

RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA: EFECTOS DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO

Zambrano, Midalia Josefina.
Villasmil Bastidas, Saúl Antonio.

Tutor: Lic. Gabriela Arata de Bellabarba, MSc.

Colaboradores: Dr. Argenis Torres Morales
Dra. Carmen Zoraida Molina

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA - ESCUELA DE BIOANÁLISIS
Mérida - Venezuela
1995

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis.

AGRADECIMIENTO

A la Ilustre Universidad de Los Andes por habernos brindado todos los conocimientos para nuestra realización profesional.

A la Licenciada Gabriela Arata de Bellabarba, Jefe del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, por su desinteresado apoyo para la consecución de nuestro proyecto.

A la Licenciada Ana María Montarroso por sus correcciones y opiniones orientadoras en este trabajo.

A la Licenciada Gladys Marín de López Jefe del Departamento de Fisiopatología, lugar donde se realizó este trabajo.

Al Dr. Argenis Torres Morales por la colaboración en nuestro trabajo.

A la Licenciada Cecilia Le Morvan por su asistencia en el laboratorio.

A la Dra. Carmen Molina por su colaboración en este trabajo.

A la Sra. Carmen A. Prieto por su inapreciable ayuda en el trabajo de laboratorio.

Al Sr. Luis Rodríguez A. por su ayuda en el laboratorio.

A mis compañeros Anny Lacruz, Doritza Vargas, Ingrid Velarde, Tatiana Galeazzi por su dedicada solidaridad y compañerismo.

A los pacientes que sin su aporte no se hubiese realizado este proyecto.

RESUMEN

La adición de suero, al medio utilizado en la preparación del semen para la fecundación asistida, permite mejorar la recuperación de espermatozoides móviles. En este trabajo se comparó el efecto que sobre la recuperación espermática puede tener el uso de sueros provenientes de hombres o de mujeres en distintas etapas de la vida. Se utilizó Ham's F-10 como medio de cultivo enriquecido al 10% con suero de hombres (M1), de mujeres en fase folicular (M2), en fase lútea (M3), embarazadas (M4), menopáusicas (M5) y con albúmina bovina al 3% (M6). También se estudió el efecto de sustituir el Ham's F-10 por solución salina (SS) a la cual se le agregó suero en fase folicular al 25% (M0). Once muestras de semen, con parámetros seminales normales, se lavaron utilizando la técnica del doble lavado con migración ascendente. Cada muestra fue lavada y resuspendida en los diferentes tipos de medios y el número de espermatozoides móviles recuperados se evaluó a las 2h, 4h, 6h, y 8h de incubación. Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de espermatozoides recuperados no fue diferente entre los medios preparados con sueros diferentes (M1 a M5), con la albúmina (M6) y con la salina (M0). La recuperación espermática disminuyó proporcionalmente con el tiempo de incubación, pero no hubo diferencias entre los medios. En consecuencia un medio tan simple como la SS, enriquecido con suero de hombre o de mujer en cualquier etapa de su vida reproductiva puede ser utilizado en la preparación de una muestra de semen. Siendo la concentración de estradiol (E), progesterona (P) y testosterona (T) muy diferente entre los tipos de sueros utilizados se concluye que el tipo y la concentración de esteroides sexuales no afecta la recuperación espermática, lo cual no implica, que los esteroides puedan intervenir en eventos posteriores como la reacción acrosómica.

INTRODUCCIÓN

La ausencia de hijos deseados se reporta en un 15% de las parejas. Cuando se estudian las causas de la esterilidad se aprecia que en un 35% radica en la mujer, otro tanto le corresponde al hombre, en el 20% se detectan alteraciones en ambos, y en el 10% no se descubre el motivo de la esterilidad. Durante los últimos 30 años los avances obtenidos en el conocimiento de la fisiología reproductiva han mejorado el diagnóstico y el tratamiento de la esterilidad; en un 90% de las parejas se puede definir la causa y de éstos el 70% logra con éxito la solución del problema (^{1,2}).

Entre las alternativas disponibles para solucionar el problema de la pareja estéril está la «fecundación asistida». Con este término se engloban una serie de técnicas cuyo objetivo es el de facilitar la fecundación. La inseminación artificial, ampliamente utilizada en animales, se practicó por primera vez en humanos en 1780; puede realizarse intravaginal o intrauterina (IUI), la ventaja teórica de la IUI sobre la intravaginal es que en la IUI se puede aumentar el número de espermatozoides móviles que llegan al sitio de la fecundación, cuando el número o la movilidad espermática están disminuidas, o cuando hay problemas en el moco cervical(^{3,4,5}). En 1978(⁶), con el primer nacido vivo, resultado de la fecundación in vitro y de la transferencia de embriones (IVF-ET), se desarrollaron nuevas técnicas para facilitar la fecundación, tales como, la transferencia de gametos en las trompas de Falopio(⁷), la fecundación de óvulos a los cuales se les ha perforado la zona pelúcida(⁸) la transferencia de espermatozoides al espacio perivitelino(⁹) y la macroinyección del espermatozoide en el oolema(¹⁰).

Uno de los pasos indispensables para realizar cualquiera de las técnicas antes mencionadas es la preparación de la muestra de semen. En condiciones fisiológicas, una vez que el semen es depositado en la vagina, los espermatozoides abandonan el plasma seminal y comienzan a desplazarse a través del tracto genital femenino hasta alcanzar el óvulo y fecundarlo. El espermatozoide móvil se desplaza a través de la glera cervical y el líquido intratubárico para alcanzar el óvulo, sin embargo, para fecundarlo es necesario que el espermatozoide esté capacitado; esto significa que el contacto del espermatozoide con los diferentes tipos de líquidos presentes en el tracto genital femenino, no sólo le permite desplazarse sino que también lo capacita para penetrar las envolturas del óvulo y fecundarlo(^{11,12}). La capacitación es un fenómeno complejo durante el cual, el espermatozoide sufre una serie de cambios subcelulares que se manifiestan por la adquisición de un tipo diferente de movimiento: espermatozoide «hiperactivo» y la capacidad de realizar la reacción acrosómica la cual culmina con la liberación de las enzimas hidrolíticas, la exposición de la membrana acrosomal interna y la modificación del segmento ecuatorial(^{13,14,15,16}). El conjunto de cambios que se producen en el espermatozoide durante su tránsito a lo largo del tracto genital femenino pueden ser inducidos in vitro al eliminar el plasma seminal y resuspender los espermatozoides en un medio adecuado; de la composición del medio dependen el tiempo requerido para la capacitación, el mantenimiento de la movilidad y el % de espermatozoides que culminen la reacción acrosómica (^{17,18,19,20,21,22,23}). Se han descrito muchos medios cuya composición

varía desde lo más simple como una solución buffer fosfato hasta los más complejos como el Ham's F 10 a los cuales, es indispensable agregarle albúmina o líquido folicular o suero inactivado o líquido amniótico para mantener y estimular la movilidad del espermatozoide e inducir la capacitación^(24,25,26,27,28,29,30); generalmente se recomienda el uso del suero de la mujer en fase folicular, sin embargo, poco se conoce acerca del efecto que pueda tener sobre la movilidad espermática el uso de sueros provenientes de hombres o de mujeres en diferentes etapas. Motivo por el cual, en este trabajo, se comparó el efecto que puede tener un medio de cultivo enriquecido con sueros provenientes de hombres fértiles, mujeres en fase folicular, en fase lútea, menopáusicas y embarazadas sobre la recuperación espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos:

Albúmina bovina y Lactato de sodio (Sigma Chemical Co.); Medio liofilizado Ham's F-10, Penicilina y Estreptomina (Irvine Scientific, Ca.); Cloruro de sodio y Bicarbonato de sodio p.a. (Merck).

2. Obtención de las muestras de sangre:

Los sueros utilizados para enriquecer el medio con el cual se prepararon las muestras de semen se obtuvieron de 38 donantes, con los cuales se conformaron 5 grupos: hombres con fertilidad probada (8,H); mujeres cuyo período reproductivo se correspondía con: fase folicular (8, F.F.); fase lútea (10, F.L.); embarazo (6, Em.) y menopausia 86 Mn). En ayunas, se le extrajo a cada donante 12 ml de sangre venosa, se colocó en un tubo de vidrio sin anticoagulante y se dejó 2 horas a temperatura ambiente (T.A.). A continuación se centrifugó la muestra, 15 min. a 3.500 r.p.m. y el suero obtenido se inactivó colocándolo en un baño a 56°C durante 10 min. Tomando volúmenes iguales de suero de cada donante del mismo grupo se prepararon las mezclas de suero respectivas. Cada una de las mezclas se fraccionó y se congeló a -70°C.

3. Preparación de los medios:

a. Medio Ham's F-10: el preparado comercial se utilizó según las indicaciones adjuntas. El contenido del sobre se reconstituyó con agua destilada y se le agregaron 1,2 g de bicarbonato de sodio, 0,08 g de penicilina, 0,08 g de estreptomina y 4 ml de lactato de sodio; el volumen final se ajustó a 1 l. La composición del medio se muestra en el anexo No. 1. Para

enriquecer al medio se le agregó suero al 10% y luego se ajustó el pH a $7,4 \pm 0,2$. Se prepararon 5 tipos de medios enriquecidos: M1 con la mezcla de sueros de los hombres, M2 con la mezcla de sueros de mujeres en F.F., M3 con la mezcla de sueros de mujeres en F.L., M4 con la mezcla de sueros de mujeres embarazadas y M5 con la mezcla de sueros de mujeres menopáusicas. El medio M6 se enriqueció con albúmina bovina al 3% (p/v) Tabla No. 1.

TABLA 1
MEDIOS UTILIZADOS PARA LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA

TIPOS DE MEDIOS	COMPONENTES
M ₀	SSF + Suero de Mujeres en Fase Folicular*
M ₁	HAM'S F10 + Suero de Hombres Fértiles*
M ₂	HAM'S F10 + Suero de Mujeres en Fase Folicular*
M ₃	HAM'S F10 Suero de Mujeres en Fase Lútea*
M ₄	HAM'S F10 + Suero de Mujeres* Embarazadas
M ₅	HAM'S F10 + Suero de Mujeres Menopáusicas*
M ₆	HAM'S F10 + Albúmina Bovina

SSF = Solución Salina 0.9%.

* = Suero Inactivado.

b. Solución salina fisiológica al 0,9% (S.S.): la solución se preparó con 9 g de cloruro de sodio para 1 l de agua bidestilada. A partir de la S.S. se prepararon 2 soluciones enriquecidas con la mezcla de sueros de mujer en F.F.; para lavar el semen, la concentración del suero fue del 10% y la otra, para resuspender los espermatozoides lavados, se preparó con suero al 25%. A las soluciones se les ajustó el pH a $7,4 \pm 0,2$.

4. Recolección y análisis de las muestras de semen:

Las muestras estudiadas se obtuvieron de donantes fértiles con 3 a 5 días de abstinencia sexual. El espermograma se realizó una hora después de la obtención de la muestra y los parámetros seminales se determinaron siguiendo los criterios que recomiendan el manual de laboratorio para el examen del semen de la Organización Mundial de la Salud⁽³¹⁾. El conteo y la movilidad espermática se evaluaron utilizando la cámara de Mackler.

5. Lavado del semen:

La técnica utilizada fue la del lavado con migración ascendente, swim-up,^(32,33,34). Una alícuota del semen (0,3 ml) se diluyó 1:10 con el medio, se mezcló y se centrifugó a T.A durante 7 min con una fuerza centrífuga de 500 g. Inmediatamente después se aspiró el sobrenadante y se repitió el lavado. El precipitado se resuspendió en 0,3 ml de medio; se agitó suavemente y se incubó a 34 ± 2 °C durante 8 horas. Cada 2 horas se tomó una alícuota del medio en la cual se determinó el número de espermatozoides móviles. Cada muestra de semen se procesó simultáneamente con los medios que se estaban evaluando. El % de recuperación se calculó: dividiendo el número de espermatozoides móviles recuperados en cada intervalo de tiempo estudiado, entre el número de espermatozoides móviles presentes en el semen antes del lavado, el resultado se multiplicó por 100.

6. Determinaciones hormonales:

Los niveles de estradiol (E), de testosterona (T) y de progesterona (P), presentes en las 5 mezclas de sueros se cuantificaron por radioinmunoensayo, utilizando los estuches comerciales de Rodioassay Systems Laboratories, Inc.

7. Análisis estadístico:

El porcentaje de recuperación obtenido con cada medio y durante los diferentes intervalos de tiempo estudiados se presenta como media aritmética $\pm$ el error estándar. La significancia estadística entre las variables se calculó con el uso del análisis de varianza (ANOVA), la t-Student apareada y la regresión lineal.

RESULTADOS

Las muestras de semen utilizadas fueron seleccionadas en base a 3 parámetros fundamentales: número, movilidad y morfología espermática. Como se muestra en la Tabla No. 2, las 11 muestras te-

nían conteos iguales o superiores a los 62 millones de espermatozoides por ml, el porcentaje de móviles (categoría a más b) fue igual o superior al 49% y los espermatozoides con formas ovaladas normales superaban el 54%.

Como los sueros utilizados para enriquecer el medio de cultivo provenían de individuos en diferentes etapas de su vida reproductiva se determinó, en cada mezcla de sueros, la concentración de esteroides sexuales. En la Tabla No. 3, se muestran las concentraciones de estradiol, testosterona total y progesterona obtenidas en cada mezcla. Con respecto a testosterona se destaca que la concentración en la mezcla de suero de hombres es en promedio 6 veces más alta que en los sueros de las mujeres. En la mezcla de sueros de mujeres embarazadas los niveles de estradiol son 10 y 100 veces más altos que en la fase lútea y que en la mezcla de menopáusicas respectivamente. Niveles altos de progesterona sólo se obtuvieron en las mezclas de sueros de mujeres en fase lútea y en las embarazadas.

En la Tabla No. 4, se muestran los promedios de los porcentajes de recuperación obtenidos con los diferentes tipos de medios. Los valores individuales obtenidos con cada medio y en los intervalos de tiempo estudiados se muestran en los anexos 3, 4, 5, y 6. A las 2 horas de incubación la recuperación espermática obtenida en todos los medios fue muy similar; en el medio enriquecido con el suero de mujeres en fase folicular (M2) se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación 68,6% y el menor porcentaje 63,6% se obtuvo en los medios enriquecidos con el suero de mujeres menopáusicas (M5) y con el suero de mujeres embarazadas (M4). En el medio enriquecido sólo con albúmina tampoco se obtuvo un porcentaje de recuperación diferente al obtenido con los sueros; el análisis de varianza entre los seis grupos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas. Después de 4 horas de incubación la recuperación obtenida en el medio enriquecido con suero de mujeres en fase folicular no disminuyó 70,8%, a diferencia de todos los demás en los cuales se observó una pequeña disminución, entre el 2% y el 7%; al comparar entre sí los promedios de recuperación obtenidos a las 4 horas no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa. A las 6 horas y a las 8 horas el porcentaje de recuperación disminuyó en todos los medios, pero entre sí, la diferencia no fue estadísticamente significativa. En el medio enriquecido con suero de mujeres en fase folicular (M2), la disminución entre las 2 horas y las 8 horas fue del 11%, mientras que con los otros sueros la disminución en los porcentajes de recuperación fue de aproximadamente un 15% a 17%; el porcentaje de recuperación obtenido con el

medio al cual sólo se le agregó albúmina bovina (M6) fue similar al obtenido con los sueros, durante todos los intervalos de tiempo estudiados.

La disminución de la movilidad fue directamente proporcional al tiempo de incubación; como se puede observar en las Figuras Nos. 1, 2 y 3, la relación entre la recuperación espermática y el tiempo de incubación se ajustó muy bien a una recta de regresión.

Al estudiar qué efecto podría tener sobre la recuperación espermática el sustituir un medio de cultivo muy completo por solución salina, pudimos comprobar que al lavar la muestra de semen con S.S. enriquecida al 10% con suero de mujer en fase folicular y luego, realizar la migración ascendente en

SS con suero al 25% (M0), el porcentaje de recuperación espermática obtenido no fue estadísticamente diferente del obtenido con el Ham's-F10 enriquecido con el mismo tipo de suero (M2). La concentración de suero presente en la SS fue suficiente para mantener y estimular la movilidad espermática aún después de 8 horas de incubación; como se muestra en la Tabla No. 5, el porcentaje de recuperación espermática a las 8 horas en el M0 no fue diferente del porcentaje observado con el M2. En la Figura No. 4 se puede apreciar como, en función del tiempo, el comportamiento de los espermatozoides resuspendidos en la SS fue muy similar al de los espermatozoides resuspendidos en el Ham's F-10.

TABLA 2
CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE SEMEN

PARÁMETROS	DONANTES										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Espermatozoides (millones x ml)	62	126	77	80	150	140	72	96	84	100	91
Movilidad % A + B*	73	85	79	58	86	80	57	56	49	82	65
% Normales	79	72	60	70	77	71	55	69	80	72	65

* = A + B (Rápidos más lentos)

TABLA 3**NIVELES DE ESTEROIDES SEXUALES EN LAS MEZCLAS DE SUEROS**

	E2	P4	T
SUERO	pg/ml	ng/ml	ng/dl
Mujeres en Fase Folicular	110,0	0,3	88,0
Mujeres en Fase Lútea	295,0	10,8	99,0
Mujeres Embarazadas	3000,0	40,0	92,0
Mujeres Menopáusicas	18,0	0,2	120,0
Hombres Fértiles	45,0	0,2	620,0

E2 = Estradiol, P4 = Progesterona, T = Testosterona.

TABLA 4**EFFECTO DE LOS TIPOS DE SUERO AGREGADOS AL MEDIO SOBRE LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

HORAS	% DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS						F
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
2	64,3±4,8	68,6±2,9	67,6±3,9	63,6±4,8	63,6±4,9	66,8±5,5	ns
4	57,3±4,1	70,8±4,9	60,9±6,0	58,6±5,3	56,7±4,6	62,6±4,8	ns
6	53,9±5,6	60,4±4,1	53,9±5,8	50,4±4,5	53,4±4,7	50,0±4,5	ns
8	47,8±4,4	57,6±4,5	52,1±6,0	46,7±3,9	47,5±4,8	49,7±4,9	ns

F: Fisher Anova.

ns = no significativo.

TABLA 5

EFFECTO DE LOS TIPOS DE SUERO AGREGADOS AL MEDIO SOBRE LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA

TIEMPO	% DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS		p*
	M2	M0	
2 h	68,6±2,9	73,4±5,5	ns
4 h	70,8±4,9	65,4±4,0	ns
6 h	60,4±4,1	59,5±5,6	ns
8 h	57,6±4,5	54,6±4,2	ns

* = t de Student apareada

Figura 1

EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA

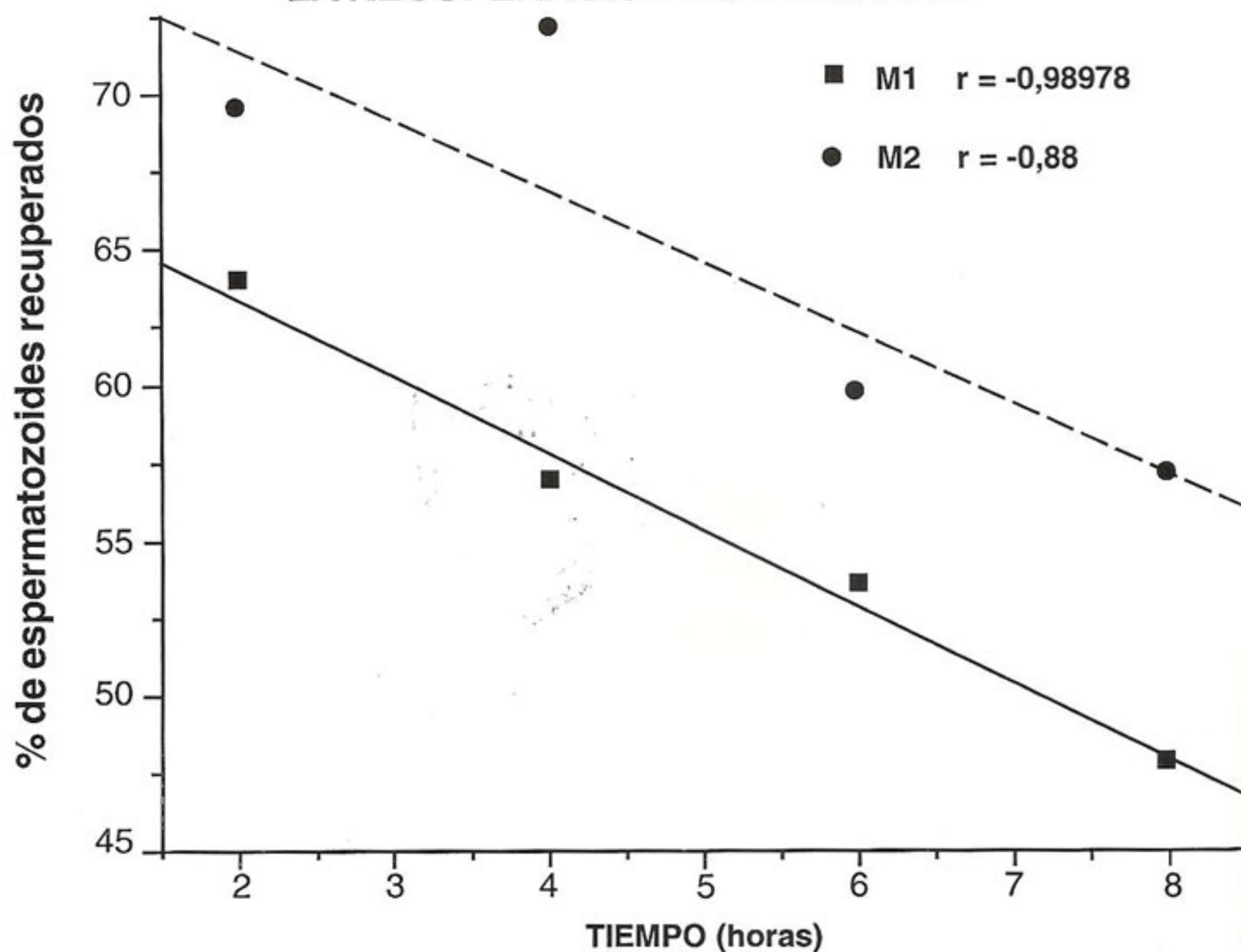


Figura 2

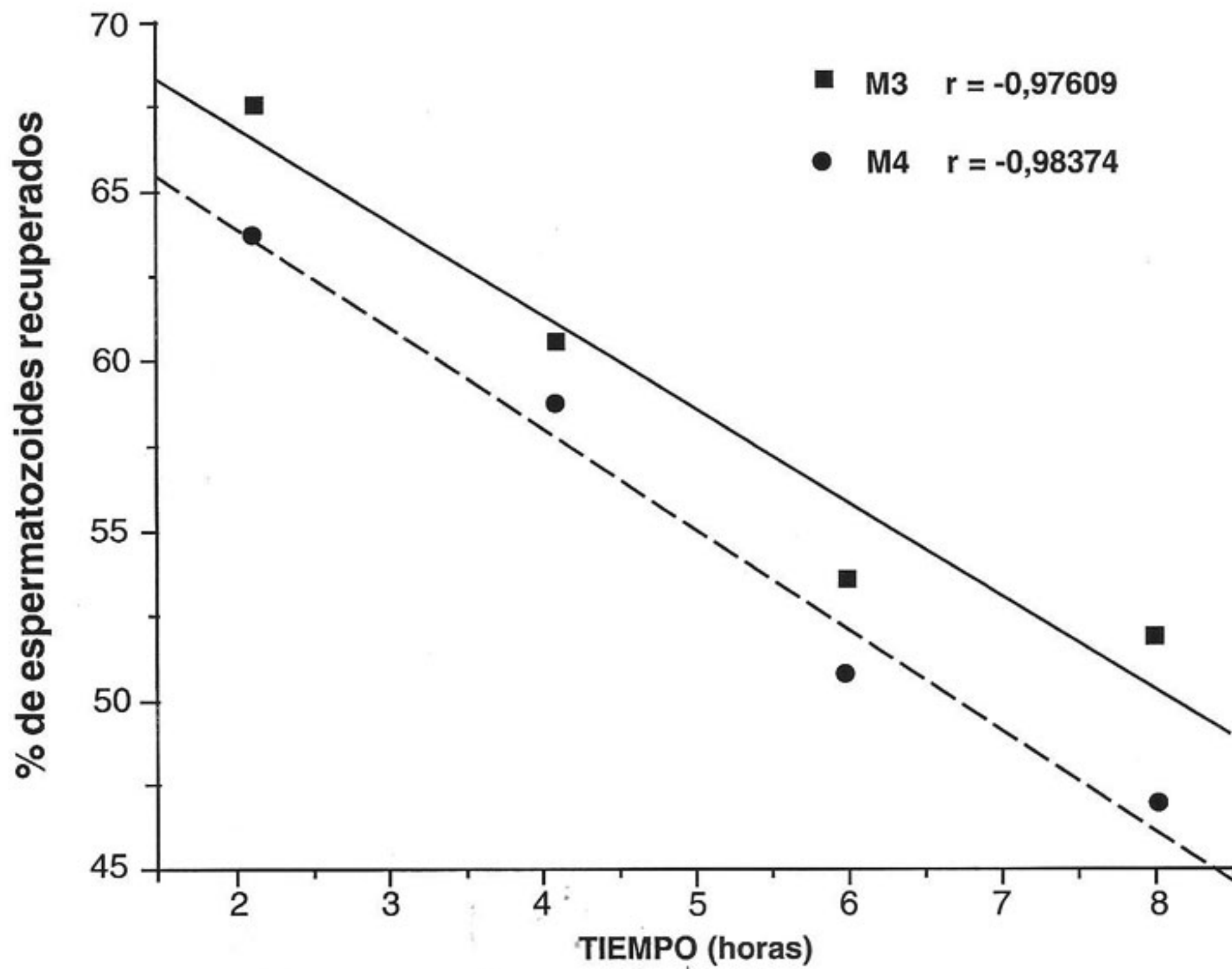
**EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE
LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

Figura 3

**EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE
LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

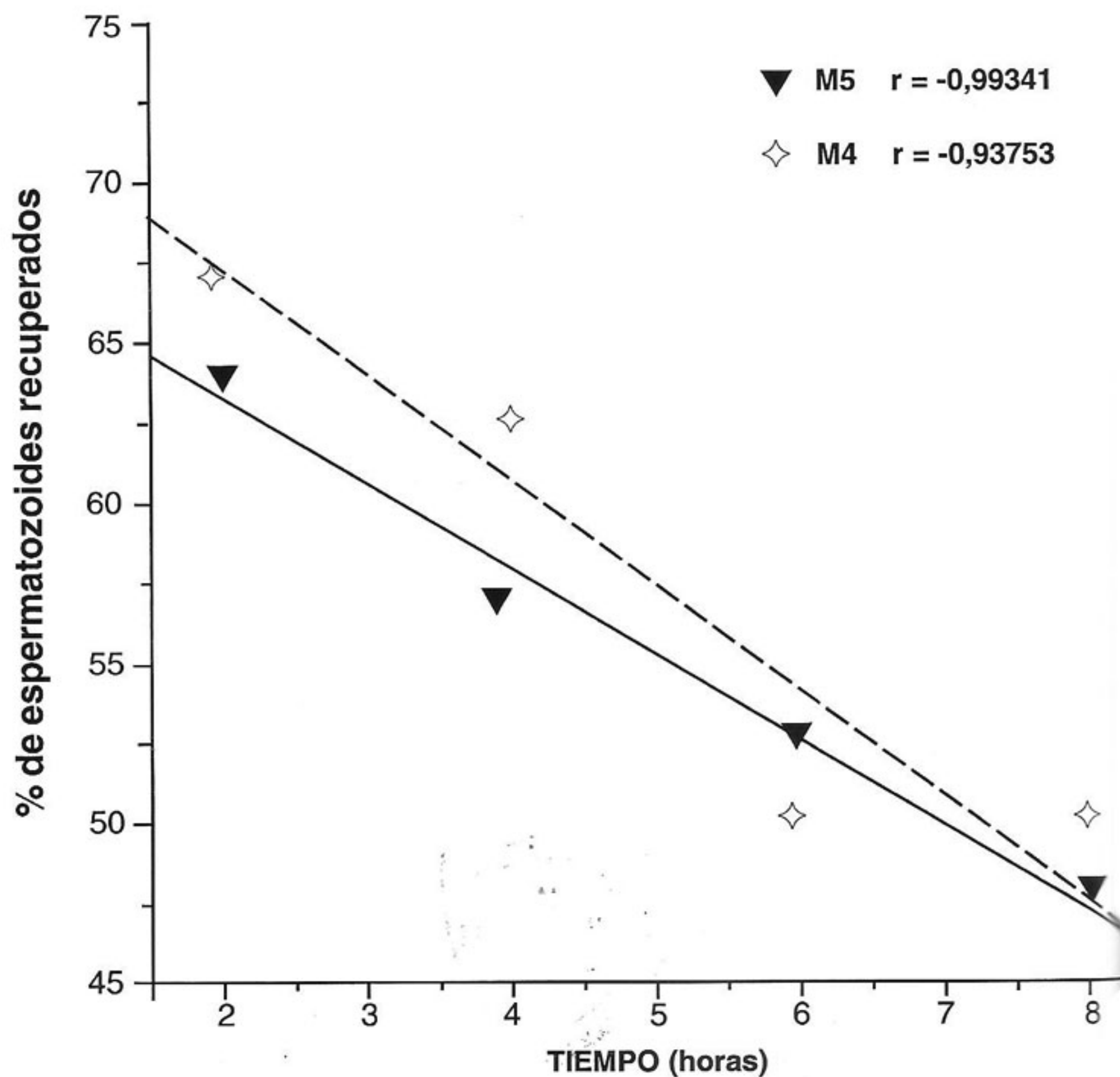
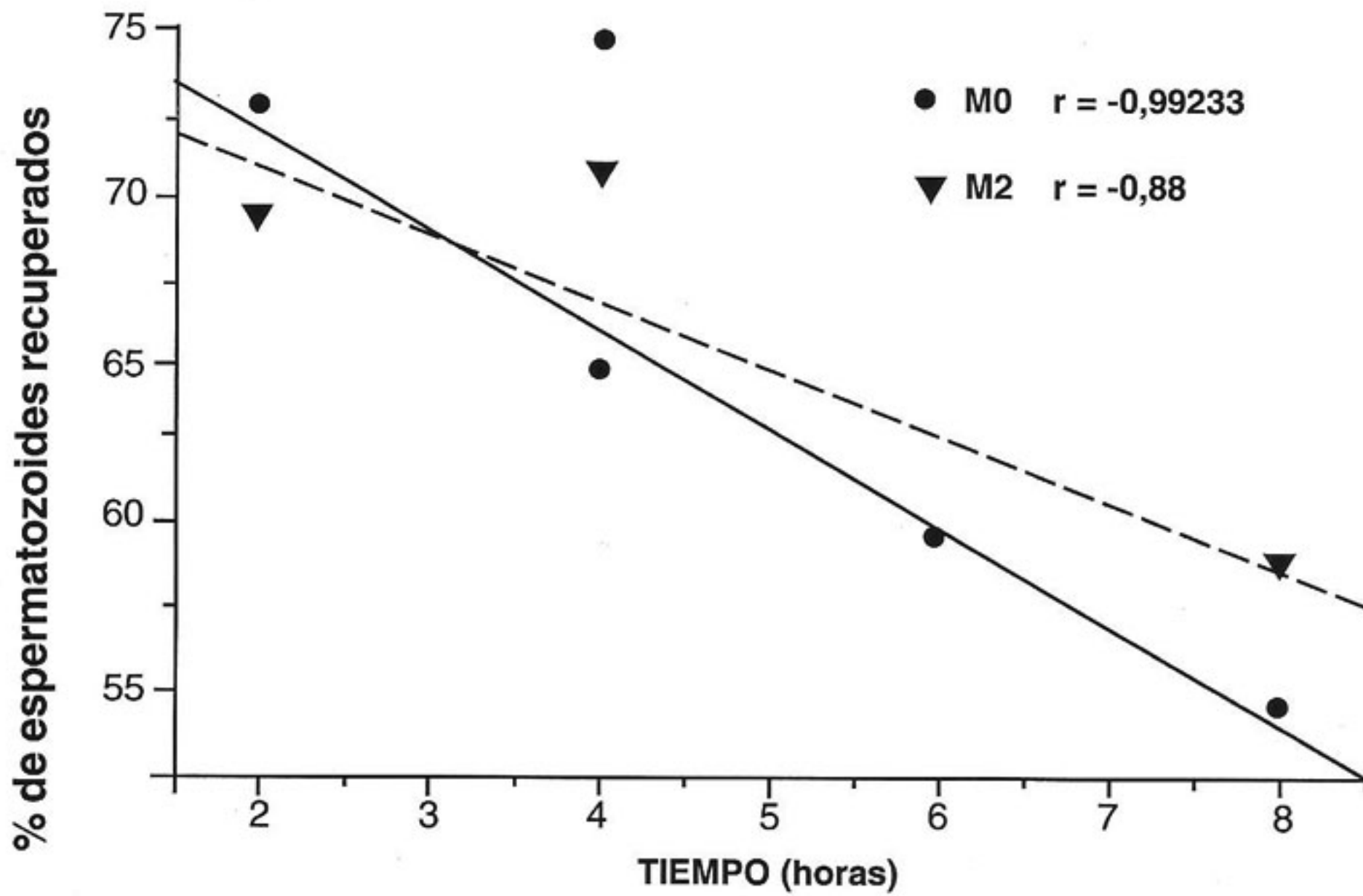


Figura 4

**EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE
LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que con los diferentes tipos de sueros utilizados, el porcentaje de recuperación espermática fue muy similar aun cuando, las concentraciones de esteroides sexuales presentes en los sueros fueron muy diferentes entre sí. Los efectos que los esteroides sexuales, exógenos, ejercen sobre el metabolismo energético y la movilidad de los espermatozoides no son concluyentes debido, en gran parte, a los diferentes modelos utilizados para los estudios^(35, 36, 37). Beck y Col⁽³⁸⁾, estudiaron la migración de los espermatozoides humanos a través de un capilar, en el cual colocaron individualmente estradiol, testosterona, progesterona, norgestrel y linestrenol, disueltos en solución Tyrode. Bajo estas condiciones, el estradiol fue el más efectivo en estimular la movilidad de los espermatozoides mientras que, los progestágenos la inhibieron. Otros autores observaron que los progestágenos, *in vitro* e *in vivo*, inhiben la migración de los espermatozoides a través de la glera cervical^(39,40) y que el estradiol, no tiene ningún efecto sobre la movilidad espermática⁽³⁹⁾. Posteriormente, se demostró que los efectos obtenidos al incubar espermatozoides lavados con los esteroides se anularon cuando los espermatozoides fueron resuspendidos en suero⁽⁴¹⁾. Estos autores sugieren que en el suero hay otros factores que mejoran la movilidad espermática y que contrarrestan el efecto inhibitorio de la progesterona. Nuestros resultados muestran, que la recuperación espermática obtenida con los sueros, no fue diferente de la obtenida con albúmina sola; esto sugiere, que los esteroides sexuales no afectan la movilidad de los espermatozoides lavados. Como entre los diferentes tipos de sueros no hubo diferencias, también se puede concluir que la concentración y el tipo de esteroide presente en el suero, no modifica la movilidad espermática. Es importante señalar que estas conclusiones, no descartan, que los esteroides sexuales puedan influir en la secuencia de eventos que se suceden durante la capacitación y la fecundación. El líquido folicular, también utilizado para resuspender los espermatozoides lavados, es un medio con elevadas concentraciones de esteroides sexuales⁽⁴²⁾ al

cual, se le atribuyen, además del efecto estimulante sobre la movilidad espermática, un efecto facilitador de la entrada de calcio al espermatozoide y un efecto facilitador en la inducción de la reacción acrosómica^(27,28,29). Trabajos recientes sugieren, que la progesterona presente en el líquido folicular, sería la responsable de facilitar, a través de un efecto no genómico, la entrada de calcio al espermatozoide y la inducción de la reacción acrosómica^(43, 44); también se plantea la posibilidad de que un defecto en el receptor a progesterona del espermatozoide podría ser el factor responsable en algunos casos de esterilidad masculina⁽⁴⁵⁾.

Hay que destacar el alto porcentaje de recuperación obtenido con la metodología utilizada; este resultado depende, como lo han señalado otros autores^(18, 19, 20, 24, 25, 32, 22), de la fuerza centrífuga aplicada, de la presencia de albúmina en el medio seleccionado para lavar el semen, de la concentración de hidrogeniones y de las características individuales de la muestra de semen. Si estos factores se toman en cuenta se obtiene un número elevado de espermatozoides móviles, que se mantienen activos durante un tiempo prolongado. El medio utilizado para la obtención de espermatozoides móviles no necesariamente tiene que ser el Ham's F-10, nuestros resultados muestran que, éste, puede ser sustituido por solución salina. La presencia de la albúmina en el medio es indispensable para, proteger los espermatozoides del efecto perjudicial de la fuerza centrífuga y para iniciar la capacitación^(13, 16, 20). Si se utiliza albúmina comercial la concentración mínima suficiente es del 3%; pero cuando se utiliza suero al 10% la concentración de albúmina resultante está cerca del 0,3%, sin embargo ésta es suficiente para obtener una movilidad similar o superior a la obtenida con la albúmina. Esta diferencia es atribuida a los múltiples factores presentes en el suero capaces de estimular la movilidad espermática^(19, 20, 21, 22, 23). En la práctica, los resultados obtenidos muestran que para la preparación de una muestra de semen con un elevado número de espermatozoides móviles, se puede utilizar solución salina enriquecida con suero de hombre o de mujer indistintamente.

Anexo 1

COMPOSICIÓN DEL HAM'S F-10

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mg/ml)
SALES INORGÁNICAS	
CaCl ₂ (anhídrido)	33,29
CuSO ₄ - 5H ₂ O	0,0025
FeSO ₄ - 7H ₂ O	0,834
KCl	285,0
KH ₂ PO ₄	83,0
MgSO ₄ (anhídrido)	74,64
ClNa	7.400,0
Na ₂ HPO ₄ (anhídrido)	153,7
ZnSO ₄ - 7 H ₂ O	0,0288
Otros Componentes	
D - Glucosa	1.100,0
Hipoxantina (Sal Na)	4,68
Ácido Lipoico	0,2
Rojo de Fenol	1,2
Piruvato de Na.	110,0
Timidina	0,7
AMINOÁCIDOS	
L - Alanina	9,0
L - Arginina - HCl	211,0
L - Asparagina - H ₂ O	15,01
L - Ácido aspártico	13,0
L - Cisteina	25,0
L - Ácido glutámico	14,0

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mg/ml)
L - Glutamina	146,0
Glicina	7,51
L - Histidina-HCl-H ₂ O	23,0
L - Isoleucina	2,6
L - Leucina	13,0
L - Lisina - HCl	29,0
L - Metionina	4,48
L - Fenilalanina	5,0
L - Prolina	11,5
L - Serina	10,5
L - Treonina	3,57
L - Triptófano	0,6
L - Tirosina (sal Na ₂)	2,62
L - Valina	3,5
VITAMINAS	
Biotina	0,024
D-Ca-Pantotenato	0,715
Colina - HCl	0,698
Ácido Fólico	1,320
i - Inositol	0,541
Niacinamida	0,615
Piridoxina - HCl	0,206
Riboflavina	0,376
Tiamina - HCl	1,000
Vitamina B12	1,360

Agregados:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
HCO ₃ Na	1,2 g/l
Penicilina	0,008 g/l
Estreptomicina	0,008 g/l
Lactato de Na.	4 ml

Anexo 2

CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE SEMEN

PARÁMETROS	DONANTES										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Espermatozoides (millones x ml)	62	126	77	80	150	140	72	96	84	100	91
d / 0.3 ml	19	38	23	24	45	42	22	29	25	30	27
Movilidad % A + B*	73	85	79	58	86	80	57	56	49	82	65
A + B / 0.3 ml	14	31	19	14	39	34	12	25	12	25	18
% Normales	79	72	60	70	77	71	55	69	80	72	65

* = A + B (Rápidos más Lentos)

Anexo 3

PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS A LAS 2 HORAS DE INCUBACIÓN

		TIPOS DE MEDIOS					
MUESTRAS		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆
1	Nº	9	11	10	9	9	9
	%	64,2	78,5	71,4	64,2	64,2	64,2
2	Nº	14	17	10	14	11	11
	%	45,1	54,8	32,2	45,1	35,4	35,4
3	Nº	13	14	13	14	13	14
	%	68,4	73,6	68,4	73,6	68,4	73,6
4	Nº	11	14	13	12	13	13
	%	78,5	90,0	92,8	85,7	92,8	92,8
5	Nº	15	26	19	13	17	16
	%	39,4	68,4	50,0	34,2	44,7	42,1
6	Nº	29	31	19	24	22	22
	%	87,8	93,9	57,5	72,7	66,6	66,6
7	Nº	7	8	10	8	8	9
	%	58,3	66,6	83,3	66,6	66,6	75,0
8	Nº	15	16	14	12	12	15
	%	60,0	64,0	56,0	48,0	48,0	60,0
9	Nº	9	9	10	8	8	9
	%	75,0	75,0	83,3	66,6	66,6	75,0
10	Nº	12	15	16	15	16	14
	%	48,0	60,0	64,0	60,0	64,0	56,0
11	Nº	15	17	17	15	15	17
	%	83,3	94,4	94,4	83,3	83,3	94,4

Nº = Número de espermatozoides recuperados (millones por mililitro).

Anexo 4

PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS A LAS 4 HORAS DE INCUBACIÓN

MUESTRAS		TIPOS DE MEDIOS					
		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆
1	Nº	8	11	8	9	9	9
	%	57,1	78,5	57,1	64,2	64,2	64,2
2	Nº	16	15	10	10	9	13
	%	51,6	48,3	32,2	32,2	29,0	41,9
3	Nº	13	13	14	12	12	14
	%	68,4	68,4	73,6	63,1	63,1	73,6
4	Nº	11	13	13	12	11	11
	%	78,5	92,8	92,8	85,7	78,5	78,5
5	Nº	12	22	14	12	15	14
	%	31,5	57,8	36,8	31,5	39,4	36,8
6	Nº	18	25	18	20	21	20
	%	54,5	75,7	54,5	60,6	63,6	60,6
7	Nº	7	9	7	8	6	9
	%	58,3	75,0	58,3	66,6	50,0	75,0
8	Nº	12	14	12	11	12	13
	%	48,0	56,0	48,0	44,0	48,0	52,0
9	Nº	8	9	8	7	7	9
	%	66,6	75,0	66,6	58,3	58,3	75,0
10	Nº	11	13	14	14	13	12
	%	44,0	52,0	56,0	56,0	52,0	48,0
11	Nº	13	16	17	15	14	15
	%	72,2	90,0	94,4	83,3	77,7	83,3

Nº = Número de espermatozoides recuperados (millones por mililitro).

Anexo 5

PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS A LAS 6 HORAS DE INCUBACIÓN

		TIPOS DE MEDIOS					
MUESTRAS		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆
1	Nº	8	10	7	8	7	9
	%	57,1	71,4	50,0	57,1	50,0	64,2
2	Nº	14	15	7	10	10	8
	%	45,1	48,3	22,5	32,2	32,2	25,8
3	Nº	10	11	11	8	12	10
	%	52,6	57,8	57,8	42,1	63,1	52,6
4	Nº	10	13	12	11	12	11
	%	71,4	92,8	85,7	78,5	85,7	78,5
5	Nº	13	18	10	12	13	11
	%	34,2	47,3	26,3	31,5	34,2	28,9
6	Nº	16	19	17	14	18	14
	%	48,4	57,5	51,5	42,4	54,5	42,4
7	Nº	6	8	7	8	6	7
	%	50,0	66,6	58,3	66,6	50,0	58,3
8	Nº	11	13	11	11	11	12
	%	44,0	52,0	44,0	44,0	44,0	48,0
9	Nº	7	8	7	6	7	7
	%	58,3	66,6	58,3	50,0	58,3	58,3
10	Nº	8	11	14	11	11	11
	%	32,0	44,0	56,0	44,0	44,0	44,0
11	Nº	16	111	15	12	13	9
	%	90,0	61,1	83,3	66,6	72,2	50,0

Nº = Número de espermatozoides recuperados (millones por mililitro).

Anexo 6

PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS A LAS 8 HORAS DE INCUBACIÓN

		TIPOS DE MEDIOS					
MUESTRAS		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆
1	Nº	7	11	11	7	9	9
	%	50,0	78,5	78,5	50,0	64,2	64,2
2	Nº	10	13	9	10	8	8
	%	32,2	41,9	29,0	32,2	25,8	25,8
3	Nº	12	12	9	9	11	10
	%	63,1	65,7	61,7	56,5	63,1	63,1
4	Nº	10	12	12	10	10	7
	%	71,4	85,7	85,7	71,4	71,4	50,0
5	Nº	11	18	10	10	10	11
	%	28,9	47,3	26,3	26,3	26,3	28,9
6	Nº	13	19	11	13	12	14
	%	39,3	57,5	33,3	39,3	36,3	42,4
7	Nº	6	8	7	7	7	10
	%	50,0	66,6	58,3	58,3	58,3	83,3
8	Nº	11	11	9	9	9	11
	%	4,0	44,0	36,0	36,0	36,0	44,0
9	Nº	7	7	6	6	6	6
	%	58,3	58,3	50,0	50,0	50,0	50,0
10	Nº	7	11	12	11	9	10
	%	28,0	44,0	48,0	44,0	36,0	40,0
11	Nº	11	8	12	9	10	10
	%	61,1	44,4	66,6	50,0	55,5	55,5

Nº = Número de espermatozoides recuperados (millones por mililitro).

BIBLIOGRAFÍA

1. JONES, R.E. Medical Aspects of Human Reproduction: Infertility. In: Human Reproductive Biology. R.E. Jones De. Academic Press, Inc. 1991:355-367.
2. IRITANI A. Current status of biotechnological studies in mammalian reproduction. *Fertil Steril* 50:543-551, 1988.
3. ALLEN, N.C; HERBERT, C.M; WAYNE, S.M; ROGER B.J; DIAMOND M.P; WENTZ, A.C. Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil Steril*, 44:569-580, 1985.
4. UZCÁTEGUI C.L; BELLABARBA, G; BISHOP R; UZCÁTEGUI, C. Inseminación intrauterina con semen capacitado. *Rev. Obst. Gin. Venezuela* 52:109-115, 1991.
5. SHER, G; KNUTZEN, V.K; STRATTON C.J.; MONTAKHAH M.M; ALLENSON S.G. In vitro sperm capacitation and transcervical intrauterine insemination for the treatment of refractory. *Fertil Steril* 41:260-264, 1984.
6. STEPTOE, P.C; EDWARDS, R.G. Birth after implantation of a human embryo. *Lancet* 2:366-369, 1978.
7. ASCH, R.H; ELLSWORTH, L.R; BALMACEDA, J.P; WONG, P.C. Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer (GIFT). *Lancet* 2:1034-1039, 1984.
8. GORDON, J.W; GRUNFELD, L; GARRISI, G.J. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil Steril* 50:68-73, 1988.
9. GORDTS, S; GARCÍA, G; VERCROYSEN, M; ROZIER, P; CAMPO, R; SWINNEN, K. Subzonal insemination: a prospective randomized study in patients with abnormal sperm morphology. *Fertil Steril* 60:307-313, 1993.
10. LANZENDORF, S.S; MALONEY, M.K; VEECK, L.L; HODGEN, G.D; ROZENWAKS, Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 49:835-842, 1988.
11. OLDS-CLARKE, P. Motility characteristics of sperm from the uterus and oviducts of female mice after mating to congenic males differing in sperm transport and fertility. *Biol. Reprod* 34:453-467, 1986.
12. DRESDNER, R.D; KATZ, D.F. Relationship of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. *Biol. Reprod.* 25:920-930, 1981.
13. NAGAE, T; YANAGIMACHI, R; SRIVASTAVA, P.N; YANAGIMACHI, Y. Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril* 45:701-707, 1986.
14. BYRD, W; WOLFF, D.P. Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biol. Reprod.*, 34:859-869, 1986.
15. PLACHOT, M; MANDELBAUM, J; JUNCA, A.M. Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 42:418-423, 1984.
16. BEDFORD, J.M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28:108-120, 1983.
17. McMASTER, M; YANAGIMACHI, R; LOPATA, A. Penetration of human spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 19:212-216, 1978.
18. AKERLOF, E; FREDICSON, B; GUSTAFSON, O; LUNELL, N.O; NYLUND, L; ROSENBORG, L; SLOTT, H; POUSSETTE, A. Sperm factors stimulate the motility of human spermatozoa. *Inter J Androl*, 12:124-130, 1989.
19. JARVI, K; ROBERTS, K.D; LANGLAIS J; GAGNON, C. Effect of platelet-activating factor, lysoplatelet-activating factor, and lysophosphatidylcholine on sperm motion: importance of albumin for motility stimulation. *Fertil Steril* 59:1266-1275, 1993.
20. AITKEN J.R; WANG, Y.F; LIU, J; BEST, F; RICHARDSON D.W. The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl*, 6:180-193, 1983.
21. MAKLER, A; MAKLER, E; ITZKOVITZ, J; BRANDES, J.M. Factors affecting sperm motility. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein, and other metabolically active compounds. *Fertil Steril* 33:624-630, 1980.
22. ROGERS, B.J; PERREAULT, S.D. Importance of glycolysable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. *Biol. Reprod* 43:1064-1069, 1990.
23. PILIKIAN, S; ADELEINE, P; CZYBA, J.C; ECOCHARD, R; GUERIN, J.F; MIMOUNI, P. Hyperactivated motility of sperm from fertile donors and asthenozoospermic patients before and after treatment with ionophore. *Inter J Androl* 14:167-173, 1991.
24. LAMIRANDE, E; GAGNON, C. Quantitative Assessment of serum-induced stimulation of human sperm motility. *Inter J Androl* 14:11-22, 1991.
25. ZIEGER, D; CEDARS, M.I; HAMILTON, F; MORENO, T; MELDRUM, D.R. Factors influencing maintenance of sperm motility during in vitro processing. *Fertil Steril* 48:816-820, 1987.
26. GIANAROLI, L; SERACCHIOLI, R; FERRARETTI, A; TROUNSON, A; FLAMINI, C;

- BOVICELLI, L. The succesful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* 46:907-913, 1986.
27. CHAO, H.T; TSAI, K.L; HONG, C.Y; WEI, Y.H. Human follicular fluid stimulates motility and velocity of washed human sperm in vitro. *Andrologia* 24:47-51, 1992.
28. TARLATZIS, B.C; DANGLIS, J; KOLIBIANAKIS, E.M; PAPADIMAS J; BONTIS, J; LAGOS, S; MANTALENAKIS, S. Effect of follicular fluid on sperm movement characteristics. *Arch Androl* 31:167-175, 1993.
29. MENDOZA, C; TESARIK, J. Effect of follicular fluid on sperm movement characteristics. *Fertil Steril* 54:1135-1139, 1990.
30. BLUMENFELD, Z; NAHHAS, F. Pretreatment of sperm with human follicular fluid for boderline male infertility. *Fertil Steril* 51:863-867, 1989..
31. World Health Organization. WHO. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Third Edition: Cambridge University Press, Cambridge, England, 1992.
32. LOPATA, A; PATULLO, J.M; CHANG, A; JAMES, B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril* 27:677-684, 1976.
33. MAKLER, A; MURILLO, O; HUZSAE, G; TARLATZIS, B; DeCHERNEY, A; NAFTOLIN, F. Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen. *Inter J Androl* 7:61-70.
34. SCOTT, R; OEHNINGER, S; MENKVELD, R; VEEK, L; ACOSTA, A. Critical assessment of sperm morphology before and after double wash swim up preparation for in vitro fertilization. *Arch Androl* 23:125-129, 1989.
35. VOGLMARYR, J.K. The effect of testosterone and related steroids on the oxidative and glycolytic activity and on lipid syntesis of testicular and ejaculated bull spermatozoa. *Acta Endocr* 68:793-804, 1971.
36. WESTER, R.C; SALISBURY, G.W. Effect of testosterone, estradiol - 17B and progesterone on the oxygen ultake by bovine semen, washed spermatozoa. *Biol. Reprod* 7:25-30, 1972.
37. HAMMERSTEDT, R.H; AMANN, R.P. Effects of physiological levels of exogenous steroids on metabolism of testicular, cauda epididymal and ejaculated bovine sperm. *Biol. Reprod.* 15:678-685, 1976.
38. BECK, K.J; HERSCHEL, S; HUNGERSHOFER, R; SCHIWGER, E. The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X and Y bearing human spermatozoa. *Fertil Steril*, 27:407-411, 1975.
39. HYNE, H.V; BOETTCHER, B. Binding of steroids to human spermatozoa and its possible rol in conception. *Fertil Steril* 30:322-326, 1978.
40. KESSERU, E; CAMACHO-ORTEGA, P; LAUDAHN, G; SCHOPFLIN, G. In vitro action of progestagens on sperm migration in human cervical mucus. *Fertil Steril* 26:57-60, 1975.
41. CHEN, C; BOETTCHER, B. The effect of steroids on the in vitro migration of washed human spermatozoa in modified tyrod's solution or in fasting human blood serum. *Fertil Steril* 32:566-570, 1979.
42. KREINER, D; LIU, H; ITSKOVITZ, J; VEECK, L; ROSENWAKS, Z. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality. *Fertil Steril* 48:991-996, 1987.
43. FORESTA, C; ROSSATO, M; Di VIRGILIO, F. Ion fluxes throug the progesterone-activated channel of the sperm membrane. *Biochem J* 279-283, 1993.
44. SCHIMIZU, Y; NORD, P.E; BRONSON, R.A. Progesterone-evoked increases in sperm (Ca²⁺) correlate with the egg penetrating ability of sperm from fertile but not infertile men. *Fertil Steril* 60:526-530, 1993.
45. TESARIK, J; MENDOZA, C. Defective function of a nongenomic progesterone receptor as a sole sperm anomaly in fertile patients. *Fertil Steril* 58:793-797, 1992.