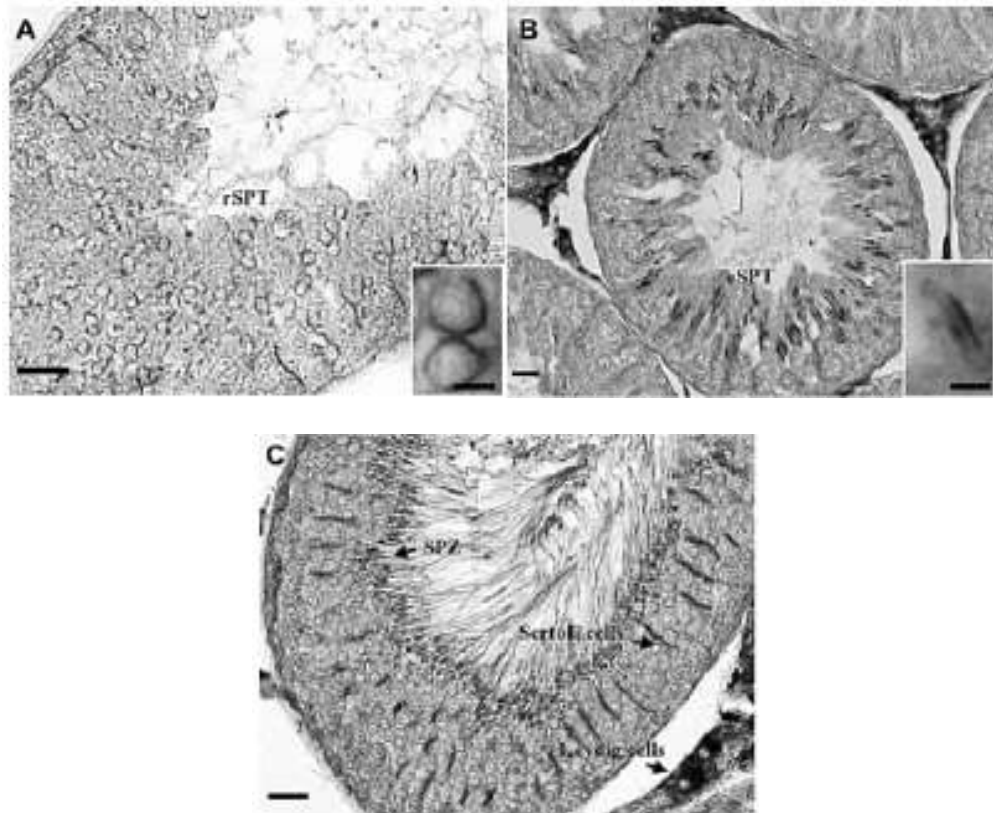
**Figura 1.** Tinción de inmunofluorescencia de CB2 en células germinales de ratón (Grimaldi et al., 2009)



**Figura 2.** Análisis de inmunohistoquímica de los componentes del sistema endocannabinoide en testículos de ratas de 90 días postparto. Inmunolocalización de NAPE-PLD (A), FAAH (B), MAGL (C) en compartimentos tubular e intersticial. Los asteriscos indican células inmunopositivas (Migliaccio et al., 2018).

De manera similar, Cacciola et al. (2008), determinaron en ratas que desde los 31 a 60 días del desarrollo, los receptores CB1 fueron inmunolocalizados en espermátidas alargadas y espermátidas redondas, lo que sugiere un rol importante de este tipo de receptor en la espermatogénesis. Por otra parte, desde los 14 a los 60 días de edad, las células de Leydig adultas fueron immuno-positivas para CB1 y a partir de los 41 días de edad, se observó una leve señal en las células de Sertoli para la expresión

de este mismo receptor (figura 3), indicando que la diferenciación de las células germinales puede depender del sistema endocannabinoide.

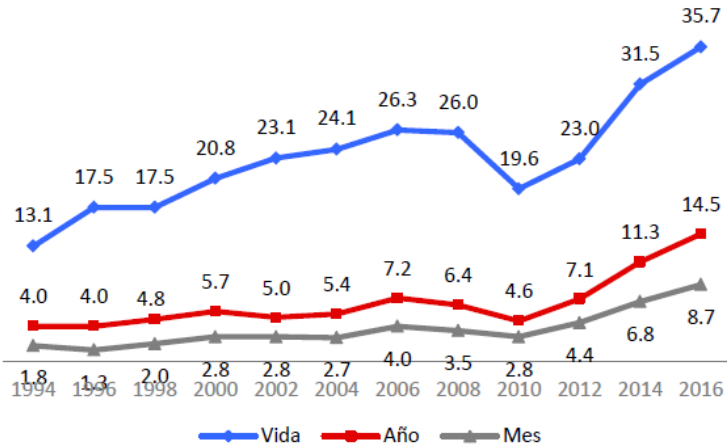


**Figura 3.** Secciones de testículo de rata adulta con inmunotinción para CB1. CB1 fue evidente en espermátidas redondas, región acrosomal (A), espermátidas alargadas, en la región de la cabeza (B) y en células de Sertoli (C). eSPT: espermátidas alargadas; rSPT: espermátidas redondas; SPZ: espermatozoide. Barra= 20 $\mu$ m (Grimaldi et al., 2009).

## H) Uso de la marihuana en Chile y su relación con alteraciones seminales

La marihuana es la droga ilícita más ampliamente utilizada en el mundo occidental, con un reporte de uso entre 13.7% en los Estados Unidos de América y un 17.6% en Dinamarca durante el 2012 y 2013 (Gundersen *et al.*, 2015). En nuestro país, de

acuerdo con datos publicados el año 2017 por el Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA, 2017) en su décimo segundo estudio nacional de drogas en la población general chilena, el consumo de marihuana ha aumentado considerablemente en los últimos años. La prevalencia de consumo durante “el ultimo año” pasa de un 4,6% en el 2010 para aumentar explosivamente hasta un 14,5% en 2016, siendo las mayores cifras reportadas en toda la serie de estudios (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Porcentaje de Evolución Prevalencias de Consumo de Marihuana, Chile 1994-2016 (SENDA, 2017).

La desagregación por sexo muestra también aumentos significativos en el consumo. En el caso de hombres, la prevalencia de “consumo en el último año” aumenta de 14,6% en 2014 a 18,4% en 2016. Además, se observó que las mayores prevalencias de consumo se encuentran en los tramos de edad 19-25 y 26-34 años, tramos que corresponden a la edad reproductiva (Tabla 1).

Serie	Total	Sexo		Tramos de Edad					Nivel Socioeconómico		
		Hombre	Mujer	12 a 18	19 a 25	26 a 34	35 a 44	45 a 64	Bajo	Medio	Alto
1994	4,0	6,1	1,9	5,6	8,7	4,7	1,6	0,2	3,6	3,2	5,2
1996	4,0	5,9	2,2	6,7	10,6	3,5	1,1	0,2			
1998	4,8	7,2	2,4	7,6	12,1	4,8	1,7	0,3	5,4	5,0	4,2
2000	5,7	8,5	3,1	8,1	14,7	6,7	2,4	0,4	5,7	4,9	6,6
2002	5,0	7,9	2,3	6,2	13,0	6,7	2,0	0,5	5,5	4,3	5,0
2004	5,4	7,6	3,2	6,2	14,7	6,5	2,4	0,7	5,0	4,5	7,0
2006	7,2	9,7	4,7	7,4	18,5	9,8	3,8	1,3	5,8	6,0	10,3
2008	6,4	8,8	4,2	9,1	17,9	6,7	2,8	0,9	7,4	5,6	6,4
2010	4,6	7,1	2,1	5,3	12,3	6,7	2,6	0,5	6,1	3,3	5,1
2012	7,1	9,8	4,4	6,7	17,5	10,3	4,4	1,9	7,4	6,9	7,1
2014	11,3	14,6	8,1	13,5	24,0	17,1	9,0	4,2	10,6	10,4	12,5
2016	14,5	18,4	10,6	12,6	33,8	23,4	9,4	5,5	14,4	12,1	16,6

**Tabla 1.** Porcentaje de Evolución Prevalencia de Consumo de Marihuana en el Último Año según Sexo, Edad y Nivel Socioeconómico, Chile 1994-2016 (SENDA, 2017).

En relación al tipo de marihuana utilizada, se observa una disminución respecto al estudio anterior en el uso de marihuana de tipo *prensada* (o “*paraguaya*”, conocida por la inclusión de elementos tóxicos para su producción), de 15,9% en 2014 a 8,1% en el 2016. Un 72.9% declaró que la más usada es la marihuana *verde* (*natural* o *de autocultivo*), aquella descrita como sin componentes agregados y un 9.7% declaró consumir en mayor medida la marihuana *skunk* (*creepy* o “de alta potencia”, por su alto contenido de tetrahidrocannabinol (THC)), variación importante respecto del 5,7% en el 2014 (SENDA, 2017). Por tanto, se ha observado que la preferencia de consumo por la marihuana de tipo *verde* ha aumentado durante los últimos años en desmedro de la marihuana de tipo *prensada* (tabla 2).

*Porcentaje que declara haber consumido con mayor frecuencia un tipo de marihuana (%)*

Serie	Total	Sexo		Tramos de edad				
		Hombre	Mujer	12 a 18	19 a 25	26 a 34	35 a 44	45 a 64
<i>Marihuana Prensada (Paraguaya)</i>								
2012	32,1	36,4	22,6	42,4	31,9	26,1	26,3	36,2
2014	15,9	17,7	12,6	30,9	12,6	14,7	12,1	13,2
2016	8,1	9,4	5,9	13,8	6,4	7,4	11,7	6,3
<i>Marihuana Verde</i>								
2012	54,4	50,0	64,1	49,4	50,7	60,5	63,0	55,4
2014	68,9	65,7	74,5	54,4	78,3	62,1	73,9	69,0
2016	72,9	70,9	76,4	65,2	75,3	76,1	66,7	72,3
<i>Marihuana Skunk o de Alta Potencia</i>								
2012	6,2	7,4	3,5	2,2	10,2	4,2	4,0	2,7
2014	5,7	6,9	3,8	4,4	3,2	13,5	3,0	3,1
2016	9,7	11,6	6,3	8,7	11,9	9,9	9,9	4,3

**Tabla 2.** Porcentaje de Evolución de Consumo de Tipos de Marihuana entre Prevalentes en el Último Año según Sexo y Edad en Chile 2012-2016 (Senda, 2017).

El componente activo de la marihuana es el cannabinoide  $\Delta$ -tetrahidrocannabinol, el cual actúa como un agonista de los receptores CB1 y CB2 (Di Marzo et al., 2009), receptores que se encuentran en células espermáticas, incluso en espermátidas redondas, razón por la cual es relevante tratar de dilucidar el efecto que podría ejercer el componente psicoactivo de la marihuana sobre la morfología espermática y, posteriormente, estudiar qué mecanismos son los que propenden a cada tipo de alteración espermática.

Aun cuando el sistema endocannabinoide juega un rol en la producción del espermatozoide, pocos estudios han investigado la asociación entre la marihuana y la reproducción masculina. Dos son los principales estudios que evaluaron el efecto del consumo de marihuana sobre parámetros seminales, uno realizado en una población del Reino Unido (Pacey et al, 2014) y otro realizado en una población danesa (Gundersen et al, 2015).



En relación al estudio realizado en la población del Reino Unido, se determinó que el consumo de marihuana tres meses previos al momento del análisis del espermograma estaba asociado con un mayor riesgo de encontrar un porcentaje de espermatozoides con morfología normal menor al 4% (Pacey et al, 2014). Por otro lado, el estudio realizado en la población danesa también determinó que el consumo de marihuana se asoció a un menor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en aquellos hombres que fumaban marihuana más de una vez por semana en comparación a los hombres que no fumaban marihuana (Gundersen *et al.*, 2015). Además, en este último estudio se determinó que la concentración espermática, el conteo total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides móviles fue significativamente menor en comparación a los obtenidos de hombres que no consumían marihuana.

Aun cuando ambos estudios asociaron un efecto negativo del consumo de marihuana sobre la morfología espermática, ninguno de los dos detalló los tipos de alteraciones morfológicas encontradas, lo cual puede ayudar a dilucidar el mecanismo por el cual la marihuana genera este efecto. Esto debido a que la espermiogénesis es un proceso complejo que involucra la formación del acrosoma, condensación del núcleo, formación del cuello, pieza media y cola, y la eliminación de la mayor parte del citoplasma. La posible omisión de evaluar o reportar los tipos de alteraciones encontradas podría explicarse al hecho que en ambos estudios la morfología espermática fue evaluada a través de un software computacional llamado CASA (“computer-assisted sperm analysis”), el cual sólo cuantifica el porcentaje de espermatozoides con alteraciones en la cabeza. De acuerdo al manual de la OMS, el análisis de la morfología del espermatozoide debe incluir también un análisis completo de la pieza media y cola del

espermatozoide, e incluir un análisis detallado de todas las alteraciones encontrada en cada uno de los espermatozoides analizados de la muestra (OMS, 2010).

Debido a esto y porque ningún estudio ha evaluado el efecto del consumo de marihuana sobre la morfología espermática en una población chilena, la cual tiene un distinto acervo genético a la población europea, esta tesis propuso evaluar la relación del consumo de marihuana con el porcentaje de espermatozoides en el eyaculado con anomalías morfológicas específicas en la cabeza, pieza media y cola en una población chilena utilizando el criterio estricto de Kruger, además de correlacionar los resultados obtenidos con la frecuencia y años de consumo de la droga.

## **2. HIPÓTESIS**

*Hombres chilenos que consumen marihuana tienen una mayor proporción de alteraciones morfológicas específicas en sus espermatozoides en comparación a hombres que no consumen marihuana y este efecto se ve potenciado por un mayor consumo semanal y por una mayor cantidad de años de consumo de la droga.*

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del consumo de marihuana sobre la morfología espermática, utilizando el criterio estricto de Kruger y relacionar los resultados encontrados con la cantidad semanal y la duración del consumo de marihuana.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

A) Hacer un estudio detallado completo de la morfología espermática en las muestras seminales de hombres voluntarios consumidores y no-consumidores de marihuana utilizando el criterio estricto de Kruger.

B) Relacionar los resultados obtenidos con la cantidad semanal y la duración del consumo de marihuana.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A) Reclutamiento de voluntarios:**

Este protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética de investigación en seres humanos (CEISH) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y por el comité ético de investigación del Servicio de Salud Metropolitano Central. Cada individuo consumidor y no-consumidor de marihuana que aceptó participar en el estudio firmó un consentimiento informado donde se explicó la finalidad de este estudio (anexo 1). Las muestras seminales fueron obtenidas de hombres voluntarios quienes se enteraron de este protocolo de investigación a través de redes sociales o amigos. Los espermogramas se realizaron en dependencias del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) de la Universidad de Chile, ubicado en el Hospital San Borja Arriarán en Avenida Santa Rosa #1234, Santiago. En este centro se realizan normalmente análisis de espermograma de carácter diagnóstico. Para realizar el espermograma, las muestras fueron obtenidas por masturbación en un contenedor plástico estéril, respetando el periodo de abstinencia sexual de tres a cinco días según recomienda el manual de la OMS (WHO, 2010).

Los criterios de inclusión para hombres consumidores y no-consumidores de marihuana fueron hombres entre 20 y 40 años, nacidos en Chile.

Los criterios de exclusión para ambos tipos de voluntarios fueron hombres con diagnóstico previo de hipogonadismo hipogonadotropo, vasectomía, varicocele, enfermedades crónicas (diabetes, falla renal o hepática), orquitis, que estén bajo tratamiento hormonal, con un historial de consumo excesivo de cigarrillos y/o alcohol,

consumidores de otro tipo de drogas, tales como ansiolíticos y cocaína, hombres con un índice de masa corporal mayor a 30, además de pacientes con diagnóstico de cáncer testicular y en tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia.

El criterio de inclusión en el grupo de hombres consumidores de marihuana en relación al consumo de la droga fue que hayan consumido marihuana al menos en los últimos tres meses previos a la realización del espermiograma, lo cual corresponde al tiempo que tarda la formación de un espermatozoide desde un estadio de espermatogonia.

## **B) Información sobre consumo de marihuana y hábitos de vida**

Previo al espermiograma, cada voluntario contestó un cuestionario escrito sobre su edad, peso corporal, talla, hábitos de vida, consumo de alcohol, cigarrillo y marihuana u otras drogas. También se les solicitó que indicaran la cantidad semanal de consumo (correspondiente a la cantidad promedio de cigarrillos de marihuana consumidos por el voluntario a la semana), el tiempo que llevan consumiendo (duración de consumo expresada en años de consumo de marihuana) y cuándo fue la última vez que consumieron la droga. El cuestionario utilizado se encuentra anexo al final de este trabajo de tesis.

### **C) Procesamiento de la muestra seminal**

A las muestras seminales obtenidas se les dejó licuar por una hora para luego evaluar la concentración de espermatozoides por ml y la motilidad progresiva en cámara Makler. La vitalidad fue determinada a través de tinción de eosina 5% (diluida en PBS), la cual sólo tiñe espermatozoides muertos. La vitalidad espermática se calculó de la siguiente forma: % espermatozoides no teñidos/ total de espermatozoides.

### **D) Morfología espermática**

La morfología espermática fue analizada a través del criterio estricto de Kruger. Para esto se realizó un frotis con 15 uL de muestra seminal, el cual fue fijado con etanol y luego teñido con tinción panóptico rápido. Una vez seca la placa, fue evaluada en microscopio óptico Olympus BX-51TF (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan), donde se analizó un total de 200 espermatozoides por muestra a un aumento de 1000X bajo aceite de inmersión. Para cada muestra se registró el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y el porcentaje de aquellos espermatozoides con diferentes anomalías en la cabeza, pieza media y/o cola como de detalla a continuación:

#### **Defectos de cabeza:**

- **Cónica o tapered:** se observa una cabeza con su parte anterior de tamaño menor, aguzada y que va incrementando su diámetro hacia la parte posterior, similar a un cono.

- **Piriforme:** se observa la parte anterior redondeada, con un diámetro que va decreciendo hacia la parte posterior (similar a la forma de una gota).
- **Redonda:** se observa una cabeza con forma esférica, la cual incluye la región acrosomal y el núcleo. En ocasiones puede estar ausente el acrosoma.
- **Vacuolada:** se observan cabeza con más de dos vacuolas o más del 20% de la superficie de la cabeza ocupada por áreas vacuolares sin manchas.
- **Alargada:** se observa alargada en sentido anteroposterior, con un acrosoma estrecho y alargado.
- **Microcéfalo:** posee una cabeza de diámetro y largo menor comparado con un espermatozoide de morfología normal, es decir menor a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro y 5  $\mu\text{m}$  de largo.
- **Macrocéfalo:** posee una cabeza de diámetro y largo mayor comparado con un espermatozoide de morfología normal, es decir mayor a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro y 5  $\mu\text{m}$  de largo.
- **Acrosoma pequeño:** posee un acrosoma de un tamaño menor al de un espermatozoide con morfología normal, es decir, ocupa un área menor al 40% de la cabeza.
- **Pin head:** “forma de alfiler” por su aspecto delgado, con un tamaño considerablemente menor al normal, diferente a la clasificación de “microcéfalo”. Forma estrecha y con la parte anterior aguzada.
- **Amorfo:** aquellos que presentan una forma que no clasificable dentro de las descripciones mencionadas anteriormente. Es común observar cabezas con bordes irregulares, estrangulaciones, entre otros.

Es importante mencionar que las alteraciones antes descritas pueden, además, presentarse acompañadas entre ellas o con alteraciones de otro segmento del espermatozoide (pieza media y/o cola), por tanto, se pueden observar diferentes “combinaciones” de alteraciones morfológicas.

#### **Defectos de pieza media:**

- ***Cuello doblado:*** se observa la unión entre la pieza media y cabeza desalineadas en relación a sus ejes principales, donde la cabeza parece estar invertida, con la región anterior orientada casi completamente hacia la parte posterior. A menudo se puede confundir con una inserción asimétrica de la pieza media.
- ***Inserción asimétrica:*** se observa la pieza media inserta en una región atípica de la cabeza, de forma desalineada en relación al eje principal de ésta.
- ***Pieza media ancha:*** se observa una pieza media que presenta un diámetro mayor comparado con el de un espermatozoide con morfología normal. A veces es posible observar una forma cónica decreciente en su diámetro en dirección a la cola espermática.
- ***Pieza media delgada:*** presenta un diámetro menor comparado al de un espermatozoide con morfología normal, a veces se observa más delgada que la cola.
- ***Citoplasma residual:*** aumento de volumen observado en la región de la pieza media que corresponde a citoplasma residual, el cual proviene de un proceso espermatogénico defectuoso y es considerado como “excesivo”



cuando supera un tercio del tamaño de la cabeza. Son espermatozoides caracterizados por grandes cantidades de citoplasma irregular manchado.

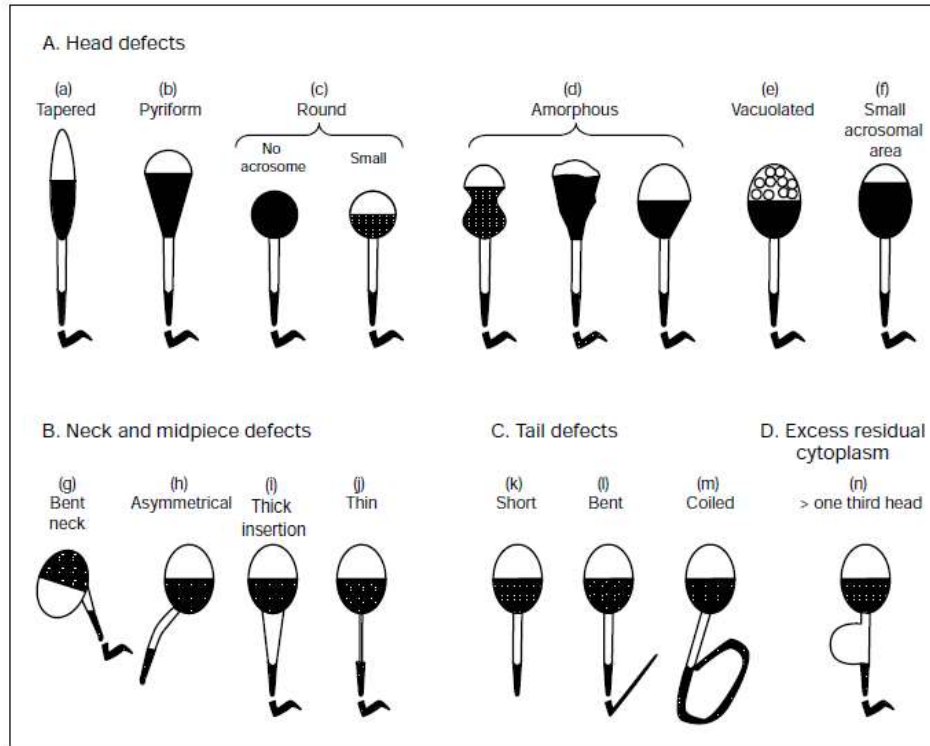
Al igual que en el segmento anterior, es posible encontrar estas anomalías acompañadas entre ellas o combinadas con las de otro segmento espermático.

#### **Defectos de cola:**

- **Cola corta:** se observa la cola con una longitud menor a la normal (45  $\mu\text{m}$ ).
- **Cola doblada:** se observa la cola con desviaciones, formando ángulos.
- **Cola enrollada:** en ocasiones se observa la cola formando un “círculo” en la región posterior a la pieza media, en donde se encuentra la cola enrollada. Otras veces se observa con forma de horquilla.
- **Cola doble o triple:** es posible observar un espermatozoide provisto de 2 o más colas.

De forma similar a las descripciones de las anomalías morfológicas de los otros segmentos, en la cola, también es posible encontrar formas anormales combinadas entre ellas mismas y las anteriormente descritas para los otros segmentos.

Un resumen de las distintas anomalías morfológicas que se pueden detectar en el análisis estricto de Kruger se muestra en la figura 1.



**Figura 4.** Dibujos esquemáticos de algunas formas anormales de espermatozoides humanos. Donde A. Defectos de cabeza: (a). ahusado, (b) piriforme, (c) redondeado [sin acrosoma y con acrosoma pequeño], (d) amorfos, (e) vacuolado, (f) área acrosomal pequeña. B. Defectos de cuello y pieza media (g) cuello doblado, (h) asimétrico, (i) inserción gruesa, (j) delgado. C. Defectos de cola: (k) corta, (l) doblada, (m) enroscada. D. Exceso Residual de Citoplasma: (n) sobre un tercio del tamaño de la cabeza (adaptado de OMS, 2010).

## **E) Análisis estadístico**

En todas las variables continuas (concentración, edad, índice de masa corporal, etc) la estrategia de análisis consistió en el uso de estadística paramétrica o de estadística no-paramétrica dependiendo de la distribución de los datos y la homogeneidad de varianza, la que se evaluó a través del test de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de distribución normal y homogeneidad de varianzas, se utilizó el test de ANOVA, seguido por el test de Bonferroni. En casos en que los datos no tenían distribución normal se utilizó el test de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney. Para determinar si existía algún grado de correlación entre los diferentes tipos de alteraciones y la cantidad y duración de consumo, se realizó el coeficiente de correlación de Spearman, el cual corresponde a una medida de asociación o interdependencia entre dos variables aleatorias continuas. La interpretación del coeficiente de Spearman oscila entre -1 y +1, indicando asociaciones positivas y negativas respectivamente, ó 0 que significa no correlación, pero no independencia. Dentro de este análisis, el valor de p menor a 0.05 entre las medias o medianas o frecuencias se consideró estadísticamente significativo, indicando una correlación o no correlación estadísticamente significativa.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CONSUMIDORA Y NO-CONSUMIDORA.

Este estudio incluyó la participación de 45 voluntarios, de los cuales 31 consumían marihuana y 14 no consumían marihuana, por tanto, se conformaron 2 grupos de estudio: el grupo de “consumidores” y el grupo de “no consumidores”. Sin embargo, 4 participantes del grupo consumidores fueron excluidos de este estudio por no cumplir con los criterios de inclusión (3 participantes con un IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> y 1 participante en tratamiento con un inhibidor de la enzima 5-alfa-reductasa), reduciendo el número de voluntarios de 31 a 27 en el grupo de consumidores.

Dentro de la caracterización de la población consumidora y no-consumidora de marihuana se evaluó la edad (años), índice de masa corporal (IMC) expresado en Kg/m<sup>2</sup>, consumo de tabaco (número de cigarrillos/día), unidades de bebida estándar semanales y tiempo de consumo de marihuana (años) (tabla 3).

	Consumidores (n=27)	No Consumidores (n=14)	P
Edad (años)	29.9 ± 1.7 (20-40)	28.9 ± 1.1 (20-38)	0.47
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24.4 ± 0.6 (18-5-29.4)	24.1 ± 0.7 (17-4-28.7)	0.57
Consumo de tabaco (N° Cigarrillos/día)	0.6 ± 0.2 (0-5)	0.4 ± 0.4 (0-5)	0.28
Unidades de bebida estándar semanales	4.2 ± 0.6 (0-11)	1.8 ± 0.7 (0-8.4)	0.008*
Tiempo de Consumo de Marihuana (años)	7.9 ± 1.1 (1-22)	-	-

**Tabla 3.** Caracterización de la población consumidora y no consumidora.

Los resultados de la tabla 3 muestran que el grupo de consumidores consumía además una mayor cantidad estadísticamente significativa de unidades de bebida de alcohol estándar semanales en comparación con el grupo de no consumidores. No

hubo diferencias significativas en la edad, IMC, consumo de tabaco y tiempo de consumo de marihuana entre ambos grupos.

## 5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CONSUMIDORA.

Una vez conformado el grupo de consumidores de marihuana (n=27), fue posible realizar una caracterización más específica, donde en primera instancia se clasificaron a los consumidores según sus preferencias de consumo por tipo de marihuana (reportadas en el cuestionario) en aquellos que consumían “*marihuana natural*” (también conocida como “autocultivo” o “verde”), “*marihuana natural y prensada*” (esta última también conocida como “paraguaya”), o “*marihuana natural y creepy*” (también conocida como “skunk” o de “alta potencia”) (tabla 4).

	“Natural” (n=23)	“Natural + prensada” (n=2)	“Natural + creepy” (n=2)	p
Edad (años)	29.0 ± 1.3 (20-40)	29.5 ± 0.5 (29-30)	27.0 ± 2.0 (25-29)	0.82
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24.4 ± 0.7 (18.5-29.4)	23.2 ± 3.2 (23.9-27.0)	25.5 ± 1.5 (20.0-26.4)	0.82
Consumo de tabaco (Nº Cigarrillos/día)	0.8 ± 0.3 (0-5)	0	2 ± 2 (0-4)	0.53
Unidades de bebida estándar semanales	4.3 ± 0.6 (0-10.99)	0.7 ± 0 (0.7-0.7)	4.6 ± 3.8 (0.7-8.4)	0.34
Tiempo de Consumo de Marihuana (años)	7.9 ± 1.2 (1-22)	12 ± 3 (9-15)	3.5 ± 1.5 (2-5)	0.23

**Tabla 4.** Caracterización de la población consumidora según preferencias de consumo por tipo de marihuana.

Los resultados observados en la tabla 4 muestran que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos conformados según la preferencia

de consumo por tipos de marihuana, sin embargo, la mayoría de los voluntarios consumidores prefería la marihuana de tipo “natural”.

Dentro del mismo grupo de voluntarios consumidores, y específicamente de los que consumían marihuana de tipo “natural” (n=23), se realizó una nueva clasificación según la preferencia de variedad de marihuana natural consumida, donde se conformaron 4 grupos: aquellos que consumían marihuana de tipo natural variedad “*sativa*” (marihuana en donde predomina la cantidad de THC y el efecto de euforia), variedad “*índica*” (marihuana en donde predomina la cantidad de CBD y su efecto de relajación), aquellos que consumían ambas variedades indistintamente “*sativa e índica*” y aquellos que no especificaron la variedad (no específica) (tabla 5).

	Sativa (n=3)	Índica (n=1)	Sativa + Índica (n=2)	No específica (n=17)	P
Edad (años)	24.7 ± 3.3 (20-31)	27	29.0 ± 4.0 (25-33)	29.8 ± 1.5 (20-40)	0.58
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23.8 ± 0.7 (23.78-26.12)	19.15	24.2 ± 0 (24.2-24.2)	24.7 ± 0.8 (18.5-29.4)	0.48
Consumo de tabaco (N° Cigarrillos/día)	1.7 ± 1.7 (0-5)	0	1 ± 1 (0-2)	0.7 ± 0.4 (0-5)	0.80
Unidades de bebida estándar semanales	5.3 ± 2.9 (2-11)	6	6.0 ± 1.1 (4.9-7.0)	3.8 ± 0.7 (0-5)	0.42
Tiempo de Consumo de Marihuana (años)	7.9 ± 1.2 (1-22)	12 ± 3 (9-15)	3.5 ± 1.5 (2-5)	8.0 ± 1.6 (1-22)	0.79

**Tabla 5.** Caracterización de la población consumidora según preferencias de consumo por variedad de marihuana natural.

En la tabla 5 es posible observar que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos conformados según preferencias de consumo de variedad de marihuana natural.

Según los resultados obtenidos para caracterizar la población consumidora y no consumidora, en donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos conformados según preferencias de consumo por tipos de marihuana o variedades de marihuana natural, se consideró al grupo de consumidores como un grupo único y sin subdivisiones para los siguientes análisis estadísticos.

### **5.3 COMPARACIÓN ENTRE GRUPO CONSUMIDOR Y NO CONSUMIDOR.**

#### **5.3.1. RESULTADOS ESPERMIOGRAMAS**

En un primer análisis estadístico de los resultados de espermiogramas, se analizaron los días de abstinencia y los parámetros espermáticos en los grupos de consumidores y no consumidores, separando de este análisis la morfología espermática para ser estudiada de forma específica y detallada.

En este análisis se cuantificaron los valores correspondientes a los días de abstinencia, volumen (ml), concentración espermática (millones de espermatozoides/ml), recuento total (millones), motilidad progresiva (%) y vitalidad (%) (tabla 6).

	No consumidores n=14	Consumidores n=27	<i>p</i>
Días de abstinencia	3.6 ± 0.3 (2-6)	3.9 ± 0.3 (1-8)	0.60
Volumen (ml)	2.2 ± 0.5 (0.2 - 6.8)	2.8 ± 0.4 (0.4-8)	0.26
Concentración (millones/ml)	93.1 ± 27.3 (7.5 - 430)	102.1 ± 9.9 (2.6 - 198)	0.15
Recuento total (millones)	223.6 ± 75.7 (6.0 - 1075)	276.7 ± 38.0 (6 - 816)	0.49
Motilidad progresiva (%)	49.1 ± 4.5 (18- 75)	57.2 ± 2.6 (25 - 80)	0.24
Vitalidad (%)	76 ± 3.5 (52 - 93)	81.5 ± 1.2 (66 - 93)	0.31

**Tabla 6.** Días de abstinencia y parámetros espermáticos de los grupos no consumidores y consumidores.

Según los resultados observados en la tabla 6, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de consumidores y no consumidores en los días de abstinencia y los parámetros espermáticos.

Para evaluar si había correlación entre los parámetros espermáticos y el número de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente (reportado por los voluntarios), se realizó un análisis de correlación de Spearman, el cual corresponde a una prueba estadística diferente de las anteriores, ya que ésta considera los valores (parámetro espermático versus número de cigarrillos de marihuana/semana) de cada participante como un valor individual y no como un valor promedio de todo el grupo en estudio (tabla 7).



	R de Spearman	p
Volumen (ml)	-0.38	0.05
Concentración (millones/ml)	-0.13	0.53
Recuento total (millones)	-0.26	0.18
Motilidad progresiva (%)	-0.17	0.38
Vitalidad (%)	-0.06	0.76

**Tabla 7.** Correlación entre los parámetros espermáticos y el número promedio de cigarrillos de marihuana semanales.

Como se indica en la tabla 7, no hubo correlación estadísticamente significativa entre los parámetros espermáticos y el número promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente.

Luego del análisis anterior se realizó una nueva correlación de Spearman para evaluar si había correlación entre los parámetros espermáticos y el tiempo de consumo de marihuana (años) reportado por los voluntarios (tabla 8).

	R de Spearman	p
Volumen (ml)	-0.25	0.2
Concentración (millones/ml)	-0.05	0.79
Recuento total (millones)	-0.18	0.37
Motilidad progresiva (%)	-0.12	0.56
Vitalidad (%)	-0.06	0.75

**Tabla 8.** Correlación entre los parámetros espermáticos y el tiempo (años) de consumo de marihuana.

En la tabla 8 se puede observar que no hay correlación entre los parámetros espermáticos y el tiempo de consumo de marihuana.

### 5.3.2. RESULTADOS DE MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA ESTRICTA

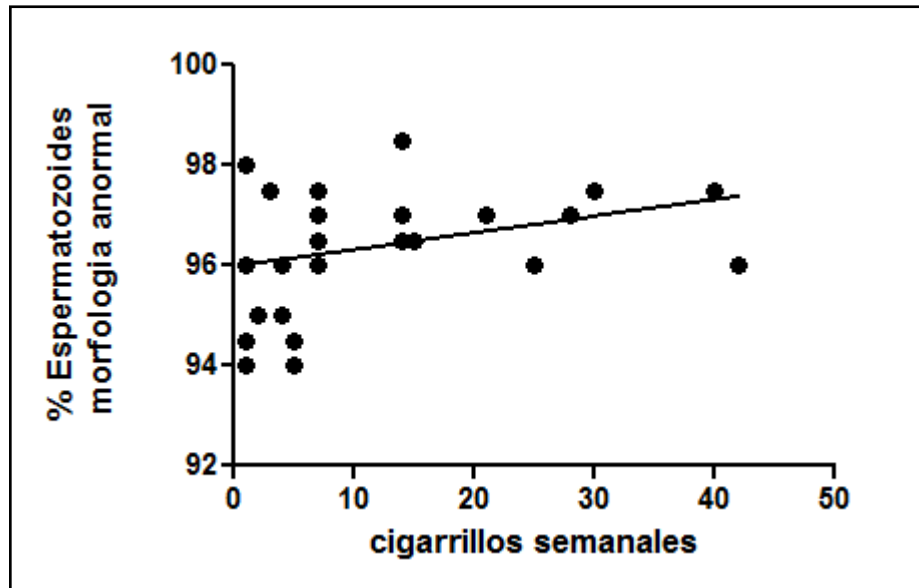
Como se explicó anteriormente, los resultados de morfología espermática estricta se analizaron de manera separada del resto de los parámetros espermáticos, donde en primer lugar se realizó el análisis del porcentaje de espermatozoides con morfología anormal en el eyaculado (tabla 9).

	No-consumidores	Consumidores	<i>p</i>
% espermatozoides con morfología anormal en el eyaculado	96.4 ± 0.6	96.4 ± 0.2	0.87

**Tabla 9.** Porcentaje de espermatozoides con morfología anormal en el grupo consumidor y no-consumidor.

Como se indica en la tabla 9, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal.

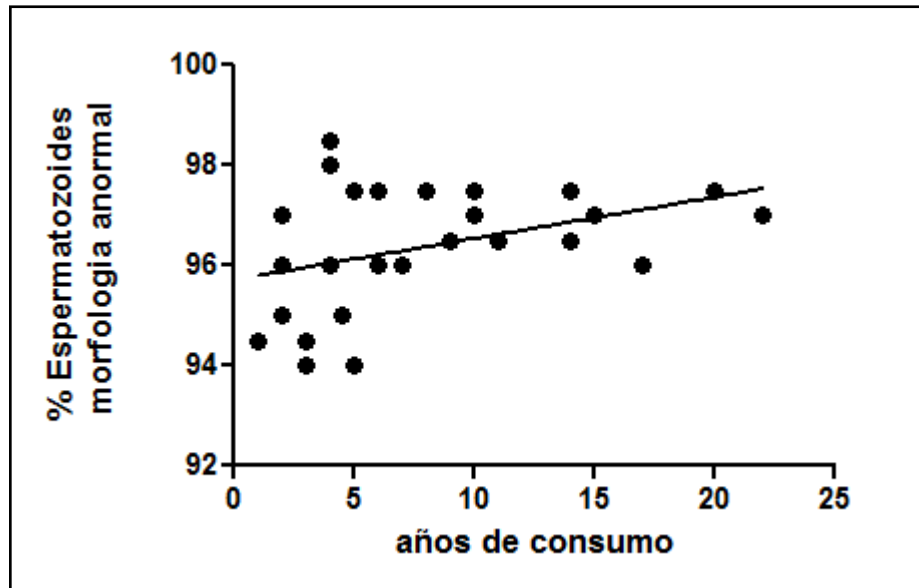
Al igual que en las evaluaciones anteriores, se realizaron las correlaciones de Spearman entre el número de espermatozoides con morfología anormal en el eyaculado del grupo consumidor y el número promedio de cigarrillos de marihuana semanales, donde se obtuvo un valor de R de Spearman de 0.3965 y  $p=0,04$ , por tanto, hay una correlación significativa y de carácter positiva entre ambas variables (gráfico 2).



**Gráfico 2.** Correlación entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y el número promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente.

El valor de R de Spearman (0.3965) indica que la correlación es positiva, es decir, a mayor cantidad de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente, mayor es el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal en el eyaculado.

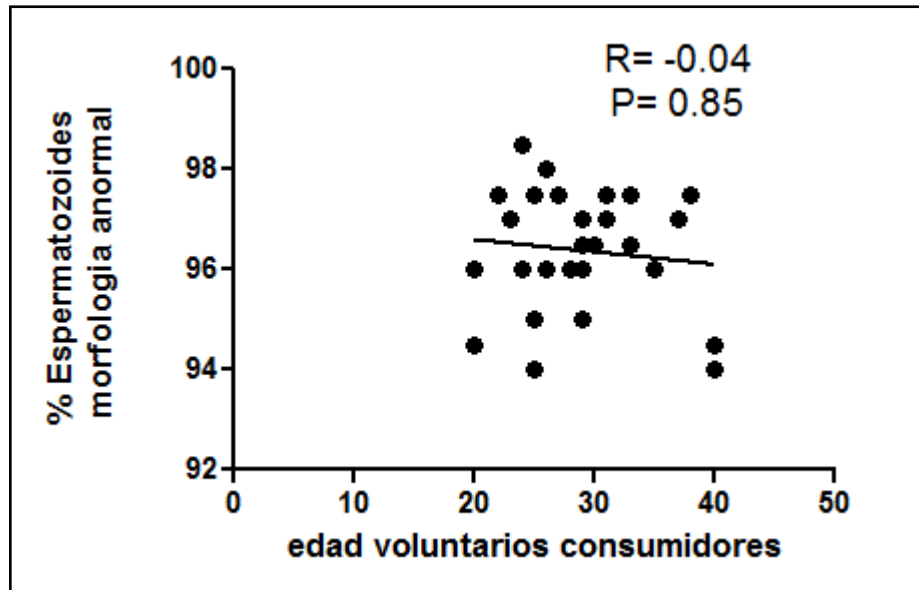
Una vez realizada la correlación anterior, se realizó un nuevo análisis de correlación entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y el tiempo de consumo de marihuana, donde los valores indicaron una correlación significativa y de carácter positiva entre ambas variables (gráfico 3).



**Gráfico 3.** Correlación entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y el tiempo de consumo de marihuana reportado por los voluntarios.

Como se muestra en el gráfico 3, a mayor tiempo de consumo (años) de marihuana, mayor porcentaje de espermatozoides con morfología anormal en el eyaculado.

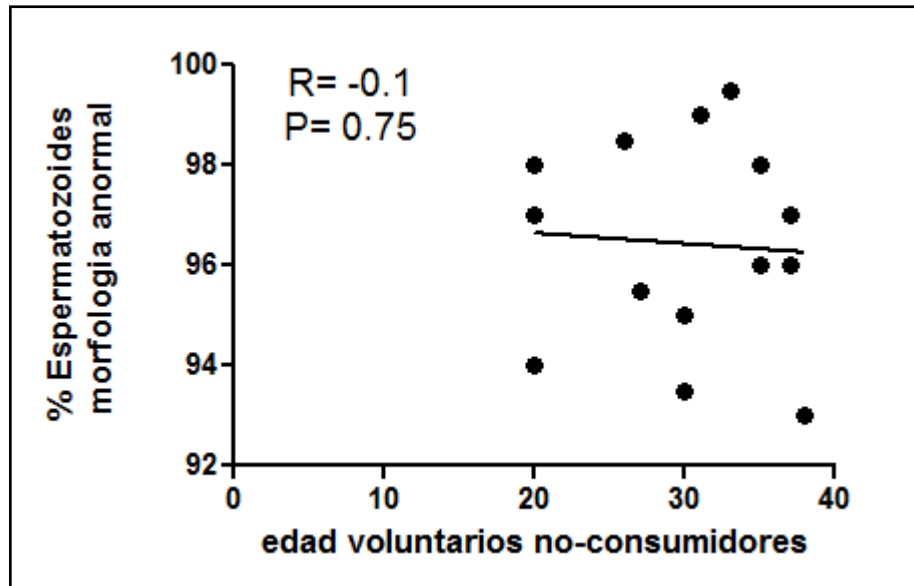
Para evaluar si este resultado estaba vinculado a la edad de los voluntarios consumidores, se realizó el análisis de correlación entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y la edad de los voluntarios consumidores (gráfico 4).



**Gráfico 4.** Correlación entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y la edad de los voluntarios consumidores de marihuana.

Como indica el gráfico 4, no hay correlación entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y la edad de los voluntarios consumidores de marihuana.

El mismo análisis se realizó para el grupo no consumidor, donde se analizó la correlación entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y la edad de los voluntarios de este grupo (gráfico 5).



**Gráfico 5.** Correlación entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y la edad de los voluntarios no consumidores de marihuana.

En el gráfico 5 es posible observar que no hay correlación entre la edad de los voluntarios no consumidores de marihuana y el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal, por tanto, el resultado de la correlación (positiva y significativa) entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y el tiempo de consumo de marihuana reportado por los voluntarios no está relacionado con la edad de los voluntarios.

### 5.3.2.1. ALTERACIONES EN LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA ESTRICTA

Luego de establecer las correlaciones anteriores, se analizó la presencia de alteraciones en los diferentes segmentos del espermatozoide (cabeza, pieza media, cola y/o sus combinaciones) en ambos grupos, consumidores y no-consumidores (tabla 10).

Alteración	No-consumidores	Consumidores	<i>p</i>
Cabeza	60.6 ± 3.0	62.1 ± 1.9	0.75
Pieza media	2.8 ± 0.6	1.8 ± 0.2	0.27
Cola	1.1 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.0006*
Cabeza + pieza media	21.9 ± 2.6	23.8 ± 1.3	0.35
Cabeza + cola	8.7 ± 1.2	7.4 ± 0.8	0.37
Cabeza + pieza media + cola	1.2 ± 0.4	1.3 ± 0.2	0.56
Pieza media + cola	0.1 ± 0.1	0.04 ± 0.04	0.66

**Tabla 10.** Porcentaje de alteraciones en la morfología espermática de voluntarios no-consumidores y consumidores de marihuana.

Como indica la tabla 10, hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo no consumidor y consumidor de marihuana, donde este último presentó un menor porcentaje de alteraciones de cola espermática.

Para establecer si este resultado estaba vinculado a número promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente o al tiempo de consumo de la misma, se realizó el análisis de correlación de Spearman para cada variable (tabla 11 y 12).

Alteración	R de Spearman	<i>p</i>
Cabeza	-0.06	0.76
Pieza media	0.21	0.28
Cola	-0.03	0.89
Cabeza + pieza media	0.05	0.79
Cabeza + cola	0.09	0.62
Cabeza + pieza media + cola	0.04	0.86
Pieza media + cola	0.13	0.53

**Tabla 11.** Correlación entre alteraciones en la morfología espermática de voluntarios consumidores de marihuana y número promedio de cigarrillos semanales.

En la tabla 11 es posible observar que no hay correlación significativa entre las alteraciones en la morfología espermática de voluntarios consumidores de marihuana y el número promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente.

Alteración	R de Spearman	<i>p</i>
Cabeza	-0.007	0.97
Pieza media	0.009	0.96
Cola	-0.25	0.21
Cabeza + pieza media	0.14	0.48
Cabeza + cola	-0.07	0.71
Cabeza + pieza media + cola	0.09	0.64
Pieza media + cola	0.25	0.20

**Tabla 12.** Correlación entre alteraciones en la morfología espermática de voluntarios consumidores de marihuana y tiempo de consumo de la misma.

En la tabla 12 es posible observar que no hay correlación significativa entre las alteraciones en la morfología espermática de voluntarios consumidores de marihuana y tiempo de consumo de la droga.

### **5.3.2.2. RESULTADOS DE MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA ESTRICTA ESPECÍFICA DE CABEZA.**

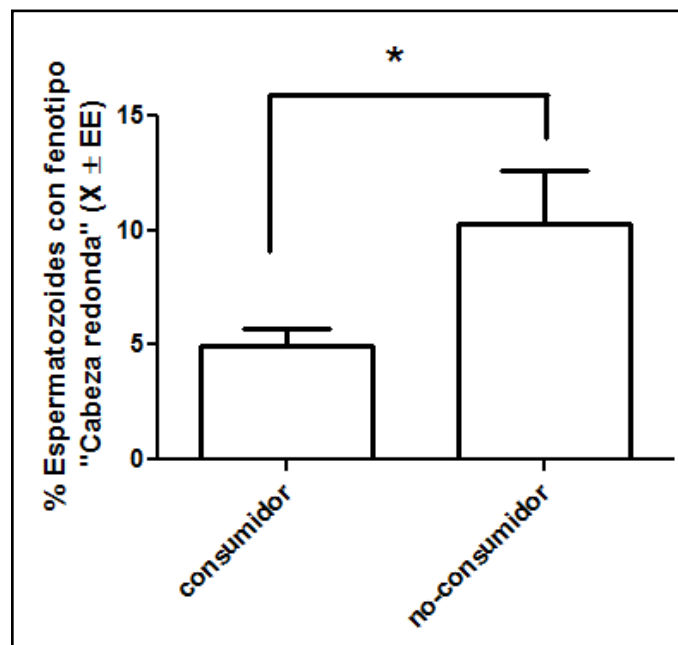
En este apartado se analizaron las diferentes alteraciones morfológicas de cabeza espermática en el grupo de consumidores y no consumidores, en donde se establecieron 11 tipos de alteraciones para este segmento (tabla 13).



Alteración	No consumidores	Consumidores	p
Cabeza cónica	1.2 ± 0.26	2.0 ± 0.3	0.14
Cabeza piriforme	4.6 ± 1.0	3.9 ± 0.8	0.44
<b>Cabeza redonda</b>	<b>10.3 ± 2.4</b>	<b>5.0 ± 0.8</b>	<b>0.03*</b>
Cabeza amorfa	38.1 ± 3.5	40.5 ± 2.1	0.53
Cabeza vacuolada	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.27
Cabeza alargada	21.1 ± 3.6	22.4 ± 2.4	0.59
Cabeza microcéfala	1.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.49
Cabeza macrocéfala	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.32
Cabeza con acrosoma pequeño	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1.0
Cabeza con forma de alfiler	3.0 ± 0.6	4.1 ± 0.6	0.47
Cabeza con más de una alteración	12.5 ± 1.2	15.3 ± 1.6	0.36

**Tabla 13.** Porcentaje de alteraciones en la morfología espermática de cabeza en voluntarios no-consumidores y consumidores de marihuana.

Como indica la tabla 13, hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en el porcentaje de espermatozoides con “cabeza redonda”, donde el grupo de consumidores de marihuana presentó un porcentaje menor de este tipo de alteración, este resultado puede ser claramente observado en el gráfico 6.



**Gráfico 6.** Porcentaje de espermatozoides con alteración específica “cabeza redonda” en el grupo “no-consumidor” y “consumidor” de marihuana (\*=  $p < 0.05$ ; Test de Mann-Withney).

Luego de realizar el análisis de las alteraciones morfológicas a nivel de cabeza espermática entre ambos grupos, se realizó el análisis de correlación de Spearman de las mismas alteraciones versus el número promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente (tabla 14) y el tiempo de consumo de la droga (tabla 15).

Alteración	R de Spearman	<i>p</i>
Cabeza cónica	-0.04	0.84
Cabeza piriforme	-0.21	0.29
Cabeza redonda	0.01	0.95
Cabeza amorfa	-0.25	0.20
Cabeza vacuolada	-0.03	0.86
Cabeza alargada	0.20	0.33
Cabeza microcéfala	0.07	0.71
Cabeza macrocéfala	0.10	0.62
Cabeza con acrosoma pequeño	-0.15	0.46
Cabeza con forma de alfiler	0.10	0.62
Cabeza con más de una alteración	0.13	0.51

**Tabla 14.** Correlación entre las alteraciones en la morfología espermática de cabeza de voluntarios consumidores de marihuana y el número promedio de cigarrillos semanales.

Según los resultados mostrados en la tabla 14, no existe correlación significativa entre las alteraciones en la morfología espermática de cabeza de voluntarios consumidores de marihuana y el número promedio de cigarrillos semanales.

Alteración	R de Spearman	<i>p</i>
Cabeza cónica	-0.25	0.21
Cabeza piriforme	-0.04	0.81
Cabeza redonda	0.09	0.65
Cabeza amorfa	-0.22	0.28
Cabeza vacuolada	0.15	0.45
Cabeza alargada	0.15	0.47
Cabeza microcéfala	0.30	0.13
Cabeza macrocéfala	-0.07	0.72
Cabeza con acrosoma pequeño	-0.09	0.66
Cabeza con forma de alfiler	-0.24	0.22
Cabeza con más de una alteración	0.29	0.14

**Tabla 15.** Correlación entre las alteraciones en la morfología espermática de cabeza de voluntarios consumidores de marihuana y el tiempo de consumo de la misma.

En la tabla 15 se pueden observar los valores de R de Spearman y “*p*”, lo cual indica que no existe correlación significativa entre las alteraciones en la morfología espermática de cabeza de voluntarios consumidores de marihuana y el tiempo de consumo de la misma.

### **5.3.2.3. RESULTADOS DE MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA ESTRUCTA ESPECÍFICA DE PIEZA MEDIA.**

Al igual que el segmento espermático anterior, se analizaron los diferentes tipos de alteraciones morfológicas en el segmento pieza media espermático, donde se estableció un total de 6 tipos de alteraciones (tabla 16).

Alteración	No Consumidores	Consumidores	<i>p</i>
Cuello doblado	3.9 ± 0.8	2.6 ± 0.3	0.16
Inserción asimétrica	10 ± 1.3	9.6 ± 0.8	0.75
Pieza media ancha	8.7 ± 1.4	10.3 ± 1.1	0.57
Pieza media delgada	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.14
Citoplasma residual	1.5 ± 0.6	2.0 ± 0.3	0.08
Más de una alteración de pieza media	1.6 ± 0.5	2.2 ± 0.3	0.08

**Tabla 16.** Porcentaje de alteraciones en la morfología espermática de pieza media de voluntarios no consumidores y consumidores de marihuana.

Como se observa en la tabla 16, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para el porcentaje de las diferentes alteraciones morfológicas del segmento pieza media.

Similar al análisis del segmento anterior, se realizó el análisis de correlación de Spearman entre las alteraciones en la morfología espermática de pieza media del grupo de consumidores versus el número promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente (tabla 17) y el tiempo de consumo de la misma (tabla 18).

Alteración	R de Spearman	p
Cuello doblado	0,08	0,70
Inserción asimétrica	0,07	0,72
Pieza media ancha	-0,03	0,88
Pieza media delgada	-0,14	0,48
Citoplasma residual	-0,18	0,37
Más de una alteración de pieza media	-0,06	0,78

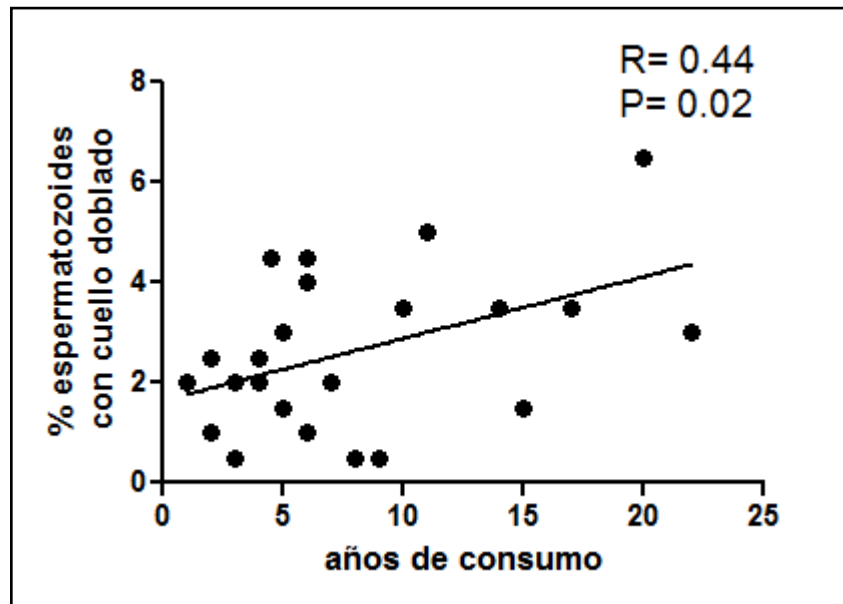
**Tabla 17.** Correlación entre las alteraciones en la morfología espermática de pieza media de voluntarios consumidores de marihuana y el número promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente.

En la tabla 17 es posible observar los resultados donde se indica que no existe correlación entre las alteraciones en la morfología espermática de pieza media de voluntarios consumidores y el número promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente.

Alteración	R de Spearman	p
Cuello doblado	0,44	<b>0,02*</b>
Inserción asimétrica	-0,15	0,45
Pieza media ancha	-0,19	0,42
Pieza media delgada	0,34	0,08
Citoplasma residual	0,16	0,42
Más de una alteración de pieza media	-0,15	0,46

**Tabla 18.** Correlación entre las alteraciones en la morfología espermática de pieza media de voluntarios consumidores de marihuana y el tiempo de consumo de la misma.

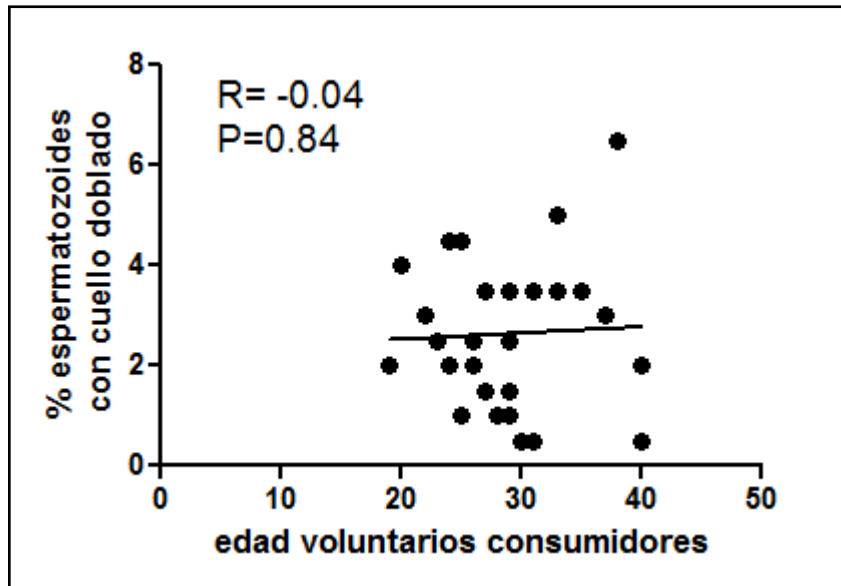
Como indica la tabla 18, existe correlación significativa, de carácter positivo, entre el porcentaje de espermatozoides con “cuello doblado” y los años de consumo de la droga, lo cual puede ser claramente observado en el gráfico 7.



**Gráfico 7.** Correlación entre el porcentaje de espermatozoides con cuello doblado y el tiempo (años) de consumo de marihuana.

Como muestra el gráfico 7, existe correlación entre el porcentaje de espermatozoides con cuello doblado y el tiempo (años) de consumo de marihuana, donde a mayor tiempo de consumo, mayor es el porcentaje de espermatozoides con la alteración morfológica de cuello doblado.

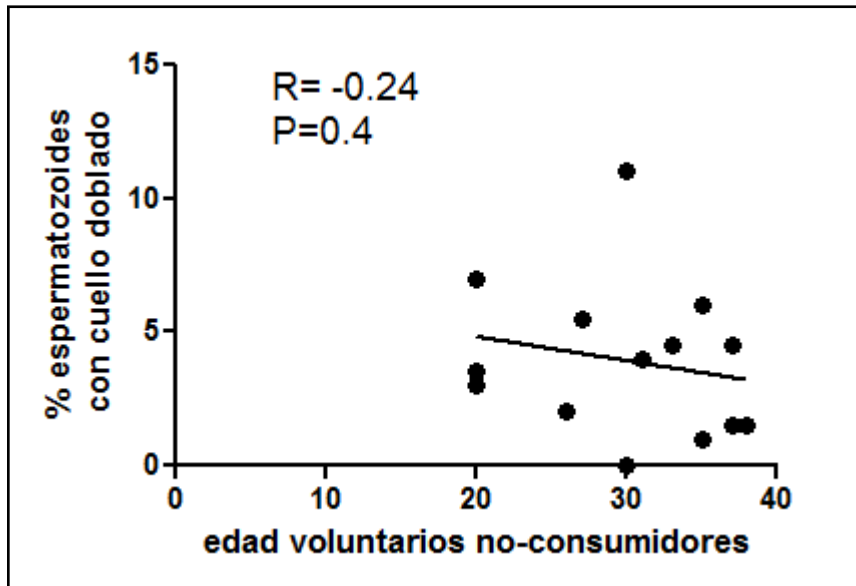
Para saber si este resultado está vinculado a la edad de los consumidores, se realizó un nuevo análisis de correlación de Spearman, donde se estableció que no hay correlación entre el porcentaje de espermatozoides con cuello doblado y la edad de los voluntarios consumidores de marihuana (gráfico 8).



**Gráfico 8.** Correlación entre el porcentaje de espermatozoides con cuello doblado y la edad (años) de los voluntarios consumidores de marihuana.

Posteriormente, se realizó el mismo análisis con el grupo de no consumidores, para establecer si hay relación entre el porcentaje de espermatozoides con cuello doblado y la edad de los voluntarios no consumidores de marihuana (gráfico 9).





**Gráfico 9.** Correlación entre el porcentaje de espermatozoides con cuello doblado y la edad (años) de los voluntarios no consumidores de marihuana.

Según lo indicado en el gráfico 9, no hay correlación entre el porcentaje de espermatozoides con cuello doblado y la edad de los voluntarios no consumidores de marihuana, por lo tanto, la correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides con cuello doblado y el tiempo (años) de consumo de marihuana, evidenciada anteriormente, no estaría vinculada a la edad de los voluntarios.

#### 5.3.2.4. RESULTADOS DE MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA ESTRUCTA ESPECÍFICA DE COLA.

La cola es el último segmento analizado, y al igual que la cabeza y pieza media se establecieron diferentes tipos de alteraciones, las que en este segmento alcanzaron un número total de 5 (tabla 19).

Alteración	No-consumidores	Consumidores	<i>p</i>
Cola corta	3.6 ± 1.0	3.1 ± 0.5	0.84
Cola doblada	3.5 ± 0.9	1.9 ± 0.3	0.12
Cola enrollada	2.4 ± 0.6	2.4 ± 0.5	0.91
Cola doble o triple	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.4	0.77
Más de una alteración de cola	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.08

**Tabla 19.** Porcentaje de alteraciones en la morfología espermática de cola de voluntarios no consumidores y consumidores de marihuana.

Según los resultados obtenidos y organizados en la tabla 19, es posible observar que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (consumidores y no consumidores) en relación con las alteraciones en la morfología espermática de cola.

A continuación, se realizaron los análisis de correlación de Spearman entre el porcentaje de espermatozoides con alteraciones específicas de cola versus el

número promedio de cigarrillos de marihuana semanales (tabla 20) y el tiempo (años) de consumo de la droga (tabla 21).

Alteración	R de Spearman	<i>p</i>
Cola corta	0,002	0,99
Cola doblada	0,10	0,61
Cola enrollada	0,24	0,23
Cola doble o triple	0,05	0,81
Más de una alteración de cola	-	-

**Tabla 20.** Correlación entre las alteraciones en la morfología espermática de cola de voluntarios consumidores de marihuana y el número promedio de cigarrillos de marihuana semanales.

Como indica la tabla 20, no hubo correlación entre las alteraciones en la morfología espermática de cola de voluntarios consumidores de marihuana y el número promedio de cigarrillos de marihuana semanales.

Alteración	R de Spearman	<i>p</i>
Cola corta	-0,13	0,51
Cola doblada	-0,22	0,28
Cola enrollada	0,27	0,18
Cola doble o triple	0,006	0,98
Más de una alteración de cola	-	-

**Tabla 21.** Correlación entre las alteraciones en la morfología espermática de cola de voluntarios consumidores de marihuana y el tiempo de consumo de esta.

Según los resultados mostrados en la tabla 21, no hay correlación entre las alteraciones en la morfología espermática de cola de voluntarios consumidores de marihuana y el tiempo de consumo de esta.

## 6. DISCUSIÓN

Dentro de este estudio fue posible caracterizar la población de voluntarios consumidores de marihuana, donde dentro de nuestros resultados se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de las unidades de bebida estándar semanales, donde el grupo de consumidores de marihuana tuvo un valor de  $4,2 \pm 0,6$ , mientras que el grupo de no consumidores  $1,8 \pm 0,7$ . Si bien estos resultados indican una diferencia estadística significativa ( $p=0.008$ ), lo único que podemos inferir es que el grupo de consumidores de marihuana consume una mayor cantidad de alcohol semanalmente comparado con el grupo no consumidor. Por otra parte, el hecho de obtener este resultado no excluyó a este grupo de ser considerados en el estudio dado que dentro de los criterios de exclusión se estableció un consumo sobre las 28 unidades de bebida estándar a la semana.

Los resultados de la caracterización de la población de consumidores de marihuana, según las preferencias de consumo, muestran que el tipo de marihuana consumido es mayoritariamente de tipo “natural”, lo que es concordante con lo señalado por el último informe realizado por el SENDA (SEND A, 2017). Sin embargo, no fue posible establecer el tipo de variedad de marihuana natural mayoritariamente consumido, dado que una gran cantidad de los voluntarios no especificó esta información en el cuestionario.

Al observar los resultados de la morfología espermática estricta, es evidente que la morfología espermática de la población consumidora y no consumidora se mantiene por debajo del límite normal establecido por la OMS, donde se indica como valor normal

≥4%, lo cual puede estar relacionado a varios factores que pueden afectar el proceso espermatogénico, como estilos de vida poco saludables, noxas medioambientales, exposición a compuestos dañinos, entre otros (Aneck-Hahn et al., 2007; Te Velde et al., 2010; Asare-Anane et al., 2016).

En cuanto a las correlaciones positivas entre el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y el promedio de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente, así como también con el tiempo de consumo de la droga, es posible inferir que, a mayor cantidad de cigarrillos de marihuana consumidos semanalmente y a mayor tiempo de consumo de marihuana, mayor es el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal en el eyaculado, lo que según nuestros resultados expuestos, no estaría relacionado con la edad de los voluntarios consumidores de marihuana.

Una hipótesis probable, es que el consumo de marihuana frecuente generaría un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual causaría daño a nivel espermatogénico, de forma específica, sobre las células de Sertoli, célula que otorga sustento metabólico y espacio físico para el correcto desarrollo espermatogénico, o por otra parte, de forma directa sobre las células germinales.

Estudios recientes han relacionado el estrés oxidativo como una de las mayores causas de infertilidad como factor masculino (Alagboni & Olayaki, 2016). Este fenómeno corresponde a una condición donde existe un desbalance entre los sistemas pro-oxidantes y anti-oxidantes, en donde la generación controlada de radicales libres en el espermatozoide está asociada al normal funcionamiento fisiológico de éste.

El efecto gonadotóxico de la marihuana mediado por el estrés oxidativo ha sido reportado, pero no así los mecanismos por los cuales éste fenómeno se produce

(Gundersen et al., 2015; Alagboni & Olayaki, 2017; Alagboni et al., 2016). Por otra parte, creemos que el consumo prolongado de marihuana podría ejercer un efecto negativo sobre el eje hipotálamo-hipófisis, generando un bloqueo en la liberación de la GnRH y, por consiguiente, disminuyendo la síntesis y liberación de FSH y LH, afectando la célula de Sertoli y con esto, el desarrollo espermático según lo descrito por Pacher et al. (2006) y Bovolín *et al.* (2014).

Otra vía posible por la cual el consumo de marihuana prolongado podría generar un aumento en el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal es que, al ser una noxa constante sobre las células de Sertoli y Leydig, el sistema endocannabinoide podría sufrir un desbalance, generando una pérdida del tono óptimo para precisamente conducir la morfogénesis celular de las espermátidas (Bovolín *et al.*, 2014).

En el análisis de la morfología espermática estricta, nuestros resultados muestran que los consumidores de marihuana tuvieron un menor porcentaje de espermatozoides con alteraciones en el segmento de la cola en comparación con el grupo de no consumidores, y que esta condición no estaba correlacionada con la cantidad promedio de cigarrillos de marihuana consumidos ni con el tiempo de consumo de ésta. De forma similar, en los resultados de morfología espermática estricta específica de cabeza, nuestros resultados mostraron que el grupo de consumidores tuvieron un porcentaje menor de espermatozoides con alteración de tipo “*cabeza redonda*”. En relación a los mecanismos por los cuales el consumo de marihuana podría “ayudar” a evitar los defectos en esta zona del espermatozoide podría involucrar la regulación positiva de la expresión y/o actividad de la proteína DNAH1, un gen relacionado con la formación de la cola espermática, el cual codifica para formar la cadena interna de dineína. La mutación

de este gen se asocia a una desorganización general del axonema, incluyendo una localización errónea de los dobletes de microtúbulos y la pérdida de los brazos internos de dineína (Khelifa et al., 2014).

En relación a los mecanismos por los cuales el consumo de marihuana podría “ayudar” a disminuir la frecuencia de la alteración “cabeza redonda”, éste podría involucrar la regulación positiva de la expresión y/o actividad de la proteína SPATA16. Este gen localizado en el aparato de Golgi y vesícula pro-acrosomal jugaría un importante rol en la correcta formación del acrosoma. Mutaciones del gen SPATA16 se han vinculado a la presentación de fenotipos espermáticos con cabeza redonda, ya que, al no existir un correcto desarrollo del acrosoma, no se adquiriría la forma ovalada característica de la cabeza espermática (Dan et al., 2007).

Finalmente, en el análisis de la morfología espermática estricta específica de pieza media, nuestros resultados muestran una correlación entre el porcentaje de espermatozoides con “cuello doblado” y el tiempo (años) de consumo de la droga, donde a mayor tiempo de consumo de ésta, mayor porcentaje de espermatozoides con cuello doblado. Además, observamos que este resultado no estaba vinculado a la edad de los voluntarios consumidores. Algunas anormalidades genéticas que han sido identificadas como causantes de espermatozoides con colas anguladas incluyen mutaciones del gen SEPTIN12, el cual codifica para una GTPasa citoesquelética formadora de filamentos. Se ha descrito su participación en la espermatogénesis, de manera específica en la morfogénesis de la cabeza espermática y el alargamiento de las colas de los mismos, probablemente implicando la asociación con alfa y beta-tubulinas. Además, forma una estructura filamentosa con SEPT7, SEPT6, SEPT2 y probablemente SEPT4 en el anillo



(*annulus*) espermático, requerido para la integridad estructural y motilidad de la cola espermática durante la diferenciación postmeiótica (Kuo et al., 2012).

De forma similar a lo observado en las alteraciones de cabeza y cola espermática anteriormente, según nuestros resultados, especulamos que el consumo prolongado de marihuana podría ejercer un efecto negativo sobre la célula de Sertoli o sobre las espermatidas, generando alteraciones en la expresión y/o actividad de la proteína SEPTIN12, y de esta forma aumentando el porcentaje de espermatozoides con alteración de tipo cuello doblado en el eyaculado.

## **7. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que el consumo de marihuana sólo afecta negativamente la morfología espermática cuando su consumo es frecuente o prolongado. Sin embargo, se requiere aumentar el número de voluntarios para obtener resultados concluyentes.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Alagbonsi, I., Olayaki, L. & Salman, T. Melatonin and vitamin C exacerbate Cannabis sativa-induced testicular damage when administered separately but ameliorate it when combined in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 27(3): 277–287, 2016.
- 2) Alagbonsi, I. & Olayaki, L. 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(2): 136–144, 2017.
- 3) Al-Malki A.H., Alrabeeah K., Mondou E., Brochu-Lafontaine V., Phillips S. & Zini A. Testicular sperm aspiration (TESA) for infertile couples with severe or complete asthenozoospermia. *Journal of Andrology,* 5: 226-231, 2017.
- 4) Amann R.P. & Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology.* 81(1):5-17.e1-3, 2014.
- 5) Amoako A.A., Marczylo T.H., Elson J., Taylor A.H., Willets J.M. & Konje J.C. Relationship between seminal plasma levels of anandamide congeners palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide and semen quality. *Fertil Steril.* 102(5):1260-7, 2014.
- 6) Aneck-Hahn N.H., Schulenburg G.W., Bornman M.S., Farias P. & de Jager C. Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men

living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa. *J Androl.* 28(3):423-34, 2007.

7) Asare-Anane H., Bannison S.B., Ofori E.K., Ateko R.O., Bawah A.T., Amanquah S.D., Oppong S.Y., Gandau B.B. & Ziem J.B. Tobacco smoking is associated with decreased semen quality. *Reprod Health.* 13(1):90, 2016.

8) Borges E Jr, Setti AS, Braga DP, Figueira Rde C, Iaconelli A Jr. Decline in semen quality among infertile men in Brazil during the past 10 years. *Int Braz J Urol.* 41(4):757-63, 2015.

9) Bovolín P., Cottone E., Pomatto V., Fasano S., Pierantoni R., Cobellis G. & Meccariello R. Endocannabinoids are Involved in Male Vertebrate Reproduction: Regulatory Mechanisms at Central and Gonadal Level. *Front Endocrinol (Lausanne).* 5:54, 2014.

10) Braekeleer, M., Nguyen M.H., Morel F & Perrin, A. Genetics aspects of monomorphic teratozoospermia: a review. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32: 615-623, 2015.

11) Cacciola G., Chioccarelli T., Mackie K., Meccariello R., Ledent C., Fasano S., Pierantoni R & Cobellis G. Expression of type-1 cannabinoid receptor during rat postnatal testicular development: possible involvement in adult leydig cell differentiation. *Biol Reprod.* 79(4):758-765, 2008.

12) Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 305(6854):609-13, 1992.

- 13) Chioccarelli T., Cacciola G., Altucci L., Lewis S., Simon L., Ricci G., Ledent C., Meccariello R., Fasano S., Pierantoni R. & Cobellis G. Cannabinoid receptor 1 influences chromatin remodeling in mouse spermatids by affecting content of transition protein 2 mRNA and histone displacement. *Endocrinology* 151(10): 5017-5029, 2010.
- 14) Coutton, C., Escoffier J., Martinez G., Arnoult C. & Ray P.F. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Human reproduction update*, 21(4), 455-485, 2015.
- 15) Di Marzo V. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res.* 60(2):77-84, 2009.
- 16) Du Plessis, S., Agarwal, A. & Syriac A. Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 32:1575–1588, 2015.
- 17) Gatimel N., Moreau J., Parinaud J. & Leandri R.D. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *American Society of Andrology and European Academy of Andrology.* 5(5)845-862, 2017.
- 18) Gaur D.S., Talekar M.S., Pathak V.P. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J Pathol Microbiol.* 53(1):35-40, 2010.

- 19) Grimaldi P., Orlando P., Di Siena S., Lolicato F., Petrosino S., Bisogno T., Geremia R., De Petrocellis L. & Di Marzo V. The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 106(27):11131-11136, 2009.
- 20) Gundersen T.J., Jørgensen N., Anderson A., Bang A.K., Nordkap L., Skakkebæk N.E., Priskorn L., Juul A. & Jensen T. K. Association Between Use of Marijuana and Male Reproductive Hormones and Semen Quality: A Study Among 1,215 Healthy Young Men. *American Journal of Epidemiology*, 182 (6): 473-481, 2015.
- 21) Jensen TK, Gottschau M, Madsen JO, Andersson AM, Lassen TH, Skakkebæk NE, Swan SH, Priskorn L, Juul A, Jørgensen N. Habitual alcohol consumption associated with reduced semen quality and changes in reproductive hormones; a cross-sectional study among 1221 young Danish men. *BMJ Open.* 4(9):e005462, 2014.
- 22) Khelifa B., Coutton C., Zouari R., Karaouzene T., Rendu J., Bidart M., Yassine S., Pierre V., Delaroche J., Hennebicq S., Grunwald D., Escalier D., Pernet-Gallay K., Jouk P.S., Thierry-Mieg N., Toure A., Arnoult C. & Ray PF. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet* 94, 95–104, 2014.

- 23) Kruger T.F., Menkveld R., Stander F., Lombard C., Van der Merwe J., van Zyl J. & Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 46(6): 1118-1123, 1986.
- 24) Kruger T.F., Acosta A. A., Simmons K.F., Swanson R.J., Matta J.F., Veeck L.L., Morshedi M & Brugo S. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology*: 30(3) 248-251, 1987.
- 25) Kruger T.F., Acosta A.A., Simmons K.F., Swanson R.J., Matta J.F. & Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*: 49 (1): 112-117, 1988.
- 26) Kuo Y.C., Lin Y.H., Chen H.I., Wang Y.Y., Chiou Y.W., Lin H.H., Pan H.A., Wu C.M., Su S.M., Hsu C.C. & Kuo P.L. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Hum Mutat* 33, 710–719, 2012.
- 27) Le Moal J, Rolland M, Gorla S, Wagner V, De Crouy-Chanel P, Rigou A, De Mouzon J, Royère D. Semen quality trends in French regions are consistent with a global change in environmental exposure. *Reproduction*: 147(4):567-74, 2014.
- 28) Lu Y. & Anderson H.D. Cannabinoid signaling in health and disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 95(4):311-327, 2017
- 29) Migliaccio M., Ricci G., Suglia A., Manfredola F., Mackie K., Fasano S., Pierantoni R., Chioccarelli T. & Cobellis G. Analysis of Endocannabinoid System in Rat Testis During the First Spermatogenic Wave. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9, 269. 2018.

- 30) Neto F.T., Bach P.V., Najari B.B., Li P.S. & Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol.* 59:10-26, 2016.
- 31) Pacey A.A., Povey A.C., Clyma J.A., McNamee R., Moore H.D., Baillie H. & Cherry N.M. Modifiable and non modifiable risk factors for poor sperm morphology. *Hum Reprod.* 29(8):1629-36, 2014.
- 32) Pacher P., Bátkai S. & Kunos G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58:389–462, 2006.
- 33) Ricci E., Al Beitawi S., Cipriani S., Candiani M., Chiaffarino F., Viganò P., Noli S. & Parazzini F. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 34(1):38-47, 2017.
- 34) Rossato M., Popa F.I., Ferigo M., Clari G. & Foresta C. Human Sperm Express Cannabinoid Receptor Cb1, the Activation of Which Inhibits Motility, Acrosome Reaction, and Mitochondrial Function. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 90(2):984 –991, 2005.
- 35) Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA). Décimo Segundo Estudio Nacional de Drogas en Población General de Chile, 2016. Santiago: SENDA 2017. <http://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/2017/12/InformeENPG2016.pdf>
- 36) Te Velde E, Burdorf A, Nieschlag E, Eijkemans R, Kremer JA, Roeleveld N, Habbema D. Is human fecundity declining in Western countries? *Hum Reprod.* 25(6):1348-53, 2010.



- 36) Teppa-Garrán A.D. & Palacios-Torres A. Current evaluation of male infertility. *Invest Clin.* 45(4):355-70, 2004.
- 38) Whan L., West M., McClure N., M.R.C.O.G & Lewis S. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. *Fertility and Sterility* 85(3): 653-660, 2006.
- 39) Wong W.Y., Thomas C.M., Merkus J.M., Zielhuis G.A. & Steegers-Theunissen R.P. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil Steril.* 73(3):435-42, 2000.
- 40) World Health Organization. Department of Reproductive Health and Research. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. Fifth edition  
<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>

## 9. ANEXOS



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES



27 JUN

### **ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO**

FECHA: 27 de Junio de 2017.

**PROYECTO: "EFECTO DEL CONSUMO DE MARIHUANA SOBRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN HOMBRES CHILENOS Y SU RELACIÓN CON LA FRECUENCIA Y TIEMPO DE CONSUMO".**

**INVESTIGADOR RESPONSABLE: SR. OLIVER QUINTANA GARCÍA**

**INSTITUCIÓN: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MATERNO INFANTIL, IDIMI, SEDE CENTRO, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.**

Con fecha 27 de Junio de 2017, el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 1992, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión original de fecha 09 de Junio de 2017.

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

#### **LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO**

- INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MATERNO INFANTIL, IDIMI, SEDE CENTRO, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

---

*Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl*



27 JUN. 2017

### INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

NOMBRE	CARGO	RELACIÓN CON LA INSTITUCIÓN
Dr. Manuel Oyarzún	Presidente	Sí
Dr. Hugo Amigo	Miembro	Sí
Dra. Lucía Cifuentes	Miembro	Sí
Dra. Grisel Orellana	Miembro	Sí
Sra. Gina Raineri	Miembro	Sí
Dra. María Ángela Delucchi	Miembro	Sí
Dr. Miguel O'Ryan	Miembro	Sí
Sra. Claudia Marshall	Miembro	Sí
Dra. Julieta Gonzalez	Miembro	Sí

Santiago, 27 de Junio de 2017.



**Prof. Gina Raineri B.**  
**Secretaria Ejecutiva CEISH**

c.c.: - Proyecto Nº 097-2017  
- Archivo Acta nº 39

*Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl*



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CHILE



## Consentimiento informado para la donación de una muestra de semen para proyecto de investigación (Página 1 de 3)

**TÍTULO DEL PROYECTO:** "EFECTO DEL CONSUMO DE MARIHUANA SOBRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN HOMBRES CHILENOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA FRECUENCIA Y TIEMPO DE CONSUMO"

**PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN:** Estudiar el efecto de la marihuana sobre la morfología y calidad espermática de hombres chilenos entre 20 y 40 años.

**PATROCINIO:** INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN MATERNO INFANTIL (IDIMI), FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE. AVENIDA SANTA ROSA 1234, SEGUNDO PISO (INTERIOR HOSPITAL SAN BORJA ARIARAN). FONOS: 56-2-29770850.

**INVESTIGADORES RESPONSABLES:** ALEXIS ANDRÉS PARADA BUSTAMANTE, FONOS: 56-2-29770869 (INVESTIGADOR PRINCIPAL). MARINA FÁTIMA DÍAZ FONTDEVILA, FONOS: 56-2-29770871 (CO-INVESTIGADORA). OLIVER QUINTANA GARCÍA, FONOS: 56-9-93231964 (CO-INVESTIGADOR).

**INTRODUCCIÓN:** Usted está siendo invitado a participar en forma voluntaria en la investigación mencionada arriba y mediante este Consentimiento Informado le explicaremos en qué consiste. Para asegurarnos que usted está informado sobre su participación en esta investigación, le estamos solicitando que lea este Formulario de Consentimiento y que lo firme si está de acuerdo en participar. Este proyecto ha sido aprobado por los comités de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Central y por el de la facultad de medicina de la universidad de Chile, los cuales regulan las investigaciones en seres humanos. Este formulario de consentimiento puede tener algunas palabras con las que usted no está familiarizado. Por favor, pida que se le explique cualquier duda que pueda tener.

### En relación a este estudio, el donante declara haber sido informado que:

Con el objeto de que el grupo de investigadores del Instituto de Investigaciones Materno Infantil puedan investigar sobre el efecto de la marihuana sobre distintas funciones del espermatozoide humano, el donante acepta entregar de forma voluntaria una muestra de semen, a partir del cual se evaluará el efecto de la marihuana sobre la morfología y calidad espermática.

La importancia de este estudio es la determinación de posibles efectos negativos del consumo de marihuana sobre la morfología del espermatozoide humano. Este conocimiento ayudará a dilucidar el verdadero efecto del consumo de marihuana sobre la fertilidad en la población chilena.

Tanto la participación del donante como la información obtenida en este estudio serán anónimas, confidenciales y sólo podrán darse a conocer en publicaciones científicas sin revelar la identidad de los pacientes.



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CHILE



27 JUN. 2017

## Consentimiento informado para la donación de una muestra de semen para proyecto de investigación (Página 2 de 3)

La participación en este estudio no tiene ningún beneficio directo para el donante. El donante sólo tendrá la satisfacción de haber participado en un estudio que puede ayudar a comprender mejor el efecto de marihuana sobre la fertilidad masculina. Los nuevos conocimientos que se adquieran de este estudio podrán favorecer en el futuro a hombres que consumen marihuana para conocer el real efecto que tiene su consumo sobre su fertilidad.

El donante está consciente de que es libre de negarse a participar en este estudio o de arrepentirse en cualquier momento de participar en esta investigación sin tener que dar explicaciones por esto. Esto no afectará la atención o tratamiento médico que pueda requerir.

La muestra de semen que usted done se utilizará sólo para la investigación descrita en este consentimiento y no se incluirá en ningún otro estudio. Una vez finalizada la investigación, la muestra de semen sobrante será adecuadamente eliminada y no será usada para ninguna otra investigación.

En caso de que el paciente tenga alguna duda relacionada a este estudio puede dirigirse al Doctor Alexis Parada Bustamante (Biólogo, teléfono: 29770869), la Doctora Marina Díaz-Fonsdevila (Bioquímica, teléfono: 29770871) o al Sr. Oliver Quintana (Magister(C) en Morfología, teléfono: 993231964) quienes trabajan en el IDIMI. Para resolver cualquier duda acerca de sus derechos como participante en este estudio, el paciente podrá dirigirse al presidente del Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Central, Doctor Emiliano Soto Ramo, dirección: Victoria Subercaseaux 381, Santiago Centro. Fono: 25746943 o dirigirse al presidente del Comité Ético Científico de investigación en seres humanos de la facultad de medicina de la Universidad de Chile, Doctor Manuel Oyazún Gómez, dirección: Avenida Independencia 1027, Santiago Centro. Fono: 29789536



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**Consentimiento informado para la donación de una muestra de semen para proyecto de investigación** (Página 3 de 3)

Después de haber leído el consentimiento y haber aclarado todas sus dudas, el donante acepta participar en el estudio "EFECTO DEL CONSUMO DE MARIHUANA SOBRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN HOMBRES CHILENOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA FRECUENCIA Y TIEMPO DE CONSUMO".

Nombre del participante: .....

RUT:..... Fecha..... Firma:.....

Nombre de la persona que obtuvo este consentimiento:.....

RUT:..... Fecha..... Firma:.....

Nombre del director, del delegado del director o del ministro de Fe del estudio:.....

RUT:..... Fecha..... Firma:.....