

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
 7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
 8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
 - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaria de SAMeR: info@samer.org.ar

Valores de referencia locales (Córdoba) para los parámetros del semen humano

Rosa Isabel Molina,^{1,2} Andrea Daniela Tissera,¹ Lucas Daniel Estofán,² María Celina Pereyra,² Mariana Hernández,² Andrea Dematteis,² Fernando Beltramone,² José Olmedo,² Daniel Estofán²

¹ Laboratorio de Andrología y Reproducción (LAR).

² Centro Integral de Ginecología, Obstetricia y Reproducción (CIGOR).

Reproducción 2012;27:118-125

Resumen

Introducción. Los nuevos valores de referencia publicados por la OMS han sido discutidos por varios autores con opiniones controvertidas. La OMS propone que cada región geográfica y cada laboratorio deberían contar con sus propios valores de referencia.

Objetivo. Evaluar los valores de referencia de una población de voluntarios de Córdoba que habían logrado el embarazo dentro de los 12 meses de búsqueda y sus parejas estaban cursando con un embarazo no mayor a 24 semanas (6 meses). **Diseño.** Prospectivo, de cohorte. **Materiales y métodos.** Se estudiaron 2.487 muestras de semen, las cuales se dividieron en 3 grupos: grupo de voluntarios fértiles (GF, n=80), grupo de pacientes que consultan por fertilidad, o sea, fertilidad desconocida (GFD, n=2,101), y un grupo de pacientes con factor masculino (GFM, n=306). Los parámetros seminales fueron evaluados según la

OMS 1999. **Resultados.** Los valores de corte arrojados por las curvas ROC entre el GF y el GFM para los parámetros principales son: concentración/ml = 23.33×10^6 /ml, movilidad total = 48% y morfología espermática = 7%. **Conclusión.** Como sugiere la OMS y varios autores, presentamos valores de referencia locales para el estudio del semen que orientarían mejor al profesional que trabaja en reproducción.

Palabras claves. Hombres fértiles, semen humano, valores de referencia, infertilidad masculina.

Summary

Introduction. The new reference values recently published by WHO have been matter of discussion by many authors, with controverted opinions. WHO suggests that every region and laboratory must set their corresponding reference values. **Objective.** To evaluate reference values from volunteer men in Cordoba city, whose partner could achieve pregnancy within 12 months, and were currently having a pregnancy no older than 24 weeks. **Design.** Prospec-

Correspondencia: Rosa Isabel Molina
Chacabuco 1123- PB, Córdoba (5000), Argentina.
Tel/Fax: 0351-4682562, 4691986, 155-293523
E-mail: info@lablar.com

*tive, cohort study. **Materials and methods.** 2.487 semen samples were studied, which were separated in 3 groups: Fertile volunteers Group (FVG, n=80), patients seeking fertility counseling, named Unknown Fertility (UFG, n=2.101), and patients with Male Factor (MFG, n=306). Semen parameters were assessed according to WHO 1999. **Results.** Cutoff values depicted by ROC curves between FVG and MFG for main semen parameters were: Concentration/ml = $23,33 \times 10^6$ /ml; Total motility = 48%; Normal sperm morphology = 7%. **Conclusion.** As suggested by WHO and many other authors, we present local reference values for semen study, which could give a better orientation for the Fertility Physician.*

Key words. Fertile men, human semen, reference values, male infertility.

Introducción

Alrededor del 15% de las parejas en edad reproductiva tendrán dificultad para concebir dentro del primer año de búsqueda, y en la mitad de los casos el factor masculino será el responsable.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado la 5^a edición del manual para la evaluación y el procesamiento del semen humano.¹ Este nuevo manual es una excelente herramienta que aporta al Laboratorio de Andrología una estandarización de las técnicas en todos los laboratorios del mundo. No solo detalla las distintas metodologías a utilizar en la examinación y manejo del semen humano, sino que incluye además un apartado sobre control de calidad y nuevos valores de referencia para los parámetros seminales, publicados por Cooper y col previamente.²

Varios trabajos prospectivos han establecido valores de referencia de la calidad seminal en relación a la fertilidad.³⁻¹²

Los nuevos valores de referencia publicados por la OMS han sido discutidos por distintos autores con opiniones controvertidas.¹³⁻¹⁵ Si estos valores son muy altos, un importante porcentaje de hombres fértiles van a ser clasificados como subnormales, especialmente cuando se considera la evaluación de la morfología, movilidad o concentración espermática.¹⁶⁻²⁰ En contraposición, hombres sanos pueden ser investigados por infertilidad o tratados con técnicas de reproducción asistida en forma inapropiada como resultado de valores de referencia muy exigentes.^{21,22}

Por otro lado, distintos autores critican los nuevos valores propuestos por la OMS 2010, sugiriendo que éstos serían muy bajos, sobre todo en lo referente a la evaluación de la morfología espermática, con los cuales se podría llegar a subdiagnosticar un factor masculino en la pareja que consulta por fertilidad.¹³⁻¹⁵

La OMS y Cooper y col sugieren que cada laboratorio debería tener sus propios valores de referencia local para los parámetros seminales.^{1,2}

Hay varias formas posibles para expresar valores normales (VN) en estudios de laboratorio.

Una sería utilizando distribución normal o usando método de percentilos no paramétricos. El límite de referencia en química clínica es ampliamente aceptado que el 95% de los datos deberían estar incluidos en el intervalo de referencia o el percentilo 5% como límite inferior de referencia. Estas pautas no involucran un criterio biológico para demarcar una subpoblación que debería ser considerada anormal. La distribución de valores es considerada como entidad puramente estadística, y los términos “normal” y “anormal” simplemente denotan una proporción particular de uno o ambos extremos de la distribución; frecuentemente se considera el 5% o se expresa el VN como la media \pm 2 SD.

Otra forma sería la determinación de un valor arbitrario por un comité de expertos en la cual se describe el rango de valores que representan biológicamente la capacidad reproductiva normal.

Otra posibilidad sería confeccionar curvas ROC para determinar un valor de corte que discrimine la población fértil de la infértil.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los valores de referencia de una población de voluntarios fértiles de la ciudad de Córdoba que habían logrado el embarazo dentro de los 12 meses de búsqueda y sus parejas estaban cursando con un embarazo no mayor a 24 semanas (6 meses).

Diseño. Trabajo prospectivo.

Materiales y métodos

Se estudiaron 2.482 muestras de semen, las cuales se distribuyeron en 3 grupos: grupo de voluntarios fértiles (GF), grupo de pacientes que consultan por fertilidad, o sea, fertilidad descono-

cida (GFD), y un grupo de pacientes con factor masculino (GFM).

Se estudió el semen de los tres grupos para su comparación, los cuales se detallan a continuación:

1- GF (n: 80): Eran voluntarios sanos que habían logrado el embarazo dentro de los 12 meses de relaciones sexuales no protegidas y cuyas parejas femeninas estaban cursando con un embarazo no mayor a 24 semanas, o sea, que se analizó una muestra lo más cercana posible al semen que logró la concepción.

2- GFD (n: 2,096): varones que consultaban por fertilidad al laboratorio de Andrología y Reproducción (LAR) en el período febrero-diciembre de 2010. Estos pacientes habían tenido relaciones sexuales no protegidas por más de un año y no habían logrado embarazo.

3- GFM (n: 306): pacientes que realizaron tratamientos de alta complejidad por factor masculino puro cuya pareja presentaba una edad menor a 35 años, FSH<15 mUI/ml, respuesta ovárica normal en estimulación (>3 ovocitos), sin diagnóstico de esterilidad femenina.

Las muestras de semen fueron recogidas luego de una abstinencia de 2 a 7 días, por masturbación y analizadas dentro de la hora de su obtención. El análisis del semen se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la OMS 1999.²³ El volumen seminal se determinó por técnica volumétrica. La concentración y motilidad espermática se evaluó en cámara de Makler según método convencional (*Sefi-Medical Instrument*, Haifa, Israel),²⁴ en un microscopio con platina termostaticada. Los

espermatozoides móviles totales se clasificaron en porcentaje de espermatozoides rápidos y lentos, según su velocidad y trayectoria (evaluación subjetiva por técnicos entrenados). La morfología espermática fue evaluada con criterio estricto (CE) empleando la tinción de Papanicolaou y de acuerdo a los criterios de la OMS.²³

El LAR realiza control de calidad interno: Coeficientes de variación intra-operador e inter-operador. Además, está suscripto a un programa de control de calidad externo de la UBA: Programa de Evaluación Externa de Control de Calidad (PEEC).

Estadística

Los datos que presentaron distribución normal se informaron como media \pm DS y los datos no paramétricos como mediana (rango inter cuartil; 25-75).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa *Med Calc*, y para la comparación de los grupos se utilizó *test* no paramétrico de Mann-Whitney para muestras independientes. Para la obtención de un valor de corte que discrimine población fértil de pacientes con factor masculino se utilizaron curvas ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*). Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Los valores (media y mediana) de los parámetros seminales de los tres grupos se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros seminales de pacientes fértiles (GF) con fertilidad desconocida (GFD) y con factor masculino puro (GFM).

	* GF	* GFD	* GFM
Edad (años)	31.4 \pm 5.6	35 (32-38)	33 (31-36)
Abstinencia (días)	4 (3-5.5)	4 (3-5)	4 (3-5)
Volumen (ml)	3.3 \pm 1.8	3.1 (2.1-4.2)	3 (2.2-3.8)
pH	7.6 (7.5-7.7)	7.6 (7.6-7.8)	7.6 (7.6-7.7)
Concentración/ml	56.8 (35.1-102.2)	37.7 (23.2-63.4)	18.3 (3.2-39.8)
Concentración /eyac	181.8 (123.1-333.8)	116.3 (59.4-203.7)	50.1 (8.7-114.3)
Movilidad total (A+B)	60.1 \pm 15.7	52 (38-62)	29 (15.2-46.5)
Movilidad trasl rápida (A)	51 \pm 16.3	36 (22-44)	18.5 (9-34)
Muertos %	11 (6-16)	13 (11-19)	22 (14-34)
Leucocitos/ml	0.13 (0.04-0.25)	0.2 (0.06-0.49)	0.16 (0.05-0.45)
Morfología CE	14.7 \pm 7.5	5 (2-8)	3 (1-6)
Test Hipo-osmótico (HOS)	77.9 \pm 9.0	78 (72-84)	SD
Madurez nuclear	70 \pm 11.9	70 (58-78)	61 \pm 16.3
Cítrico mgr %	414.4 \pm 128.7	358 (308.6-428.6)	390 (328.3-510.4)
Fructosa mgr %	328.2 \pm 133.3	285.7 (206.5-353.4)	340.4 (250.1-425.1)

*Valores con distribución normal se informa media \pm DS y los datos no paramétricos mediana (25-75, rango intercuartil). SD: sin datos.

Los hombres (GF) que habían logrado el embarazo dentro de los 12 meses de relaciones sexuales no protegidas y cuyas parejas femeninas estaban cursando con un embarazo no mayor a 6 meses fueron elegidos como el grupo de referencia. La distribución de los parámetros seminales de esta población se muestra en la Tabla 2. Las Tablas 3 y 4 representan los mismos datos para los hombres del GFD y GFM respectivamente.

En la Figura 1 muestran los gráficos caja para los distintos parámetros seminales de los tres grupos. En la Figura 1 se comparan los distintos grupos de varones estudiados en cuanto a la concentración, movilidad total, morfología espermática. También se observa una diferencia estadística

mente significativa entre los distintos grupos de hombres estudiados en cuanto a movilidad traslativa rápida y concentración total/eyaculado, datos no exhibidos.

Se realizaron curvas ROC que se muestran en Figuras 2, 3 y 4, para los principales parámetros seminales: concentración/ml, movilidad total y morfología espermática CE; obteniéndose valores de corte que discriminan muy bien la población fértil (GF) del grupo de pacientes con factor masculino (GFM). El valor de corte corresponde a la más alta precisión; es decir, mínimo falso negativo y mínimo falso positivo. Se obtuvieron valores de corte con $p < 0.0001$, para concentración/ml = 23.33×10^6 /ml, movilidad total = 48% y morfología espermática = 7%.

Tabla 2. Distribución de valores en percentilos para parámetros seminales de hombres fértiles (GF) cuyas parejas presentaban menos de 6 meses de embarazo.

G. Fértiles	Percentilo									
	N	2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Volumen seminal (ml)	80	0.6	0.8	1.3	2.1	3	4.3	5.7	6.9	7.3
Concentración (10^6 / ml)	80	22.1	23.6	28.2	35	56.8	102	183.9	234.4	241.3
Concentración total (10^6 / eyaculado)	80	27.2	30.92	55.7	116	181	315	535.9	586.4	774.7
Movilidad total (%) A+B	80	22.8	30	39.6	50	62	73.3	76	79.9	83.6
Movilidad progresiva rápida (%) A	80	12.75	25	28.6	40	50	62.5	73	77.8	79.5
Formas normales CE	70	3.0	5	6	9	14.5	19	24	28	35.5
Muertos %	80	3.3	5	5	6	11	16	22.4	27.8	29.7

Tabla 3. Distribución de valores en percentilos para parámetros seminales de pacientes con fertilidad desconocida (GFD).

G. Fertilidad desconocida	Percentilo									
	N	2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Volumen seminal (ml)	2096	0.7	1.1	1.6	2.1	3.1	4.2	5.3	6.3	6.9
Concentración (10^6 / ml)	2096	0.5	2.9	7.7	23	37.7	63.4	112.3	141.6	157.6
Concentración total (10^6 / eyaculado)	2096	1.5	7.7	20.4	59	116	204	313.3	411.2	492.2
Movilidad total (%) A+B	2096	9	13	21	38	52	62	68	73	76
Movilidad progresiva rápida (%) A	2096	2	5	10	22	36	44	52	57	61
Formas normales CE	2096	0	0	1	2	5	8	11	13	15
Muertos %	2096	6	7	8	11	13	19	27	33	42

Tabla 4. Distribución de valores en percentilos para parámetros seminales de pacientes con factor masculino puro (GFM).

G. Factor masculino puro	Percentilo									
	N	2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Volumen seminal (ml)	306	0.8	1.1	1.5	2.2	3	3.8	5	5.9	6.4
Concentración (10^6 / ml)	306	0.1	0.2	0.4	3.2	18.3	39.8	55.4	78.5	95.7
Concentración total (10^6 / eyaculado)	306	0.3	0.5	1.3	8.2	42.8	110	209.3	255.1	289.6
Movilidad total (%) A+B	306	1	3	6	15	29	46.5	65	70	75
Movilidad progresiva rápida (%) A	306	1	2	3.7	9	18.5	34	50	60	70
Formas normales CE	284	0	0	1	1	3	6	11	14.3	17.4
Muertos %	306	6.2	8	11	14	22	34	42.9	52.4	62.9

Figura 1. Gráficos de caja comparando diferentes parámetros seminales entre el grupo fértil (GF), grupo con factor masculino puro (GFM) y el grupo con fertilidad desconocida (GFD). Los **boxes** representan el cuartilo superior e inferior (25-75) y la línea dentro de ellas la mediana. Las líneas se extienden hasta el mínimo y máximo valor. Corresponde a un valor de $p < 0.0001$.

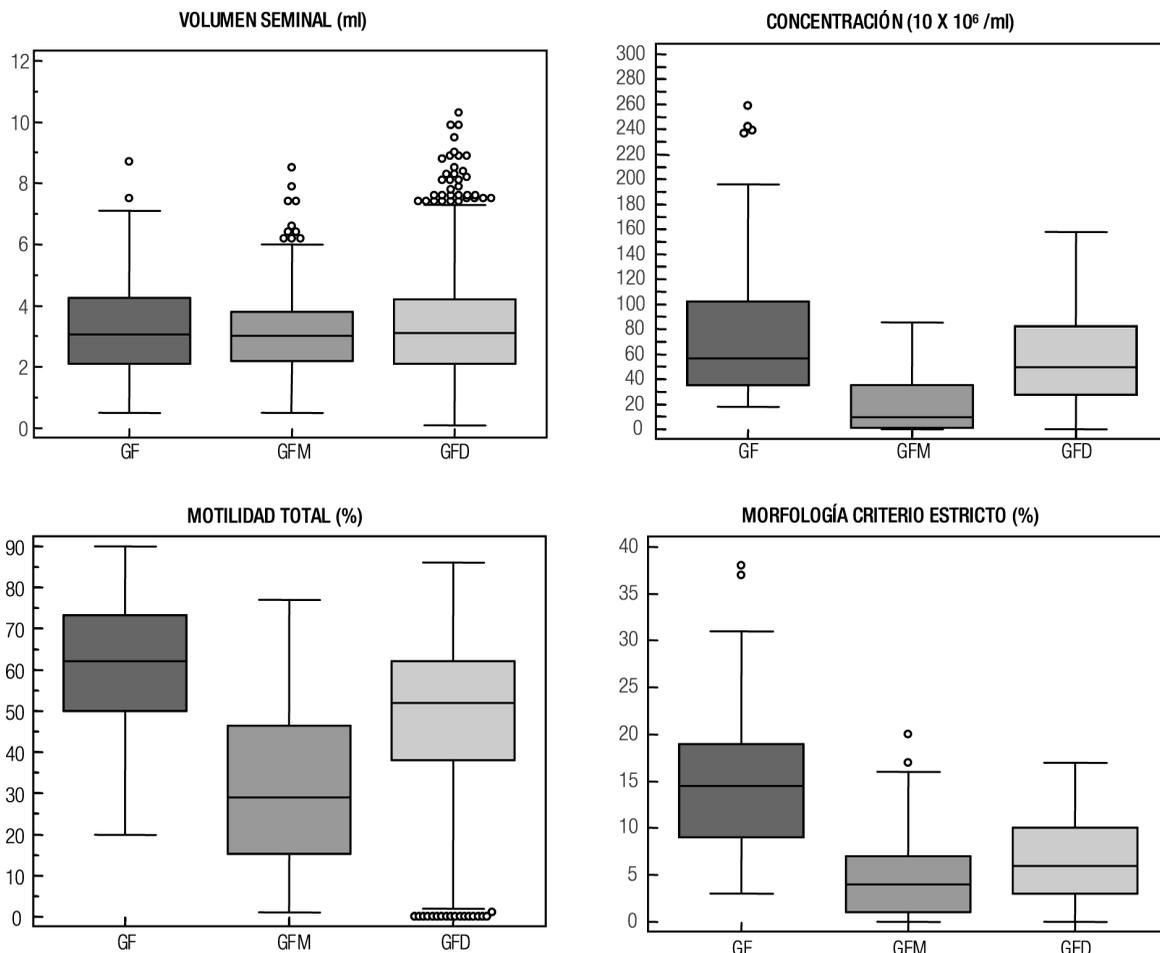


Figura 2. Curva ROC para concl/ml entre GF y GFM. Valor de corte = $23,33 \times 10^6/\text{ml}$. Especificidad 97%, sensibilidad 54%, área bajo la curva 8,832. $P < 0.001$.

Figura 3. Curva ROC movilidad total entre GF y GFM. Valor de corte = 48%. Especificidad 81.7%, sensibilidad 76%, área bajo la curva 0.85. $P < 0.001$.

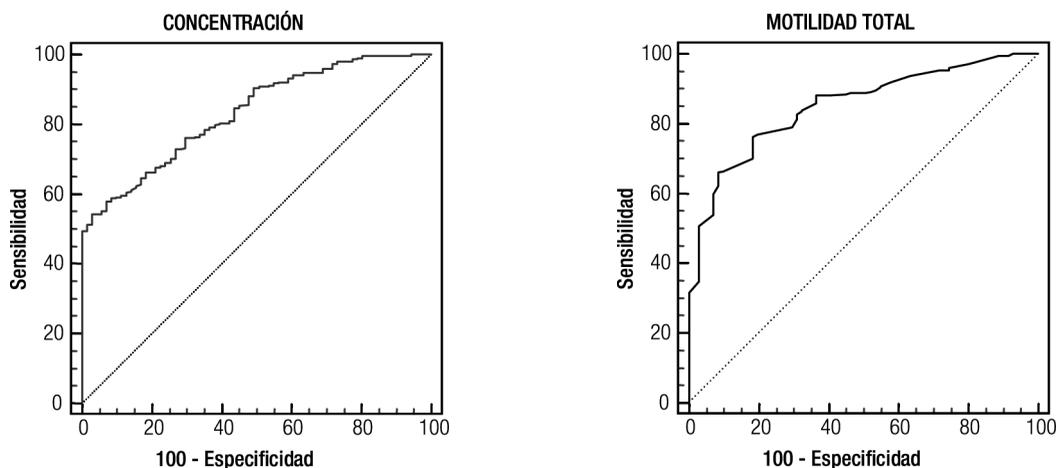
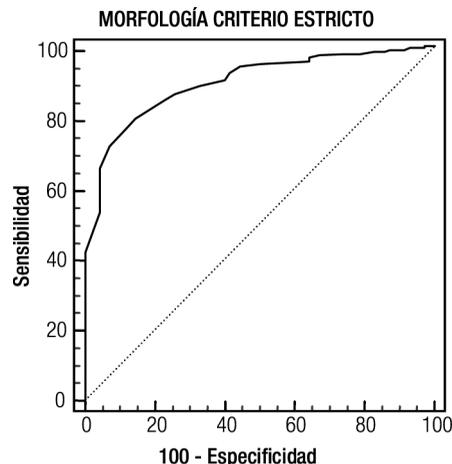


Figura 4. Curva ROC para morfología espermática CE entre GF y GFM.

Valor de corte = 7%. Especificidad 85.7%, sensibilidad 79.6%, área bajo la curva 0.89. $P < 0.001$.



Discusión

El nuevo manual de la OMS 2010 publica los nuevos valores de referencia para el semen humano, los cuales fueron reportados previamente por Cooper y col.²

Luego de su publicación ha habido múltiples discrepancias en la adhesión a los nuevos valores de referencia. En el manual también sugieren que cada laboratorio o cada región deberían tener sus propios valores de referencia. Nuestro grupo estudió hombres con fertilidad *probada* reciente para poder obtener datos locales de los parámetros seminales. Según normas internacionales, para determinar valores de referencia de un determinado parámetro o compuesto biológico, se recomiendan 120 determinaciones.³² Si bien nuestro trabajo no totaliza el número requerido, se debe tener en cuenta que es dificultosa la recopilación de voluntarios - donantes debido al tipo de muestra biológica requerida y los criterios de inclusión a tener en cuenta. Varios trabajos utilizados para obtener los valores de referencia en la publicación de Cooper y col sobre la cual se basa el nuevo manual de la OMS 2010 no cuentan con el "N" establecido por dichas normas.^{2,33-36}

Con respecto al trabajo de Cooper y col, este trabajo además de contener datos de la población

local, tiene la ventaja que se realizó en un mismo laboratorio por dos operadores entrenados, con control de calidad interno y externo, en un período corto de tiempo. En el trabajo de Cooper y col, se agruparon datos de varios centros, en un largo período de tiempo, y algunos laboratorios no realizaban estrictos controles de calidad interna y externa.

Varios autores han reportado que habría una tendencia a disminuir los parámetros seminales de los hombres, posiblemente como resultado de ciertos factores ambientales adversos y estilos de vida a los cuales toda la población se encuentra expuesta.²⁵⁻²⁷ Entre ellos la población fértil también expuesta sufriría una alteración en la producción espermática y por eso se observa cómo a través de los años han ido disminuyendo los valores de referencia.

En cuanto a la concentración espermática, nuestro valor de corte arrojado por las curvas ROC estaría en acuerdo con el publicado por la edición anterior del manual OMS 1999.²³ Otros autores proponen un valor de referencia superior para la concentración espermática. Estos autores sugieren que por debajo de 40×10^6 espermatozoides /ml, disminuyen la probabilidades de embarazo.²⁸⁻³⁰

En cuanto a la movilidad espermática, si bien el percentilo 5% de nuestra población concordaría con la propuesta por Cooper y col, el valor de corte de las curvas ROC coincide con el propuesto por OMS 1999. Nosotros consideramos que las curvas ROC son de mayor utilidad que el percentilo 5% para poder obtener valores de referencias de corte que nos discriminen bien la población fértil de los infértiles.

El valor de referencia de la morfología propuesto por el nuevo manual ha sido también discutido.¹⁵ Si bien el valor del percentilo inferior (percentilo 5) en nuestro trabajo es cercano al propuesto por la OMS (4%), en las curvas ROC obtuvimos un valor superior (7%) que discrimina con significancia estadística las dos poblaciones. En un trabajo anterior de nuestro grupo en el cual analizamos 39 voluntarios fértiles el valor de corte de las curvas ROC para la morfología CE fue de 9%, pero la población que utilizamos para confeccionar las curvas fue un grupo de fertilidad desconocida.³¹ Este trabajo, además de estudiar

un número mayor de individuos fértiles, se utiliza para obtener el valor de corte una población con factor masculino puro. Lo que se quiere lograr es obtener un valor de corte que discrimine con la mayor especificidad y sensibilidad posible la población fértil de la infértil por factor masculino.

Con los nuevos valores de referencia de la OMS 2010, siendo éstos bajos sobre todo en la evaluación de la morfología y movilidad espermática, se podría llegar a subdiagnosticar un factor masculino. Por este motivo nosotros consideramos que los valores de referencia que obtuvimos para nuestra población local serían una mejor ayuda de orientación para el especialista en reproducción, quien debe tomar conductas terapéuticas y eficaces que lleven a la pareja que consulta por fertilidad a lograr el éxito reproductivo.

Conclusión

Como sugiere la OMS y varios autores, presentamos valores de referencia locales para el estudio del semen que orientarán mejor al profesional que trabaja en reproducción.

Los valores de referencia para parámetros principales del semen son los siguientes: concentración/ml = 23.33×10^6 /ml, movilidad total = 48% y morfología espermática = 7%.

Referencias

- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
- Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2009 Vol:0 N: 0 1-15.
- Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. J Androl 2000;21:145-153.
- Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. N Engl J Med 1995;332:281-285.
- Jouannet P, Czyglik F, David G, Mayaux MJ, Spira A, Moscato ML, Schwartz D. Study of a group of 484 fertile men. Part I: distribution of semen characteristics. Int J Androl 1981;4:440-449.
- Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, Redmon JB, Wang C, Overstreet JW. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. Environ Health Perspect 2003;111:414-420.
- Eustache F, Auger J, Cabrol D, Jouannet P. Are volunteers delivering semen samples in fertility studies a biased population? Hum Reprod 2004;19:2831-2837.
- Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. Hum Reprod 2002;17:503-515.
- Haugen TB, Egeland T, Magnus O. Semen parameters in Norwegian fertile men. J Androl 2006;27:66-71.
- Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T, Tanaka SN, Naka M, Skakkebaek NE, Jorgensen N. Semen quality of 324 fertile Japanese men. Hum Reprod 2006;21:760-765.
- Pal PC, Rajalakshmi M, Manocha M, Sharma RS, Mittal S, Rao DN. Semen quality and sperm functional parameters in fertile Indian men. Andrologia 2006;38:20-25.
- Stewart TM, Liu DY, Garrett C, Jorgensen N, Brown EH, Baker HWG. Associations between andrological measures, hormones and semen quality in fertile Australian men: inverse relationship between obesity and sperm output. Hum Reprod 2009;24:1561-1568.
- Michael Joffe. Semen quality analysis and the idea of normal fertility. Asian Journal of Andrology 2010;12:79-82.
14. W. C. L. Ford Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen Asian Journal of Andrology 2010;12:59-63.
- Eliasson R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. Asian J Androl 2010;12:26-32.
- Barratt CL, Dunphy BC, Thomas EJ, Cooke ID. Semen characteristics of 49 fertile males. Andrologia 1988;20:264-269.
- Chia SE, Tay SK, Lim ST. What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men. Hum Reprod 1998;13:3394-3398.
- Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. Fertil Steril 2006;85:629-634.
- Gao J, Gao ES, Yang Q, Walker M, Wu JQ, Zhou WJ, Wen SW. Semen quality in a residential, geographic and age representative sample of healthy Chinese men. Hum Reprod 2007;22:477-484.
- Gao J, Gao ES, Walker M, Yang Q, Wu JQ, Zhu QX, Wen SW. Reference values of semen parameters for healthy Chinese men. Urol Int 2008;81:256-262.
- Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Has the fertility of Danish men declined through the years in terms of semen quality? A comparison of semen qualities between 1952 and 1972. Int J Fertil 1983;28:91-95.
- Lemcke B, Behre HM, Nieschlag E. Frequently subnormal semen profiles of normal volunteers recruited over 17 years. Int J Androl 1997;20:144-152.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1999.

24. Makler A. The improved ten microliter chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril* 1980;33:337.
25. Menkveld R, Van Zyl JA, Kotze TJvW, Joubert G. Possible changes in male fertility over a 15-year period. *Arch Androl* 1986;17:143-144.
26. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 1992;305:609-613.
27. Fisch H. Declining worldwide sperm counts: disproving a myth. *Urol Clin N Am* 2008;35:137-146.
28. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 1998;352:1172-1177.
29. Lama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002;17:503-515.
30. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-1393.
31. Sanchez Sarmiento C, Molina R, Tissera A, Senestrari D. Valores de semen y estudio de la morfología espermática según criterio estricto de Kruger en hombres probadamente fértiles. *Reproducción* 2000;15(4).
32. C28-A2. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Second Edition. NCCLS Infobase User Manual.
33. Haugen TB, Egeland T, Magnus O. Semen parameters in Norwegian fertile men. *J Androl* 2006;27:66-71.
34. Meriggiola MC, Bremner Wj, Paulsen CA, Valdiserri A, Incorvaia L, Motta R, Flamigni C. A combined regimen of cyproterone acetate and testosterone enanthate as a potentially highly effective male contraceptive. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3018-3023.
35. McLachlan RI, McDonald J, Rishford D, Robertson DM, Garret C, Baker HW. Efficacy and acceptability of testosterone implants, alone or in combination with a 5 reductasa inhibitor, for male hormonal contraception. *Contraception* 2000;62:73-78.
36. Kamischke A, Simoni M, Schrameyer K, Lerchl A, Nieschlag E. Is Inhibin B a pharmacodynamic parameter for FSH in normal men? *Eur J Endocrinol* 2001;144:629-637.