



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Impacto del cigarrillo
electrónico en la
viabilidad de los
espermatozoides.
Estudio In vitro del daño
de membrana y
generación de especies
ROS**

Alumno/a: Rebeca Espejo Martínez

Julio, 2023



**UNIVERSIDAD
DE JAÉN**



Trabajo Fin de Grado

Impacto del cigarrillo electrónico en la viabilidad de los espermatozoides. Estudio In vitro del daño de membrana y generación de especies ROS

Firma del alumno

Alumno: Rebeca Espejo Martínez
Jaén, Julio, 2023

ÍNDICE

1.	RESUMEN / ABSTRACT.....	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1	INFERTILIDAD.....	3
2.2	ESPERMATOZOIDES, FORMACIÓN Y MORFOLOGÍA.....	3
2.3	CIGARRILLO ELECTRÓNICO Y SUS COMPONENTES	5
2.3.1	<i>Nicotina.....</i>	6
2.3.2	<i>Propilenglicol y glicerina</i>	7
2.3.3	<i>Saborizantes</i>	8
2.3.3	<i>Toxicidad.....</i>	8
2.4	PARÁMETROS DE ESTUDIO.....	9
2.4.1.	<i>Vitalidad espermática.....</i>	10
2.4.2.	<i>Especies reactivas de oxígeno (ROS).....</i>	10
2.4.3.	<i>Daño de membrana.....</i>	11
2.4.4.	<i>Apoptosis</i>	11
3	OBJETIVOS.....	12
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4	MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1	OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	12
4.2	GRUPOS EXPERIMENTALES.....	12
4.3	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	13
4.3.1	<i>Preparación de los reactivos.....</i>	14
4.4	ANÁLISIS MICROSCÓPICO	14
4.4.1	<i>Vitalidad espermática.....</i>	14
4.5	ANÁLISIS MEDIANTE CITÓMETRO DE FLUJO	15
4.5.1	<i>Daño de membrana</i>	15
4.5.2	<i>Especies reactivas de oxígeno.....</i>	15
4.5.3	<i>Grado de Apoptosis</i>	16
4.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	17
5	RESULTADOS	17
5.1	RESULTADOS DE VITALIDAD ESPERMÁTICA.....	17
5.2	RESULTADOS DE DAÑO DE MEMBRANA	21
5.4	RESULTADOS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	24
5.5	RESULTADOS DEL GRADO DE APOPTOSIS	27
6	DISCUSIÓN	30
7	CONCLUSIÓN.....	31
8	BIBLIOGRAFÍA.....	31

1. RESUMEN / ABSTRACT

En la última década, los casos de infertilidad masculina han aumentado según la Organización Mundial de la Salud. En 1999, la concentración promedio de espermatozoides era de 20 millones por mililitro, pero en 2010 se redujo a 15 millones. Los espermatozoides son sensibles a los cambios en el medio, y fumar afecta negativamente su calidad. Aunque el cigarrillo electrónico se considera más seguro que el tabaco, su líquido de recarga contiene componentes que perjudican la producción de espermatozoides de calidad. Entre ellos se encuentran nicotina, propilenglicol, glicerina y saborizantes, potencialmente tóxicos para los espermatozoides.

En este estudio se evaluó los efectos a corto plazo del líquido de recarga en los espermatozoides. Se estableció un grupo control y cuatro grupos experimentales, comparando la exposición a nicotina pura y E-Liquid con nicotina durante una y veinticuatro horas a dos concentraciones: 5mM y 10mM. Se analizó vitalidad, daño de membrana, generación de especies reactivas de oxígeno y apoptosis.

Los resultados mostraron una disminución en la vitalidad con mayor tiempo y concentración de exposición, así como un aumento en especies reactivas de oxígeno. No se encontraron resultados significativos en daño de membrana y apoptosis.

Palabras clave: E-Liquid, cigarrillo electrónico, ROS (especies reactivas de oxígeno), nicotina, espermatozoide

ABSTRACT

According to the World Health Organization, cases of male infertility have increased in the last decade. In 1999, the average sperm concentration was 20 million per millilitre, but in 2010, it decreased to 15 million. Sperm cells are sensitive to environmental changes, and smoking negatively affects their quality. Although electronic cigarettes are considered safer than tobacco, the e-liquid used contains components that can harm the production of healthy sperm. These components include nicotine, propylene glycol, glycerine, and flavourings, which are potentially toxic to sperm.

This study aimed to evaluate the short-term effects of e-liquid on sperm. A control group and four experimental groups were established, comparing exposure to pure nicotine and nicotine-containing e-liquid for one and twenty-four hours at two concentrations: 5mM and 10mM. Vitality, membrane damage, reactive oxygen species generation, and apoptosis were analysed. The results showed a decrease in vitality with longer exposure time and higher concentrations, as well as an increase in reactive oxygen species. No significant results were found regarding membrane damage and apoptosis.

Keywords: E-Liquid, electronic cigarette, ROS (Reactive Oxygen Species), nicotine, sperm.

2. INTRODUCCIÓN

El estilo de vida que cada individuo adopta tiene un impacto significativo tanto en su salud en general como en su salud reproductiva. Esto se debe a que existen diversos factores condicionantes que pueden influir en la fertilidad masculina, y uno de los más relevantes es la exposición a sustancias tóxicas que pueden comprometer la capacidad reproductiva de los hombres. (González Rodríguez et al., 2018).

A través de numerosos estudios realizados, se ha podido demostrar de manera concluyente que el consumo de tabaco convencional está directamente relacionado con el desarrollo de una condición conocida como oligoteratozoospermia. Esta condición se caracteriza por la presencia de una baja concentración de espermatozoides en el semen, así como por su movilidad reducida y su morfología alterada (Velásquez et al., 2020).

Con el objetivo de proporcionar una alternativa para aquellos fumadores que desean abandonar este hábito perjudicial, el cigarrillo electrónico se introdujo en el mercado en el año 2004 como una opción supuestamente útil para dejar de fumar. Se presentó como una alternativa más segura y menos dañina en comparación con los cigarrillos convencionales (Galan, 2019). No obstante, es importante tener en cuenta que la efectividad del uso del cigarrillo electrónico como método de cesación tabáquica aún

es objeto de debate y requiere de una mayor investigación y estudio, según señala la Organización Mundial de la Salud (OMS). (Organización Mundial de la Salud, 2014)

La OMS enfatiza la necesidad de llevar a cabo investigaciones exhaustivas para evaluar los posibles riesgos y beneficios del cigarrillo electrónico antes de considerarlo como una estrategia confiable para dejar de fumar. Aunque algunos estudios sugieren que los dispositivos de vapeo podrían representar una opción menos dañina debido a la ausencia de tabaco y alquitrán, es fundamental contar con más evidencia científica que permita comprender plenamente sus implicaciones en la salud reproductiva y en la salud en general. (Organización Mundial de la Salud, 2014)

2.1 Infertilidad

La incapacidad de una pareja para concebir tras un año manteniendo relaciones sexuales frecuentemente y sin protección, es la definición de infertilidad. (Practice Committee of tAmerican Society for Reproductive Medicine, 2008). Bayasgalan y colaboradores, evaluaron que la tasa de infertilidad debida exclusivamente al factor masculino oscila en un 25.6%. Es preocupante cómo en los últimos años, la tasa de disminución en el recuento de espermatozoides ha ido en aumento (Sengupta et al., 2017)

Existen múltiples causas que explican la infertilidad masculina, como, desequilibrios hormonales, trastornos en el transporte espermático, condiciones idiopáticas o defectos testiculares primarios. (Winters y Walsh, 2014). Además, se ha observado que estilos de vida poco saludables también han contribuido al aumento en la prevalencia de la infertilidad en la última década. (Agarwal et al., 2015).

2.2 Espermatozoides, formación y morfología

El proceso de formación de espermatozoides, conocido como espermatogénesis, es un proceso complejo de diferenciación celular que ocurre en los túbulos seminíferos. Durante este proceso, las células se desarrollan y maduran hasta convertirse en espermatozoides completamente funcionales. El correcto funcionamiento de este proceso es vital en la reproducción masculina. (Jiménez González, 2022)

Sin embargo, estudios más recientes llevados a cabo por Pelzman y su equipo en 2023 han revelado que la exposición al líquido o al aerosol de los cigarrillos electrónicos tiene un efecto negativo en la espermatogénesis de ratones. Estos hallazgos indican que la presencia de sustancias presentes en los cigarrillos electrónicos puede interferir con la producción normal de espermatozoides y, potencialmente, afectar la fertilidad masculina. (Pelzman et al., 2023)

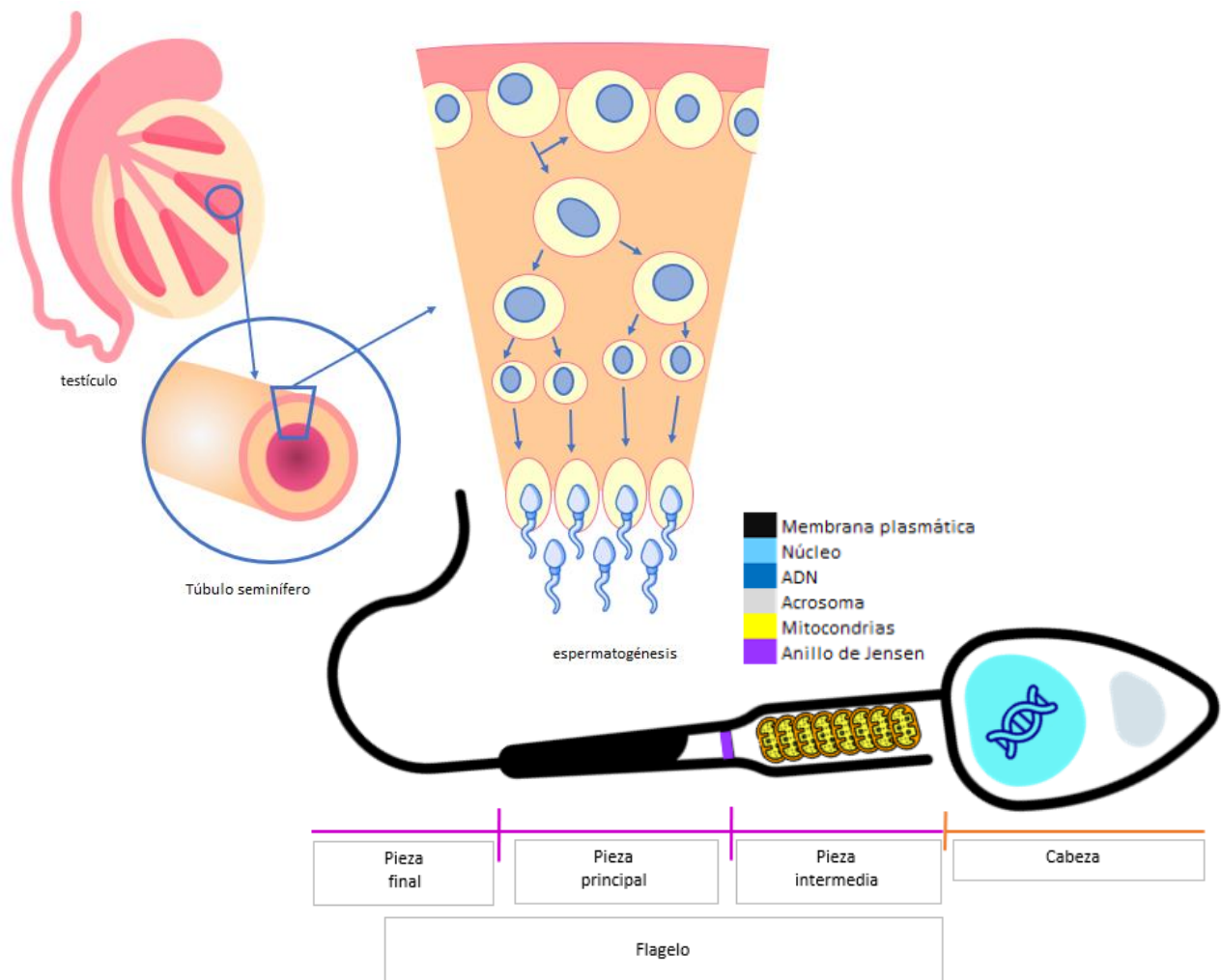


Figura 2.1 Esquema de la espermatogénesis y partes del espermatozoide (elaboración propia)

El espermatozoide maduro presenta una estructura compuesta por una cabeza ovalada y una cola, ambas envueltas por una membrana plasmática. La cabeza se compone de un núcleo, donde se encuentra el material genético (ADN) y el acrosoma, una vesícula derivada del aparato de Golgi que contiene proteasas y receptores necesarios para la fecundación. Ver figura 2.1. Por otro lado, la cola o flagelo se puede dividir en tres partes distintas. En primer lugar, la pieza intermedia alberga alrededor de 75-100 mitocondrias dispuestas de forma helicoidal, las cuales son responsables

de suministrar la energía necesaria para el movimiento del espermatozoide. A continuación, se encuentra la pieza principal, separada de la intermedia por el anillo de Jensen. Por último, en el extremo de la cola se encuentra la pieza final. (Sutovsky y Manandhar, 2006).

La alteración de la morfología de alguna de estas tres partes puede suponer un problema para la fertilidad. (Guzick et al., 2001).

2.3 Cigarrillo electrónico y sus componentes

Los cigarrillos electrónicos, también conocidos como vapeadores, son dispositivos que generan un vapor inhalable que se obtiene tras calentar un líquido que suele contener nicotina.

Aparecen por primera vez en 1968, surgen de la creación de Herbert A. Gilbert. (Galan, 2019). Su uso se empezó a popularizar en la época de los 2000, siendo actualmente la forma más común de consumo de tabaco entre la población joven de Estados Unidos (Villanti et al., 2017). A pesar de que sus efectos para la salud aún no están bien estudiados, se está viendo que la probabilidad de consumir tabaco aumenta con el uso del cigarrillo electrónico pero no al contrario (Leventhal et al., 2015).

Es importante destacar que los efectos del tabaco en la salud son bien conocidos y está considerado como una de las principales causas de mortalidad según la OMS (Inglés et al., 2007) y en relación a la calidad del semen, los efectos del tabaco son detectables 24 horas después de su consumo. (Saaranen et al., 1987).

Continuando con los cigarrillos electrónicos, hay que mencionar que son el sistema electrónico más común de suministro de nicotina (ENDS). (Farsalinos y Le Houezec, 2015). Estos dispositivos contienen una batería que permite la evaporación del llamado “e-liquid”, compuesto por nicotina (no siempre presente) y saborizantes, diluidos en propilenglicol y/o glicerina, que son disolventes orgánicos. (Crenshaw et al., 2016). Estos dispositivos imitan la imagen de un cigarrillo convencional, ver figura 2.2

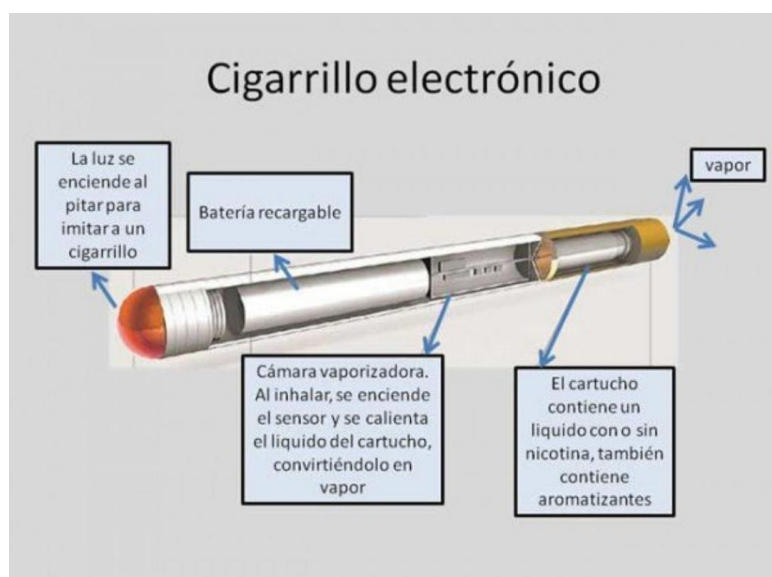


Figura 2.2. Estructura de un cigarrillo electrónico (Consumoteca, 2016)

Estos componentes tienen diferentes efectos sobre la salud, como bien se recogen en la tabla 2.1. (Martin-Cantera y Fernández, 2020).

Componente	Efecto sobre la salud
Nicotina	Adicción Efectos cardiovasculares (aumento de frecuencia cardíaca y presión arterial)
Disolventes Propilenglicol Glicerina vegetal Productos por degradación térmica (Acetaldehído, formaldehído, acroleína)	Irritante de mucosas y árbol respiratorio Neumonía lipoidea Cancerígeno
Productos oxidantes	Enfermedad cardiovascular
Partículas y metales (cadmio, níquel, cromo)	Toxicidad pulmonar Cancerígeno
Aromatizantes Nitrosaminas Diacetilo, acetil propionilo y acetoina	Cancerígeno Lesiones pulmonares, bronquiolitis obliterantes

Tabla 2.1: Efectos sobre la salud de los principales componentes de los cigarrillos electrónicos (Martin-Cantera y Fernández, 2020)

2.3.1 Nicotina

Los cigarrillos electrónicos se promocionan como una alternativa más segura al tabaco tradicional porque no se fuman y contienen menos sustancias tóxicas y cancerígenas. Sin embargo, no están completamente libres de riesgos.

La nicotina, que se encuentra en muchos cigarrillos electrónicos, es una droga adictiva que estimula el sistema de recompensa del cerebro. Esto puede llevar a la dependencia y al tabaquismo. La nicotina también tiene efectos perjudiciales en varios

sistemas del cuerpo, como los sistemas nervioso, endocrino y respiratorio. (Levine et al., 2011)

En términos de toxicidad aguda, la exposición a grandes cantidades de nicotina, ya sea de cigarrillos electrónicos u otras fuentes, puede ser peligrosa. Puede causar síntomas como náuseas, vómitos, dolor abdominal, aumento de la presión arterial, latidos cardíacos acelerados y convulsiones. Sin embargo, estos casos a menudo están relacionados con la ingestión accidental o la exposición a altas concentraciones de nicotina, como los líquidos concentrados que se usan en los cigarrillos electrónicos.

En cuanto a los efectos a largo plazo de la exposición crónica a la nicotina, se ha sugerido que podría haber una asociación con problemas de salud como trastornos cardiovasculares y daño pulmonar. Sin embargo, la investigación en este campo aún está en curso y no se ha establecido una relación causal definitiva. (Jiménez Ruiz et al., 2022).

2.3.2 Propilenglicol y glicerina

Tanto el propilenglicol como la glicerina, utilizados en los líquidos de los cigarrillos electrónicos, pueden producir aldehídos potencialmente dañinos cuando se calientan. Aunque la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) considera que son seguros para el consumo oral. (Martin-Cantera y Fernández, 2020).

El propilenglicol: o propano 1,2, diol es un disolvente eficaz para muchas sustancias químicas orgánicas insolubles en agua. Se utiliza como aditivo alimentario, anticongelante y para crear humo artificial. La glicerina o propano 1,2,3 triol es un triol similar al propilenglicol y también se utiliza en diversas aplicaciones debido a sus características similares. (Revista del Comité Científico de la AECOSAN N°24, 2016).

En los cigarrillos electrónicos, la nicotina y los saborizantes se disuelven en propilenglicol y glicerina, como hemos mencionado anteriormente, para ser transportados hasta los pulmones (Breland et al., 2017). Cuando el “e-liquid” contiene

una mayor proporción de propilenglicol tiene un mejor sabor además de producir un aerosol con más cantidad de nicotina en comparación a los líquidos formulados con abundante glicerina, los cuales darán lugar a un vapor más denso. (Kosmider et al., 2014).

2.3.3 Saborizantes

En 2014, el uso de estos dispositivos aún no estaba muy extendido en España, el empleo de estos dispositivos tan sólo predominaba entre la población joven y fumadora. (Lidón-Moyano et al., 2016). Sin embargo, desde entonces se ha producido un notable aumento de su consumo. Este incremento se debe, en parte, al uso de saborizantes que crean una falsa sensación de seguridad, la población subestima los riesgos del cigarrillo electrónico porque las oleorresinas dejan un agradable sabor de boca. Además, los usuarios pueden elegir entre una amplia variedad de sabores, que incluyen menta, fruta, canela e incluso sabor a tabaco. (Mariana Usuga, 2005)

Estos sabores a elegir también se combinan con aditivos que se utilizan para reducir la irritación en la boca y la garganta al inhalar el vapor de los cigarrillos electrónicos (Jimenez Ruiz et al., 2014). Es importante señalar que los aromas son de uso común en la industria alimentaria y cosmética, pero no se ha establecido una regulación específica en cuanto a su seguridad y concentración para ser inhalados. (Allen et al., 2016).

Esta forma "divertida" de consumir nicotina a través de los cigarrillos electrónicos puede ocultar la dependencia que se puede desarrollar hacia algunos componentes de estos dispositivos (Mariana Usuga, 2005). Un hecho que no debe de subestimarse.

2.3.3 Toxicidad

Anteriormente hemos mencionado que el cigarrillo electrónico se comercializa como una forma más segura de consumo de tabaco a pesar de contener sustancias tóxicas, adictivas y potencialmente cancerígenas.

Un estudio realizado en 2018 analizó la calidad del semen de ratas tras haber sido expuesto al líquido de recarga. Los resultados que obtuvieron demostraron que el líquido repercute negativamente a la salud reproductiva puesto que el número de espermatozoides descendió, al igual que la vitalidad y en cuanto a la morfología, la anomalía más frecuente afectaba al flagelo. (Rahali et al., 2018)

La mayoría de los estudios se centran en la repercusión de la nicotina, porque su principal metabolito, la cotinina, inhibe la espermatogénesis, pero también existen “e-liquid” que carecen de ésta y aun así el número de espermatozoides se ha visto reducido. El posible causante de este fenómeno podría ser el propilenglicol. (Lemazurier et al., 2005).

Siguiendo con el estudio de Rahali y colaboradores (2018), vemos el estrés oxidativo que causa el líquido de recarga en el epidídimo (Tabla 2.2). Los espermatozoides portan enzimas antioxidantes como el superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), o glutathione S-transferasa (GST) que lo protegen de un aumento de O_2^- , principal especie de las ROS. (Carvajal Carvajal, 2019; Nicolich et al., 2013) . Si en un análisis vemos cómo la concentración de estas enzimas aumenta, podemos determinar que dicha situación ha aumentado el estrés oxidativo. Comparando el tratamiento con líquido con y sin nicotina observamos que el “E-liquid 0%” produce más estrés oxidativo que el que contiene nicotina.

	Control	E-Liquid 0%	E-Liquid
SOD (nmol/min/mg pr)	0.138 ± 0.059	0.363 ± 0.057*. ^{###}	0.113 ± 0.047
CAT (U/mg pr)	0.021 ± 0.001	0.027 ± 0.001*. ^{###}	0.014 ± 0.002*
GST (nmol/min/mg pr)	2.930 ± 0.371	5.520 ± 1.289***. ^{##}	0.727 ± 0.116**
SH (mM)	0.004 ± 0.007	0.012 ± 0.002*. ^{##}	0.005 ± 0.001
MDA (nmol/min/mg pr)	0.229 ± 0.027	0.390 ± 0.054*	0.290 ± 0.058

Tabla 2.2 Effects of e-liquids on the oxidative status of the epididymis. (Rahali et al., 2018)

2.4 Parámetros de estudio

El cigarrillo electrónico, más concretamente la exposición al vapor procedente del E-Liquid, induce la muerte celular y provoca daños en el ADN, altera el equilibrio de

oxidación/reducción, afectando así a la organización de la membrana lipídica e induciendo la apoptosis (Bourke et al., 2017)

2.4.1. Vitalidad espermática

En una clínica de fertilidad o cualquier laboratorio de análisis, una de las pruebas que se realizan habitualmente en el análisis del semen es la evaluación de la vitalidad. La prueba consiste en examinar una muestra mediante microscopía óptica para determinar cuánto espermatozoides están vivos y cuantos están muertos. La OMS determina que más del 58% de los espermatozoides deben estar vivos para considerarse fértil.

El método de evaluación por excelencia es la tinción con eosina-nigrosina, descrita por Bloom en 1950. Esta técnica de tinción, se basa en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática. El colorante principal es la eosina, que tiñe de rojo a los espermatozoides cuyas membranas están dañadas. Por otro lado, se usa la nigrosina como colorante de contraste. De esta forma podemos diferenciar visualmente los espermatozoides vivos, no teñidos, de los muertos. (Muñoz Toledo, 2008)

2.4.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

En el organismo, se encuentran de manera natural las especies reactivas de oxígeno que tienen funciones fisiológicas esenciales como son el proceso de maduración y fertilización de los espermatozoides. Si bien, cuando estas ROS superan el nivel fisiológico y los antioxidantes no son capaces de contrarrestar su efecto, se genera un estado de estrés oxidativo en la célula. (Dutta et al., 2019).

Los espermatozoides son particularmente sensibles a los desbalances del estado de reducción/oxidación, es decir, son susceptibles al aumento de las ROS puesto que afectan a la membrana lipídica que los rodea, produciendo una degradación oxidativa de los lípidos. A su vez, la presencia de un electrón desapareado puede alterar el equilibrio electrónico en el ADN, lo que puede provocar un daño en su estructura. (du Plessis et al., 2010; Ortega et al., 2003)

Según la investigación llevada a cabo por Agarwal y colaboradores, la presencia de ROS en el semen es una característica de hombres que presentan infertilidad ya que la capacidad reproductiva de los espermatozoides se ve comprometida. (Agarwal et al., 2006)

2.4.3. Daño de membrana

La membrana plasmática, también conocida como bicapa lipídica por la organización de los ácidos grasos que la componen, es una estructura dinámica y fluida. Su función principal es actuar de barrera física pero también desempeñan un papel fundamental en el transporte de sustancias, la transducción de señales y la generación de energía (Sonnino y Prinetti, 2013)

Los espermatozoides de cerdo son particularmente vulnerables a los efectos dañinos de la peroxidación debido a la alta presencia de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana. Es probable que estos ácidos grasos poliinsaturados se utilicen como sustratos para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la membrana del espermatozoide. Como resultado, los espermatozoides de cerdo están expuestos a un mayor riesgo de estrés oxidativo y daño celular debido a la peroxidación lipídica. (Flores et al., 2009)

2.4.4. Apoptosis

El término apoptosis hace referencia a muerte celular programada, y ciertos factores como la fragmentación del ADN y niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden acelerar este proceso. (Aziz et al., 2007; Mahfouz et al., 2010).

En el estudio realizado por Aziz y colaboradores se encontró una correlación significativa entre los rasgos morfológicos de los espermatozoides analizados y la expresión de marcadores apoptóticos. Además, se observó una correlación significativa entre la motilidad de los espermatozoides y los marcadores apoptóticos. En otras palabras, los espermatozoides de baja calidad con signos de apoptosis pueden identificarse mediante microscopía óptica.

3 OBJETIVOS

El objetivo principal de esta investigación es examinar los efectos inmediatos de la inclusión del líquido de recarga de nicotina del cigarrillo electrónico en el esperma evaluando cómo esta adición afecta a los espermatozoides en un corto período de tiempo.

3.1 Objetivos específicos

- Observar el efecto de la nicotina y del “e-liquid” mediante un examen microscópico, tras la incubación durante 1 hora y 24 horas. Vitalidad y morfología.
- Determinar mediante citometría de flujo el daño de membrana celular tras la incubación durante 1 hora y 24 horas en nicotina y “e-liquid”.
- Determinar mediante citometría de flujo el daño oxidativo tras la incubación durante 1 hora y 24 horas en nicotina y “e-liquid”.
- Determinar mediante citometría de flujo el grado de fragmentación de ADN tras la incubación durante 1 hora y 24 horas en nicotina y “e-liquid”

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de la muestra

Las muestras fueron proporcionadas por Semen Cardona S.L, empresa distribuidora de semen porcino para inseminación artificial

4.2 Grupos experimentales

- Grupos control: Muestra de esperma en medio de cultivo
- Grupos 5N 1h: Muestra de esperma en medio de cultivo con nicotina pura
- Grupos 10N 1h: Muestra de esperma en medio de cultivo con nicotina pura
- Grupos 5N 24 h: Muestra de esperma en medio de cultivo con nicotina pura

- Grupos 10N 24h: Muestra de esperma en medio de cultivo con nicotina pura
- Grupos 5e 1h: Muestra de esperma en medio de cultivo con líquido de recarga
- Grupos 10e 1h: Muestra de esperma en medio de cultivo con líquido de recarga
- Grupos 5e 24 h: Muestra de esperma en medio de cultivo con líquido de recarga
- Grupos 10e 24h: Muestra de esperma en medio de cultivo con líquido de recarga

	Grupos		Muestra	Medio	nicotina pura	E.Liquid
1h	Control		1.5 ml	1ml	-	-
	Nicotina	5	1.5 ml	1ml	8 μ L	-
		10	1.5 ml	1ml	16 μ L	-
	C. electrónico	5	1.5 ml	1ml	-	3 μ L
		10	1.5 ml	1ml	-	6 μ L
24h	Control		1.5 ml	1ml	-	-
	Nicotina	5	1.5 ml	1ml	8 μ L	-
		10	1.5 ml	1ml	16 μ L	-
	C. electrónico	5	1.5 ml	1ml	-	3 μ L
		10	1.5 ml	1ml	-	6 μ L

Tabla 4.3. Volúmenes de muestras y reactivos

4.3 Preparación de las muestras

El protocolo para la realización del experimento es igual para todos los grupos experimentales. Por cada grupo se realizaron dos réplicas.

Las concentraciones de nicotina pura y líquido de cigarrillo electrónico fueron 5mM y 10mM para comparar las diferencias entre un fumador esporádico y un fumador habitual.

A continuación, se expone mediante un esquema la metodología. Figura 4.3

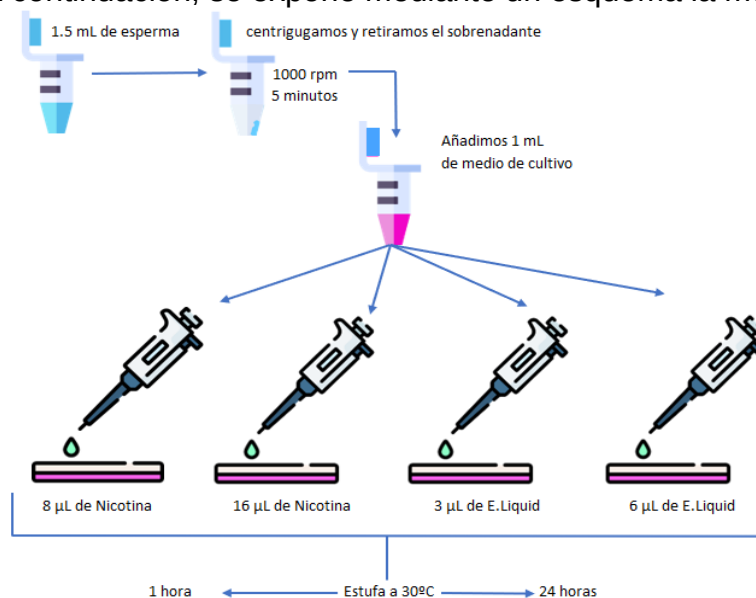


Figura 4.3. Metodología de preparación de las muestras. (Elaboración propia)

Tras la preparación, a cada grupo experimental se le realizan diferentes procedimientos para evaluar la vitalidad, el daño de membrana, la producción de especies reactivas de oxígeno y el grado de apoptosis. Todo ello tras una hora y después de veinticuatro horas incubando con el tratamiento.

4.3.1 Preparación de los reactivos

- Merocianina 540(MC540): se preparó una solución madre de 1 mg/ml de MC540 en etanol al 50%. Un total de 30 ml, como la solución madre tiene una vida media de 20 días, primero se prepararon 15 ml y una vez agotados se prepararon otros 15 ml.

Una vez preparadas se cubrían con papel de aluminio para evitar la formación de artefactos debido a la exposición a la luz.

- Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA): La solución madre se diluyó en PBS hasta una concentración final de 2.5 μ M. Al igual que la merocianina, se cubrió la solución con papel de aluminio para evitar la formación de artefactos debido a la exposición a la luz.

- Yoduro de propidio: la solución madre se encontraba a una concentración de 100 μ g/ml.

4.4 Análisis microscópico

4.4.1 Vitalidad espermática

Mediante el análisis microscópico analizamos la vitalidad espermática usando el método de la tinción con eosina-nigrosina.

Para la realización de esta prueba:

1. Centrifugamos 1000 μ L de muestra para eliminar el medio de cultivo con el tratamiento.
2. Resuspendemos las muestras con 500 μ L de PBS

3. Se añadieron volúmenes iguales de muestra y colorantes, extrajimos 50 μL de muestra, a los que les añadimos 50 μL de eosina-nigrosina, y se mezclaron en un eppendorf.
4. Tras 30 segundos de espera, se tomaron 12 μL de la mezcla
5. Se realizó una extensión sobre un portaobjetos, tras el secado se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio.
6. Se observó la vitalidad de al menos 100 espermatozoides en cada uno de los grupos control y experimentales.

4.5 Análisis mediante citómetro de flujo

4.5.1 Daño de membrana

Esta prueba se realiza mediante citometría de flujo.

El fluorocromo Merocianina 540 es capaz de unirse a las membranas plasmáticas dañadas, aquellas que presentan un alto desorden lipídico.

Para la realización de esta prueba:

1. Centrifugamos 500 μL de muestra para eliminar el medio de cultivo con el tratamiento.
2. Añadimos 100 μL de PBS tres veces para lavar las muestras.
3. Una vez preparadas, resuspendemos con 500 μL de PBS y añadimos 200 μL de la preparación de merocianina.
4. Cubrimos todos los eppendorf con papel aluminio hasta su posterior análisis, ya que la merocianina es fotosensible.

La prueba se realizó en todos los grupos control y experimentales

4.5.2 Especies reactivas de oxígeno

Al igual que la prueba anterior, se realizó por citometría de flujo.

El 2'-7'-diclorofluoresceína es un indicador de la formación de especies reactivas de oxígeno por su oxidación a un compuesto verde por la presencia de H_2O_2 .

Para la realización de esta prueba:

1. Centrifugamos 500 μ L de muestra para eliminar el medio de cultivo con el tratamiento.
2. Añadimos 100 μ L de PBS tres veces para lavar las muestras.
3. Una vez preparadas, resuspendemos con 500 μ L de PBS y añadimos 500 μ L de la preparación de 2'-7'-diclorofluoresceína.
4. Cubrimos todos los eppendorf con papel aluminio hasta su posterior análisis, ya que el 2'-7'-diclorofluoresceína es fotosensible.

La prueba se realizó en todos los grupos control y experimentales

4.5.3 Grado de Apoptosis

El yoduro de propidio (PI), junto con la anexina son ampliamente utilizados para la determinación del grado de apoptosis a través de la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática.

Para la realización de esta prueba:

1. Centrifugamos 500 μ L de muestra a 1000rpm 5 minutos, para eliminar el medio de cultivo con el tratamiento.
2. Añadimos 100 μ L de PBS frío para lavar las muestras.
3. Mientras las muestras centrifugan con el PBS, preparamos el tampón de unión a la anexina a una concentración de 1X
4. Retiramos el sobrenadante y añadimos 1 mL del tampón de unión a la anexina. Volvemos a centrifugar.
5. Retiramos el sobrenadante y resuspendemos el pellet con 100 μ L de PBS.
6. Añadimos 5 μ L de anexina y 1 μ L de la solución de PI (5 μ L de PI y 45 μ L de tampón de unión a la anexina 1X)
7. Incubamos las muestras a temperatura ambiente y en oscuridad 15 minutos
8. Pasado el tiempo de incubación añadimos 400 μ L del tampón de unión a la anexina y medimos en el citómetro de flujo.

La prueba se realizó en todos los grupos control y experimentales

4.5 Análisis estadísticos

El análisis de datos se efectuó en Microsoft Excel y Statgraphics, donde se realizó un análisis de medias y una prueba T de student para muestras independientes.

Consideramos que existen diferencias significativas cuando el valor de P es inferior a 0.05.

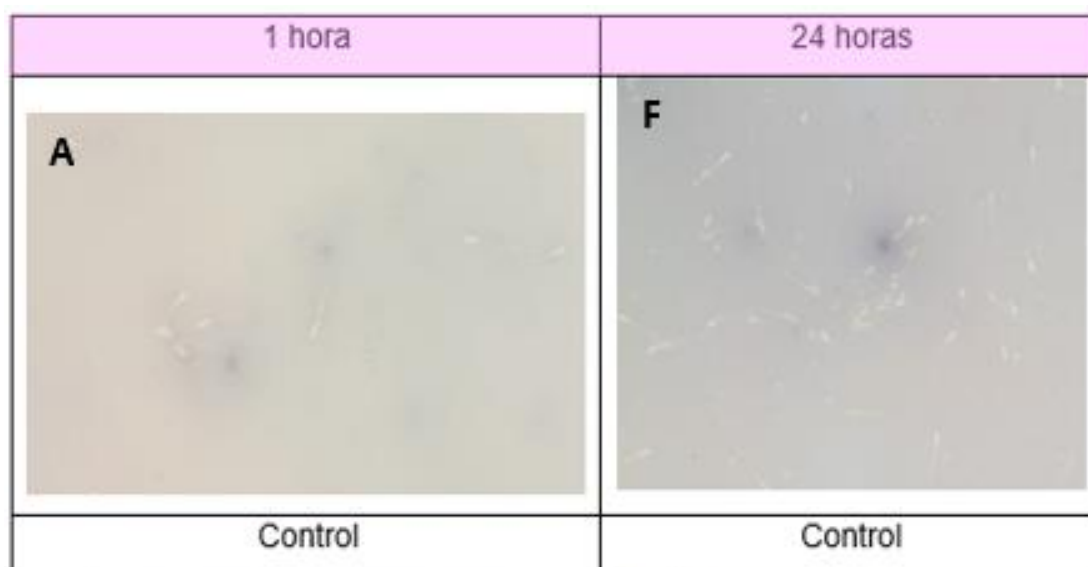
5 RESULTADOS

Nomenclatura utilizada en las gráficas:

- “C”, control
- “5e”, E-Liquid a 5mM
- “10e”, E-Liquid a 10mM
- “5N”, Nicotina a 5mM
- “10N”, Nicotina a 10 mM

5.1 Resultados de vitalidad espermática

Se hizo un recuento de 100 espermatozoides en diferentes campos de visión mediante microscopio óptico con el objetivo de 10x y 40x.



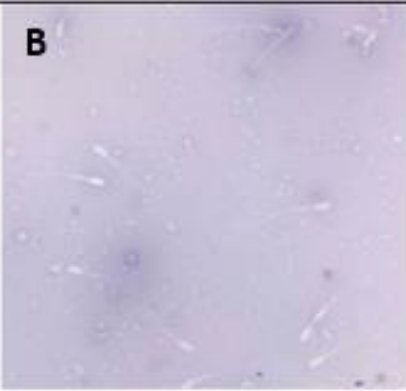
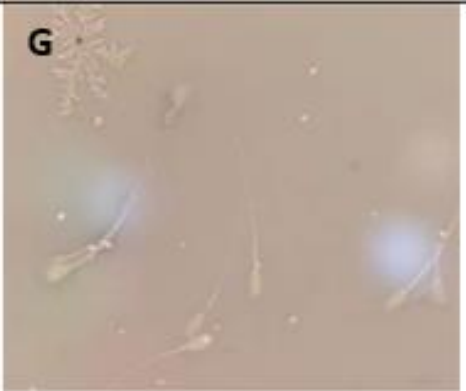
	
E. liquid 5mM	E. liquid 5mM
	
E. liquid 10mM	E. liquid 10mM
	
Nicotina 5mM	Nicotina 5mM
	
Nicotina 10mM	Nicotina 10mM

Tabla 5.4: Tinciones con eosina-nigrosina para la evaluación de la vitalidad en los diferentes grupos experimentales

En estas imágenes, especialmente en la imagen C (E. liquid 10 mM) pueden observarse espermatozoides vivos, los cuales no están teñidos puesto que su membrana está intacta (ejemplo señalado con un círculo en blanco) y espermatozoides muertos, teñidos de color rojo (ejemplo señalado con un círculo en rojo).

Mediante las siguientes gráficas, que recogen la media de los datos de vitalidad en los diferentes grupos experimentales, Figura 5.3 y Figura 5.4, podemos observar que cuanto mayor es la concentración de nicotina más se ve afectada la vitalidad. De la misma forma, el tiempo de exposición también juega un papel fundamental, a mayor número de horas con el tratamiento y a mayor concentración más se reduce la vitalidad espermática.

	5e	10e	5N	10N
1 h	0.0215079	0.00790526	0.0389255	0.022544
24 h	0.00405681	0.00599758	0.00269324	0.00207598

Tabla 5.5: Resultados del valor de P del análisis de t de student para la evaluación de la vitalidad en los diferentes grupos experimentales.

Los resultados obtenidos tras el análisis estadístico con Statgraphics, tienen un valor de P inferior a 0.05, es decir, todos los datos muestran diferencias significativas.

Los datos muestran que tanto el líquido de recarga como la nicotina pura afectan significativamente a la vitalidad del espermatozoide independientemente del tiempo de exposición.

En las figuras 5.4 y 5.5 se puede apreciar una representación gráfica de los datos obtenidos en el estudio de la vitalidad.

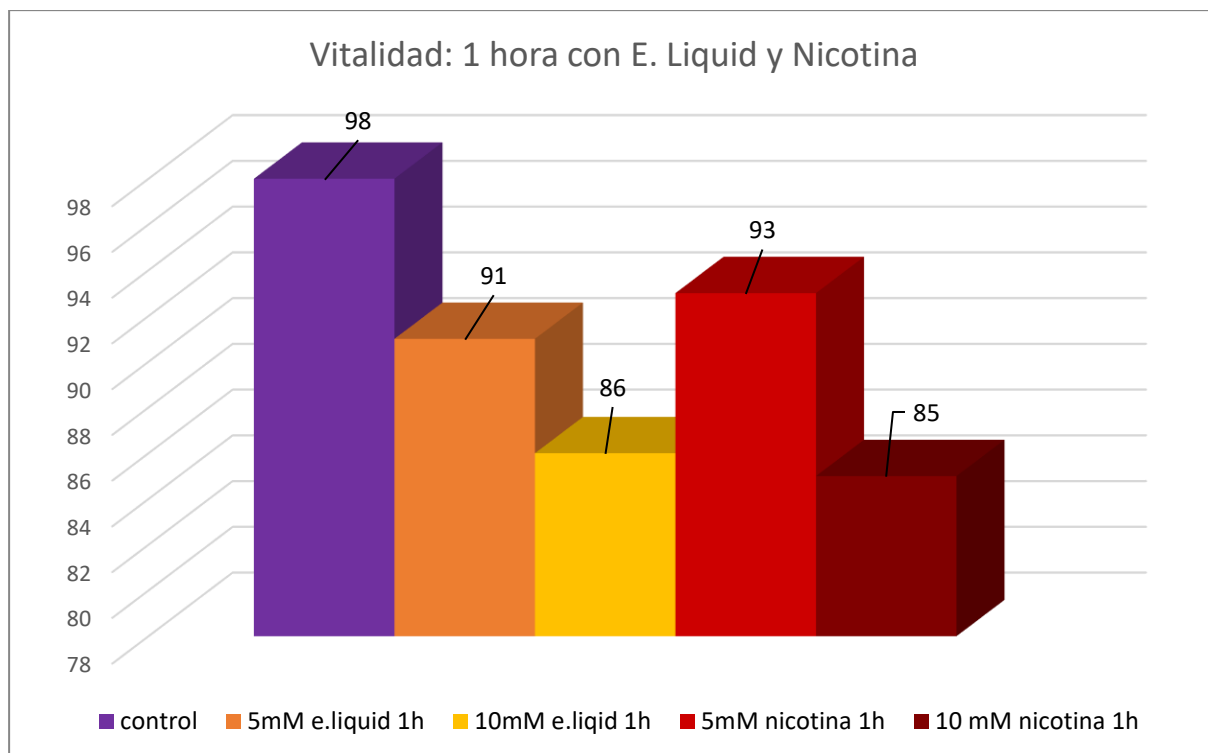


Figura 5.4: Porcentaje de vitalidad en los distintos grupos experimentales tras una hora con el tratamiento

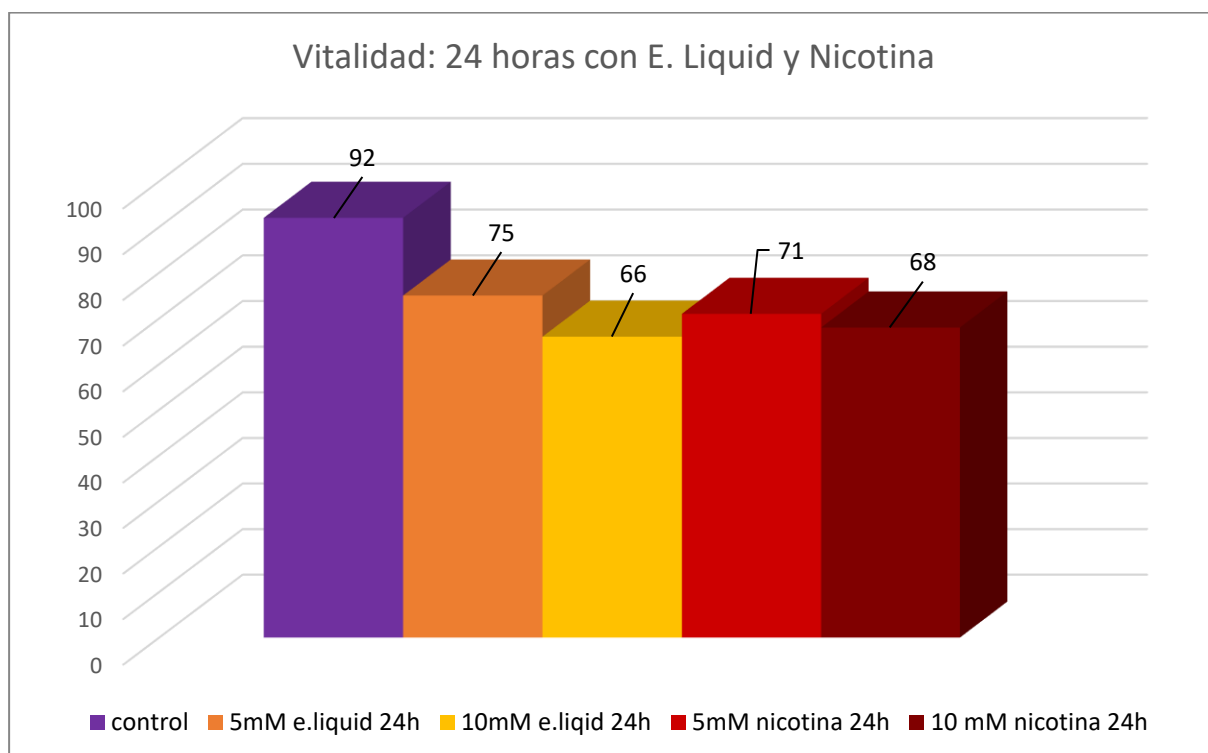


Figura 5.5: Porcentaje de vitalidad en los distintos grupos experimentales tras veinticuatro horas con el tratamiento

5.2 Resultados de daño de membrana

Los resultados obtenidos por citometría de flujo muestran el daño que causa el E-Liquid y la nicotina a la membrana plasmática tras diferentes horas de incubación (1 hora y 24 horas) con distintas concentraciones (5mM y 10mM). Véase las figuras 5.6 y 5.7

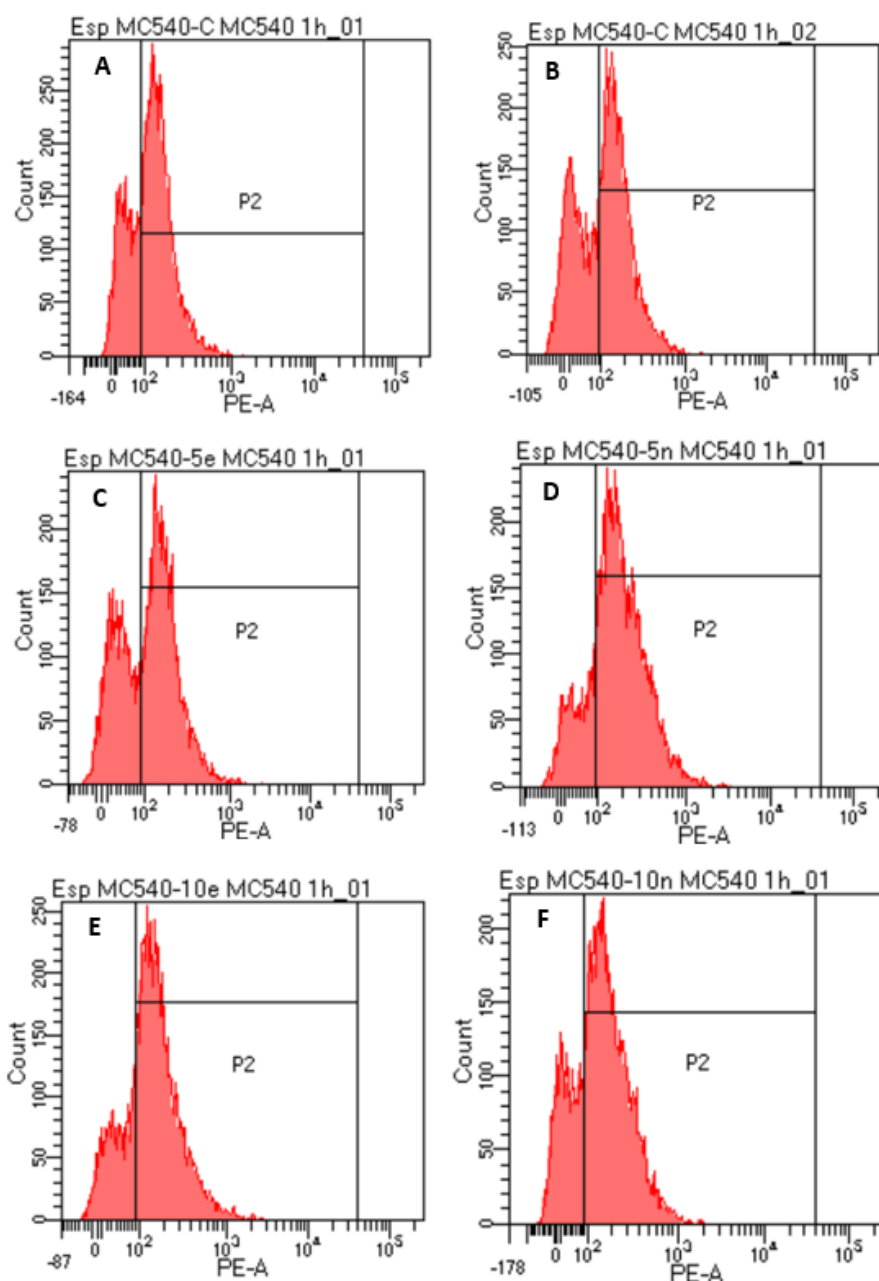


Figura 5.6. Efecto en la membrana plasmática del espermatozoide en los grupos control (imagen A, imagen B) y de los grupos con E- liquid (imagen C, imagen E) y nicotina (imagen D, imagen F) a una concentración de 5mM (imagen E, imagen F) y 10mM (imagen E, imagen F) tras una hora de incubación.

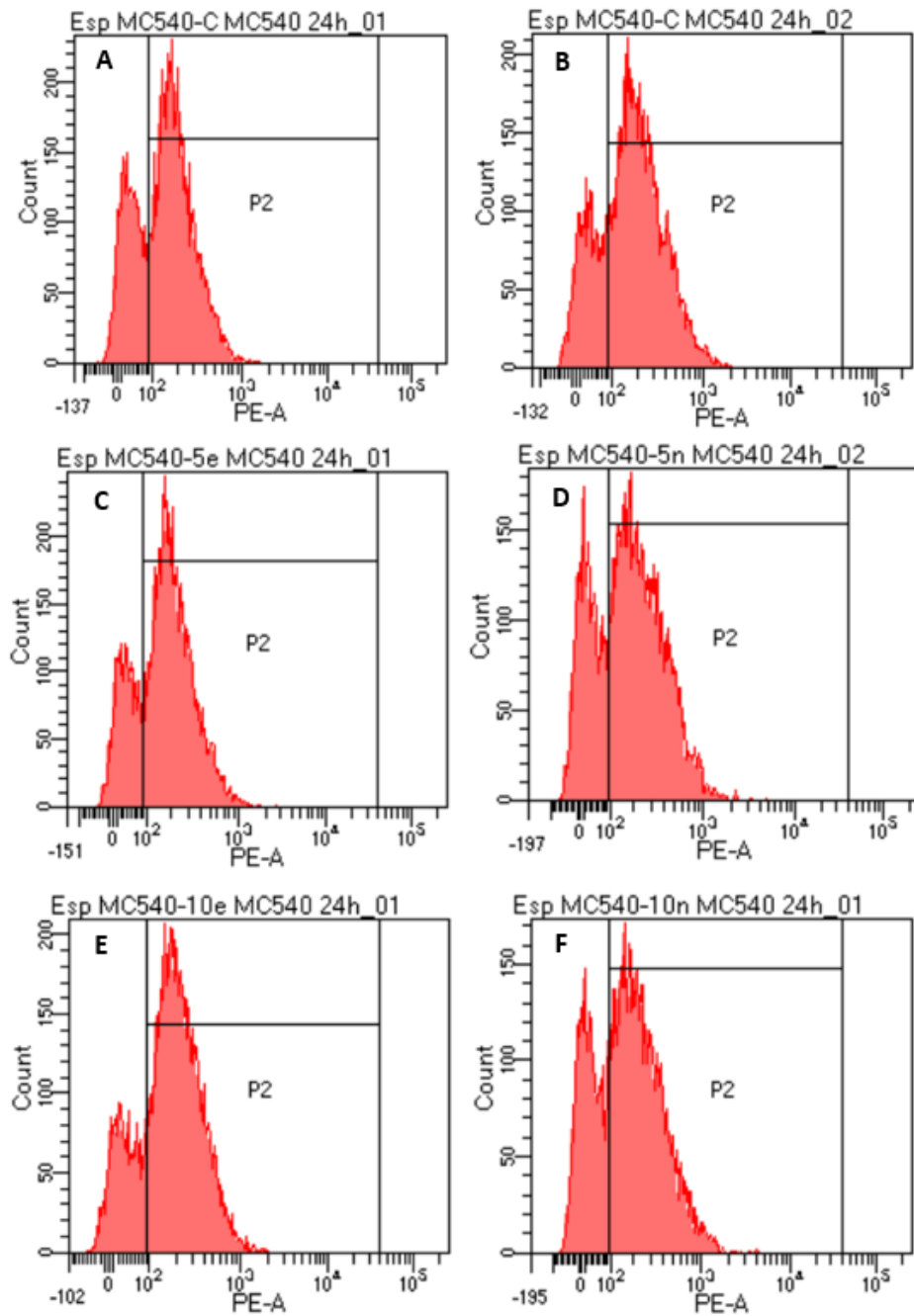


Figura 5.7. Efecto en la membrana plasmática del espermatozoide en los grupos control (imagen A, imagen B) y de los grupos con E- liquid (imagen C, imagen E) y nicotina (imagen D, imagen F) a una concentración de 5mM (imagen E, imagen F) y 10mM (imagen E, imagen F) tras veinticuatro horas de incubación.

	5e	10e	5N	10N
1 h	0.156905	0.137157	0.0474972	0.423249
24 h	0.306814	0.258801	0.92146	0.416943

Tabla 5.6: Resultados del valor de P del análisis de t de student para la evaluación del daño de membrana en los diferentes grupos experimentales.

Los resultados obtenidos tras el análisis no muestran diferencias significativas, exceptuando el grupo experimental con 5mM de nicotina de una hora.

Por lo que no podemos determinar que el uso del líquido de recarga y el de nicotina pura, afecten significativamente a la membrana plasmática a corto plazo. Habría que seguir estudiando si tras un periodo más largo de exposición estas sustancias podrían causar deterioro.

		1 h		24 h	
		MC540			
control 1		57.3	control 1		66
control 2		54.6	control 2		71
E.Liquid	5	59.3	5	71.3	
	5	63.3	5	72.8	
	10	70.8	10	74.2	
	10	62.4	10	71.6	
Nicotina	5	76.3	5	69.2	
	5	69.2	5	67.2	
	10	67.4	10	65.7	
	10	56.1	10	66.2	

Tabla 5.7. Resultados del análisis con Merocianina 540 para la evaluación del daño de membrana

Los datos reflejados en la tabla 5.7 son el resumen de las figuras 5.3 y 5.4. Esta información refleja que incluso en los grupos control, que no llevan tratamiento, se han

producido daños en la membrana, esto es debido a que el fluorocromo merocianina fue diluido en etanol, compuesto perjudicial para la membrana.

5.4 Resultados de especies reactivas de oxígeno

Los resultados obtenidos por citometría de flujo muestran la producción que causa el E-Liquid y la nicotina de especies reactivas de oxígeno tras diferentes horas de incubación (1 hora y 24 horas) con distintas concentraciones (5mM y 10mM). Véase las figuras 5.8 y 5.9

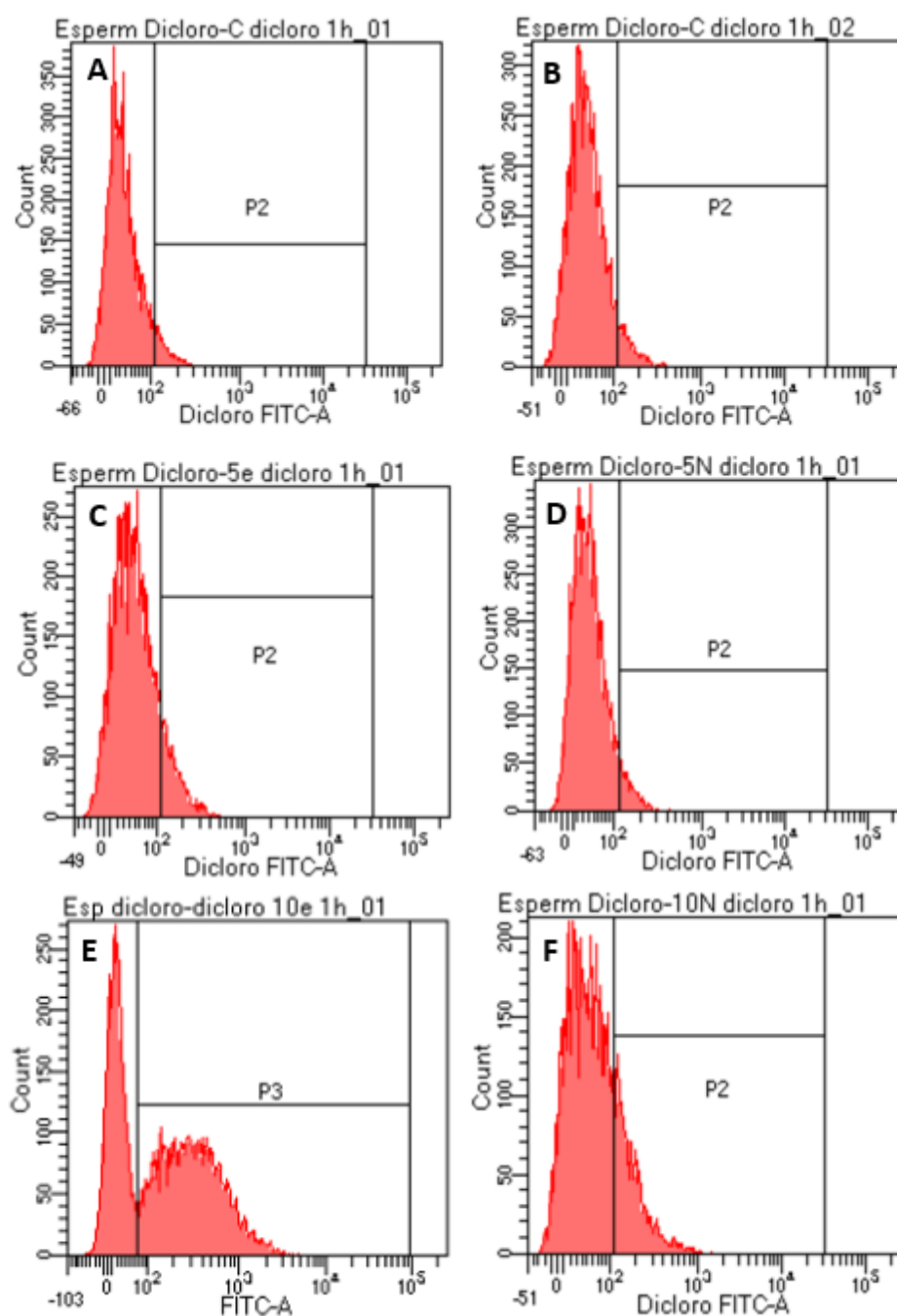


Figura 5.8. Efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno en los grupos control (imagen A, imagen B) y de los grupos con E- liquid (imagen C, imagen E) y nicotina (imagen D, imagen F) a una concentración de 5mM (imagen E, imagen F) y 10mM (imagen E, imagen F) tras una hora de incubación.

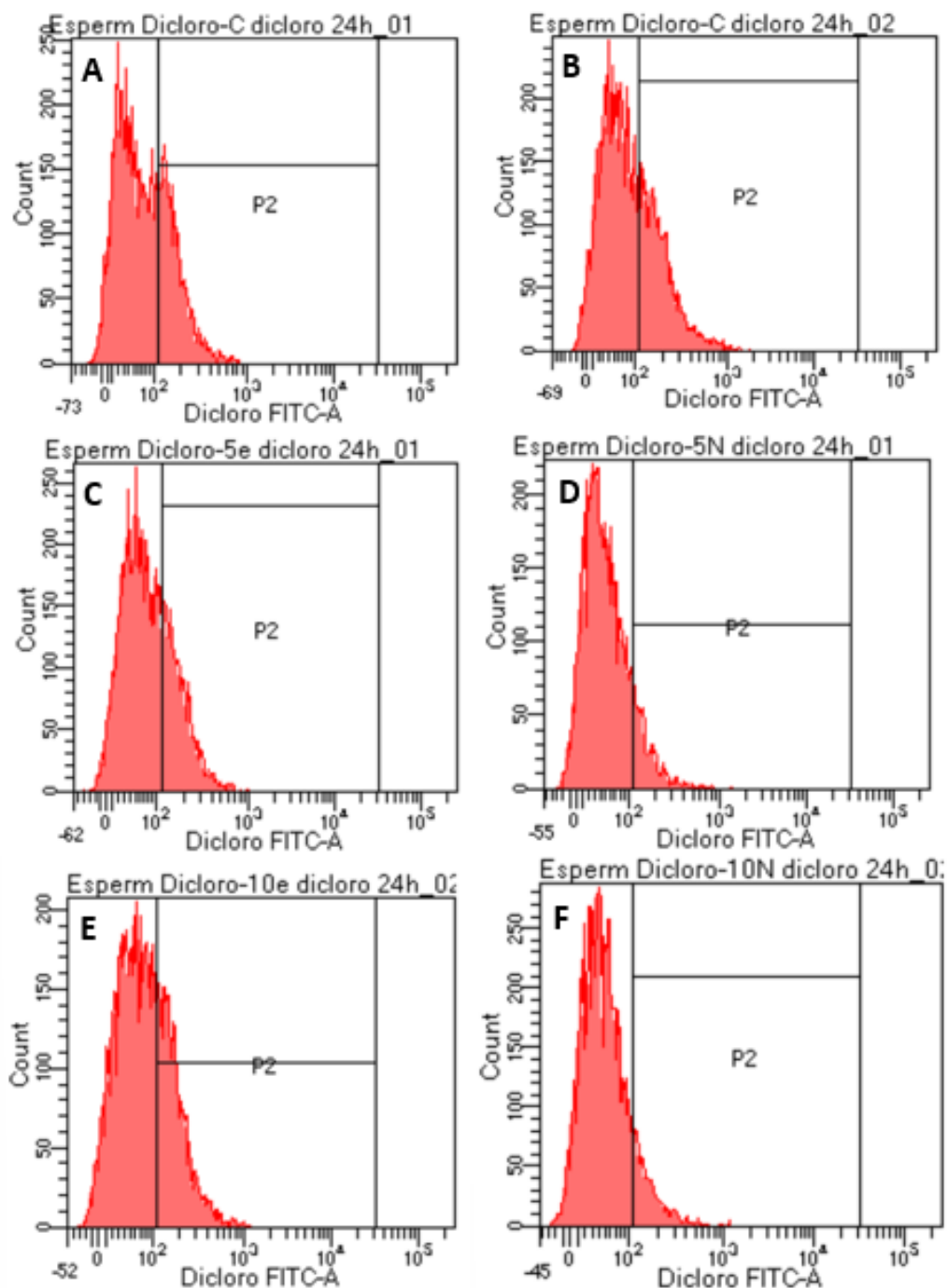


Figura 5.9. Efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno en los grupos control (imagen A, imagen B) y de los grupos con E- liquid (imagen C, imagen E) y nicotina (imagen D, imagen F) a una concentración de 5mM (imagen E, imagen F) y 10mM (imagen E, imagen F) tras veinticuatro horas de incubación.

	5e	10e	5N	10N
1 h	0.00712986	0.0106422	0.317682	0.0489035
24 h	0.0559756	0.0151913	0.0127911	0.0729495

Tabla 5.8: Resultados del valor de P del análisis de t de student para la evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno en los diferentes grupos experimentales.

Los resultados obtenidos tras el análisis muestran diferencias significativas en los grupos tratados con el E-Liquid tras una hora de tratamiento y tras un día completo, excepto en el grupo 5mM de 24 horas. Estos datos sugieren que los componentes del líquido de recarga, entre los que se encuentra la nicotina, alteran el sistema antioxidante celular haciendo que los niveles de ROS aumenten significativamente.

		1 h		24 h
		DCFH-DA		
	control 1	4.9	control 1	28.8
	control 2	5.5	control 2	24.8
E.Liquid	5	10.2	5	25.7
	5	13.3	5	24.6
	10	59	10	40.1
	10	50.6	10	27.6
Nicotina	5	5.9	5	8.9
	5	10.1	5	9.4
	10	17.6	10	17
	10	13	10	10.8

Tabla 5.9. Resultados del análisis con 2',7'-diclorofluoresceína para la evaluación de especies reactivas de oxígeno

Los datos reflejados en la tabla 5.9 son el resumen de las figuras 5.8 y 5.9. Los resultados muestran que un incremento en la concentración de nicotina genera un incremento en la producción de ROS y, además, los efectos son más notorios a corto plazo.

5.5 Resultados del grado de apoptosis

Los resultados obtenidos por citometría de flujo muestran el grado de apoptosis que causa el E-Liquid y la nicotina tras diferentes horas de incubación (1 hora y 24 horas) con distintas concentraciones (5mM y 10mM). Véase las figuras 5.10 y 5.11

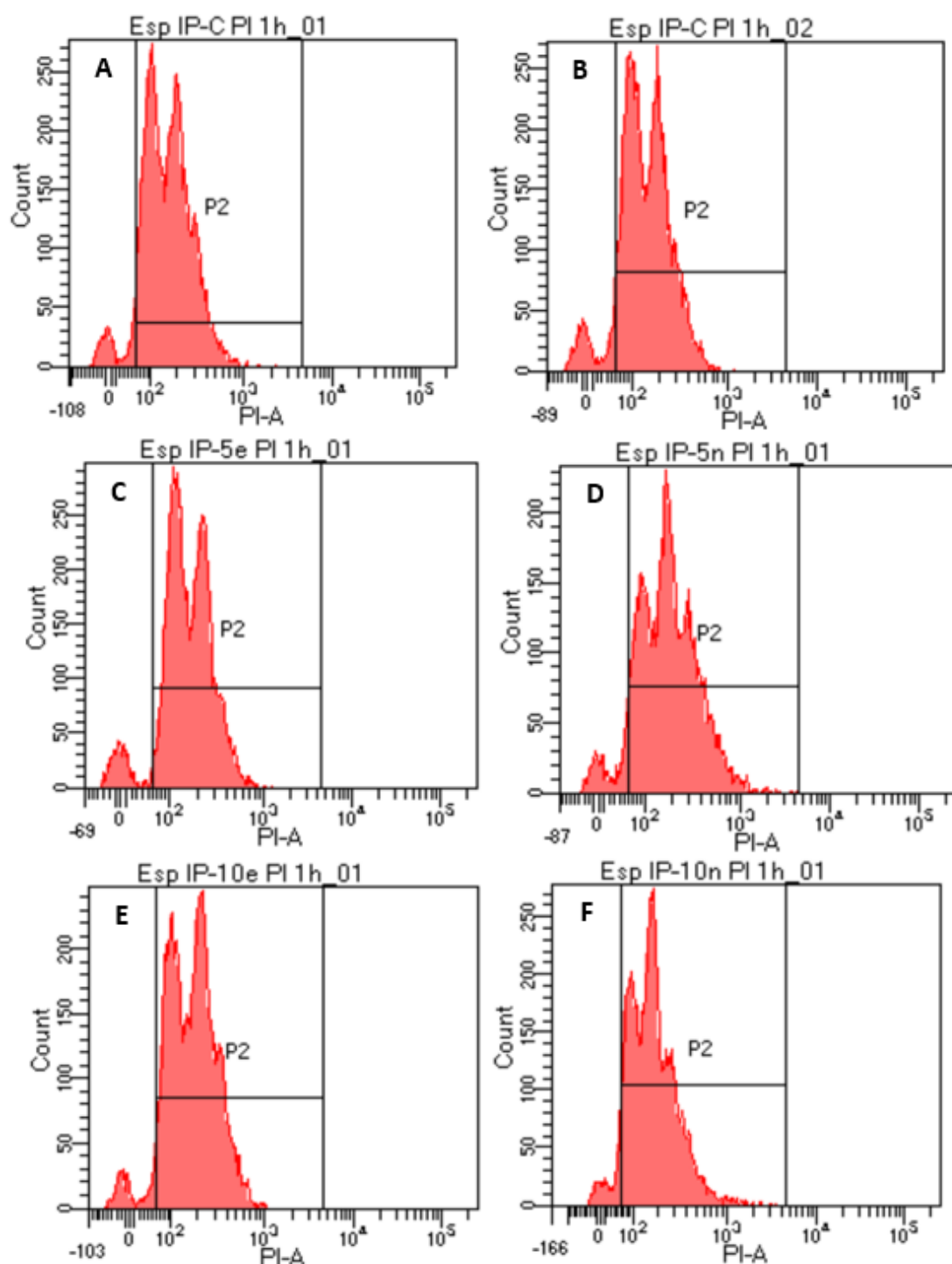


Figura 5.10. Efecto en la inducción de la apoptosis en los grupos control (imagen A, imagen B) y de los grupos con E- liquid (imagen C, imagen E) y nicotina (imagen D, imagen F) a una concentración de 5mM (imagen E, imagen F) y 10mM (imagen E, imagen F) tras una hora de incubación

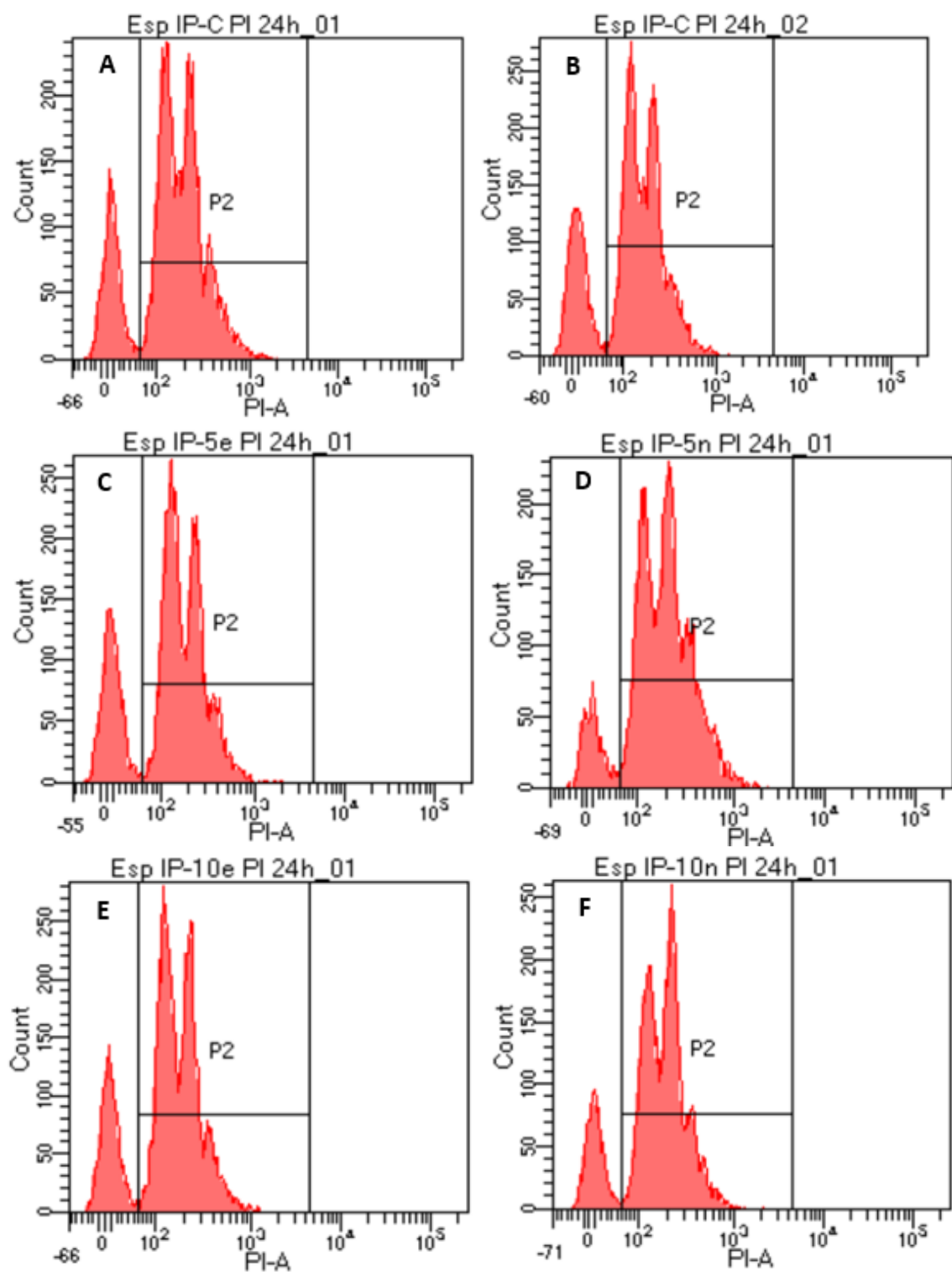


Figura 5.11. Efecto en la inducción de la apoptosis en los grupos control (imagen A, imagen B) y de los grupos con E- liquid (imagen C, imagen E) y nicotina (imagen D, imagen F) a una concentración de 5mM (imagen E, imagen F) y 10mM (imagen E, imagen F) tras veinticuatro horas de incubación

	5e	10e	5N	10N
1 h	0.107596	0.923127	0.724475	0.36422
24 h	0.590274	0.530488	0.276142	0.117991

Tabla 5.10: Resultados del valor de P del análisis de t de student para la evaluación del grado de apoptosis en los diferentes grupos experimentales.

Los resultados obtenidos tras el análisis no muestran diferencias significativas, no podemos determinar que el uso del E-liquid con nicotina tenga un efecto apoptótico.

		1 h	24 h
		P.I	
E.Liquid	control 1	90.3	control 1 79.4
	control 2	88.5	control 2 75.9
	5	91.8	5 75.5
	5	92.9	5 77.3
	10	91.7	10 78.6
	10	86.5	10 79.4
Nicotina	5	89.6	5 88
	5	88.3	5 89.3
	10	90	10 83
	10	95.1	10 87.6

Tabla 5.11. Resultados del análisis con yoduro de propidio y anexina para la evaluación del grado de apoptosis.

Los datos reflejados en la tabla 5.11 son el resumen de las figuras 5.10 y 5.11. Con esta información podemos determinar que el líquido de recarga no tiene un efecto apoptótico a corto plazo. Deberíamos seguir estudiando si este compuesto induce la muerte celular tras un número mayor de horas de exposición.

6 DISCUSIÓN

En este estudio, evaluamos *in vitro* cómo el líquido del cigarrillo electrónico, conocido como E.Liquid, afecta las muestras de semen porcino en comparación con la nicotina pura, utilizando un entorno de laboratorio.

Los resultados mostraron que los componentes del líquido del cigarrillo electrónico afectaron la viabilidad inicial de las muestras, independientemente de la concentración de nicotina utilizada (5 mM o 10 mM). Se sabe que la nicotina inhibe la producción de testosterona, una hormona esencial en la formación de espermatozoides, lo que reduce su producción y maduración. (El Golli et al., 2016)

Además, se conoce que la nicotina aumenta la generación de radicales libres de oxígeno al interrumpir la función de las mitocondrias, lo que provocaba estrés oxidativo. Esto puede tener consecuencias negativas en la calidad y función del esperma. (El Golli et al., 2016)

Existe controversia en cuanto a los efectos comparativos entre cigarrillos electrónicos y cigarrillos convencionales. Algunos estudios sugieren que los dispositivos electrónicos son menos dañinos que los cigarrillos convencionales, especialmente en las células del corazón, que no se vieron afectadas por el vapor del cigarrillo electrónico. (Farsalinos et al., 2013). Sin embargo, otros estudios contradicen esta conclusión y muestran que el vapor del cigarrillo electrónico puede dañar el ADN y reducir la capacidad de reparación en diferentes células estudiadas en el laboratorio. (Lee et al., 2018). Estos hallazgos resaltan la importancia de seguir investigando los efectos de los cigarrillos electrónicos en diferentes sistemas biológicos.

En cuanto a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los resultados del estudio indicaron su presencia, pero no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al daño de membrana e inducción de muerte celular en los espermatozoides, a pesar de haber mencionado que estas células son muy sensibles a los desajustes en los procesos de oxidación y reducción. Sin embargo, un estudio previo realizado por Sancilio y colaboradores, mostró la producción de ROS en células de fibroblastos gingivales después de una exposición por 24 horas a líquidos que contienen nicotina,

lo que se asoció con la apoptosis después de un período más largo, 48 horas, de exposición. (Sancilio et al., 2016) Esto sugiere que si se hubiera prolongado el tiempo de tratamiento se podrían haber obtenido resultados significativos en cuanto al daño de membrana y la presencia de espermatozoides apoptóticos.

7 CONCLUSIÓN

Los resultados de dicho estudio, permiten postular que el líquido del cigarrillo afecta de manera negativa a la viabilidad de los espermatozoides, independientemente del tiempo y la concentración de nicotina. De igual forma afecta al sistema antioxidante de la célula, produciéndose un desequilibrio en la reducción/oxidación por el aumento de las especies ROS.

Pese a lo cual, no podemos concluir que en un periodo corto de tiempo el E-liquid llegue a dañar la membrana o a inducir la apoptosis, es por ello que habría que seguir investigado para determinar si tras un período más largo de exposición esta estructura y proceso puedan verse afectados.

Sin embargo, un aspecto importante a tener en cuenta es que es un estudio *in vitro* y por tanto los resultados de los efectos del líquido del cigarrillo electrónico no son extrapolables a un entorno real.

Además, como ya hemos mencionado, existen múltiples saborizantes, y estos, así como la forma en la que se usa el cigarrillo electrónico, pueden variar a los efectos que este dispositivo causa.

8 BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13, 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>

- Agarwal, A., Sharma, R. K., Nallella, K. P., Thomas, A. J., Alvarez, J. G., & Sikka, S. C. (2006). Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 86(4), 878-885. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.111>
- Allen, J. G., Flanigan, S. S., LeBlanc, M., Vallarino, J., MacNaughton, P., Stewart, J. H., & Christiani, D. C. (2016). Flavoring Chemicals in E-Cigarettes: Diacetyl, 2,3-Pentanedione, and Acetoin in a Sample of 51 Products, Including Fruit-, Candy-, and Cocktail-Flavored E-Cigarettes. *Environmental Health Perspectives*, 124(6), 733-739. <https://doi.org/10.1289/ehp.1510185>
- Aziz, N., Said, T., Paasch, U., & Agarwal, A. (2007). The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(5), 1413-1419. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem016>
- Bourke, L., Bauld, L., Bullen, C., Cumberbatch, M., Giovannucci, E., Islami, F., McRobbie, H., Silverman, D. T., & Catto, J. W. F. (2017). E-cigarettes and Urologic Health: A Collaborative Review of Toxicology, Epidemiology, and Potential Risks. *European Urology*, 71(6), 915-923. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.12.022>
- Breland, A., Soule, E., Lopez, A., Ramôa, C., El-Hellani, A., & Eissenberg, T. (2017). Electronic cigarettes: What are they and what do they do? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1394(1), 5-30. <https://doi.org/10.1111/nyas.12977>
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.

Consumoteca. (2016, mayo 13). *Cómo funcionan los cigarrillos electrónicos*.

Consumoteca. <https://www.consumoteca.com/bienestar-y-salud/como-funcionan-los-cigarrillos-electronicos/>

Crenshaw, M. D., Tefft, M. E., Buehler, S. S., Brinkman, M. C., Clark, P. I., & Gordon, S. M. (2016). Determination of nicotine, glycerol, propylene glycol and water in electronic cigarette fluids using quantitative ^1H NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry: MRC*, 54(11), 901-904. <https://doi.org/10.1002/mrc.4498>

du Plessis, S. S., McAllister, D. A., Luu, A., Savia, J., Agarwal, A., & Lampiao, F. (2010). Effects of H_2O_2 exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. *Andrologia*, 42(3), 206-210. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.00980.x>

Dutta, S., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab Journal of Urology*, 17(2), 87-97. <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1599624>

El Golli, N., Rahali, D., Jrad-Lamine, A., Dallagi, Y., Jallouli, M., Bdiri, Y., Ba, N., Lebre, M., Rosa, J. P., El May, M., & El Fazaa, S. (2016). Impact of electronic-cigarette refill liquid on rat testis. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26(6), 427-434. <https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1163448>

Farsalinos, K. E., & Le Houezec, J. (2015). Regulation in the face of uncertainty: The evidence on electronic nicotine delivery systems (e-cigarettes). *Risk Management and Healthcare Policy*, 8, 157-167. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S62116>

Farsalinos, K. E., Romagna, G., Alliffranchini, E., Ripamonti, E., Bocchietto, E., Todeschi, S., Tsiapras, D., Kyrzopoulos, S., & Voudris, V. (2013). Comparison of the cytotoxic potential of cigarette smoke and electronic cigarette vapour

extract on cultured myocardial cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(10), 5146-5162.
<https://doi.org/10.3390/ijerph10105146>

Flores, E., Fernández-Novell, J. M., Peña, A., & Rodríguez-Gil, J. E. (2009). The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 72(6), 784-797.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.013>

Galan, I. (2019). *Controversias en salud pública riesgos y beneficios potenciales del uso de cigarrillos electrónicos*.
<https://repisalud.isciii.es/handle/20.500.12105/9039>

González Rodríguez, L. G., López Sobaler, A. M., Perea Sánchez, J. M., Ortega, R. M., González Rodríguez, L. G., López Sobaler, A. M., Perea Sánchez, J. M., & Ortega, R. M. (2018). Nutrición y fertilidad. *Nutrición Hospitalaria*, 35(SPE6), 7-10. <https://doi.org/10.20960/nh.2279>

Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C., Carson, S. A., Cisneros, P., Steinkampf, M. P., Hill, J. A., Xu, D., & Vogel, D. L. (2001). Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men. *New England Journal of Medicine*, 345(19), 1388-1393.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa003005>

Inglés, C. J., Delgado, B., Bautista, R., Torregrosa, M. S., Espada, J. P., García-Fernández, J. M., Hidalgo, M. D., & García-López, L. J. (2007). *Factores psicosociales relacionados con el consumo de alcohol y tabaco en adolescentes españoles*. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/32755>

- Jiménez González, M. (2022). *Maduración de la espermatogénesis in vitro: Preservación y tratamiento de la infertilidad masculina*.
<http://titula.universidadeuropea.com/handle/20.500.12880/2707>
- Jimenez Ruiz, C. A., Solano Reina, S., De Granda Orive, J. I., Signes-Costa Minaya, J., De Higes Martinez, E., Riesco Miranda, J. A., Altet Gómez, N., Lorza Blasco, J. J., Barrueco Ferrero, M., & De Lucas Ramos, P. (2014). El cigarrillo electrónico. Declaración oficial de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) sobre la eficacia, seguridad y regulación de los cigarrillos electrónicos. *Archivos de Bronconeumología*, 50(8), 362-367.
<https://doi.org/10.1016/j.arbres.2014.02.006>
- Jiménez Ruiz, C. A., Solano-Reina, S., de Higes-Martínez, E., Cabrera-César, E., Sandoval-Contreras, R., Granda-Orive, J. I. de, Riesco-Miranda, J. A., Signes-Costa Miñana, J., Lorza-Blasco, J. J., Martínez-Muñiz, M. Á., & Rábade-Castedo, C. (2022). Documento de posicionamiento de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) ante las estrategias de reducción del daño del tabaco. *Open Respiratory Archives*, 4(2), 100175.
<https://doi.org/10.1016/j.opresp.2022.100175>
- Kosmider, L., Sobczak, A., Fik, M., Knysak, J., Zaciera, M., Kurek, J., & Goniewicz, M. L. (2014). Carbonyl Compounds in Electronic Cigarette Vapors: Effects of Nicotine Solvent and Battery Output Voltage. *Nicotine & Tobacco Research*, 16(10), 1319-1326. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntu078>
- Lee, H.-W., Park, S.-H., Weng, M.-W., Wang, H.-T., Huang, W. C., Lepor, H., Wu, X.-R., Chen, L.-C., & Tang, M.-S. (2018). E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 115(7), E1560-E1569.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1718185115>
- Lemazurier, E., Lecomte, A., Robidel, F., & Bois, F. Y. (2005). Propylene glycol monomethyl ether. A three-generation study of isomer beta effects on reproductive and developmental parameters in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 21(1-2), 33-40. <https://doi.org/10.1191/0748233705th213oa>
- Leventhal, A. M., Strong, D. R., Kirkpatrick, M. G., Unger, J. B., Sussman, S., Riggs, N. R., Stone, M. D., Khoddam, R., Samet, J. M., & Audrain-McGovern, J. (2015). Association of Electronic Cigarette Use With Initiation of Combustible Tobacco Product Smoking in Early Adolescence. *JAMA*, 314(7), 700-707. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.8950>
- Levine, A., Huang, Y., Drisaldi, B., Griffin, E. A., Pollak, D. D., Xu, S., Yin, D., Schaffran, C., Kandel, D. B., & Kandel, E. R. (2011). Molecular mechanism for a gateway drug: Epigenetic changes initiated by nicotine prime gene expression by cocaine. *Science Translational Medicine*, 3(107), 107ra109. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003062>
- Lidón-Moyano, C., Martínez-Sánchez, J. M., Fu, M., Ballbè, M., Martín-Sánchez, J. C., & Fernández, E. (2016). Prevalencia y perfil de uso del cigarrillo electrónico en España (2014). *Gaceta Sanitaria*, 30(6), 432-437. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2016.03.010>
- Mahfouz, R. Z., du Plessis, S. S., Aziz, N., Sharma, R., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2010). Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertility and Sterility*, 93(3), 814-821. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.068>

Mariana Usuga, D. (2005). *Efectos nocivos del cigarrillo electrónico para la salud humana*.

Martin-Cantera, C., & Fernández, J. L. (2020). *CIGARRILLOS ELECTRÓNICOS*. 31.
Muñoz-Toledo, S.B. (2008). Congelación de semen de pudú (pudu pudu): efecto de

los diluyentes tris y leche sb sobre semen diluido.

Nicolich, A., Lafuente, R., López, G., García Peiró, A., & Brassesco, M. (2013). Análisis del estrés oxidativo en el eyaculado mediante la determinación del anión superóxido. *ASEBIR*, 18(1), 2.

Ortega, A. M., Izquierdo, A. C., Gómez, J. J. H., Olivares-Corichi, I. M., & Torres, V. M. M. (2003). *PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y ANTIOXIDANTES EN LA PRESERVACIÓN DE SEMEN. UNA REVISIÓN*. 28.

Pelzman, D., Walsh, P., Tarin, T., Brie, ño-E. M., & Hwang, K. (2023). Mp01-13 e-cigarette vapor exposure negatively affects spermatogenesis in mice. *Journal of Urology*, 209(Supplement 4), e7.
<https://doi.org/10.1097/JU.0000000000003212.13>

Practice Committee of tAmerican Society for Reproductive Medicine. (2008). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 90(5 Suppl), S60. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.065>

Rahali, D., Jrad-Lamine, A., Dallagi, Y., Bdiri, Y., Ba, N., El May, M., Fazaa, S., & El.Golli, N. (2018). Semen Parameter Alteration, Histological Changes and Role of Oxidative Stress in Adult Rat Epididymis on Exposure to Electronic Cigarette Refill Liquid. *The Chinese journal of physiology*, 61.
<https://doi.org/10.4077/CJP.2018.BAG521>

Revista del Comité Científico de la AECOSAN (2106.). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre métodos histológicos para la diferenciación de preparados

de carne y productos cárnicos.

https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/revistas_comite_cientifico/RCC_24.pdf

Saaranen, M., Suonio, S., Kauhanen, O., & Saarikoski, S. (1987). Cigarette smoking and semen quality in men of reproductive age. *Andrologia*, 19(6), 670-676. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1987.tb01926.x>

Sengupta, P., Dutta, S., & Krajewska-Kulak, E. (2017). The Disappearing Sperms: Analysis of Reports Published Between 1980 and 2015. *American Journal of Men's Health*, 11(4), 1279-1304. <https://doi.org/10.1177/1557988316643383>

Sonnino, S., & Prinetti, A. (s. f.). Membrane Domains and the "Lipid Raft" Concept. *Current Medicinal Chemistry*, 20(1), 4-21.

Sutovsky, P., & Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: Anatomical and compartmental analysis. En C. Barratt & C. J. De Jonge (Eds.), *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration* (pp. 1-30). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511545115.002>

Velásquez, M. M., Suarez, J. P., & Maya, W. D. C. (2020). Efecto del Cigarrillo Electrónico sobre los Espermatozoides Humanos: Aproximación in vitro. *Revista Urología Colombiana / Colombian Urology Journal*, 29(1), 7-13. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1691783>

Villanti, A. C., Johnson, A. L., Ambrose, B. K., Cummings, K. M., Stanton, C. A., Rose, S. W., Feirman, S. P., Tworek, C., Glasser, A. M., Pearson, J. L., Cohn, A. M., Conway, K. P., Niaura, R. S., Bansal-Travers, M., & Hyland, A. (2017). Flavored Tobacco Product Use in Youth and Adults: Findings From the First Wave of the

PATH Study (2013–2014). *American journal of preventive medicine*, 53(2), 139-151. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2017.01.026>

Winters, B. R., & Walsh, T. J. (2014). The epidemiology of male infertility. *The Urologic Clinics of North America*, 41(1), 195-204. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.006>