

# Valor predictivo de la secreción de las glándulas sexuales anexas masculinas (GSAM) en los resultados de fertilización in vitro

Conrado Avendaño,<sup>1,2,3,6</sup> Constanza Grand Martín,<sup>4</sup> Irma Paredes,<sup>5</sup> Miriam Rolón,<sup>5</sup> Roger Molinas,<sup>5</sup> Claudio Bisioli<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Nascentis Medicina Reproductiva. Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup> Lac Trelew. Trelew, Chubut, Argentina.

<sup>3</sup> Dibac. Trelew, Chubut, Argentina.

<sup>4</sup> Pregna, Medicina Reproductiva. CABA, Argentina.

<sup>5</sup> Neolife, Medicina y Cirugía Reproductiva. Asunción, Paraguay.

<sup>6</sup> Actualmente en Gyenesis Salud y Fertilidad. Córdoba, Argentina.

Reproducción 2017;32:15-22

## Resumen

**Introducción:** Frente a un procedimiento de reproducción asistida, la decisión de realizar una fertilización in vitro (FIV) o una inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se basa generalmente en estándares seminales subjetivos básicos (concentración, movilidad y morfología). Por otro lado, el análisis de la secreción de las glándulas sexuales anexas masculinas (GSAM) en la evaluación del hombre infértil ha caído en desuso, debido a la ausencia de estudios

clínicos. Sin embargo, en modelos animales se ha demostrado una correlación entre la calidad de la secreción de estas glándulas y la reproducción. **Objetivo:** determinar el grado de relación entre la secreción de las GSAM y la capacidad fecundante de los espermatozoides. **Diseño:** descriptivo, de cohorte, comparativo, transversal, multicéntrico. **Material y Métodos:** se incluyeron 46 muestras de pacientes tratados con FIV. La secreción de vesículas seminales y próstata fue estimada por la concentración en plasma seminal de fructosa y ácido cítrico, respectivamente. Se registró secreción normal o patológica. **Resultados:** existe un efecto negativo principalmente en la hipersecreción prostática sobre la tasa de fertilización. **Conclusiones:** se describe, por primera vez, la utilización de un biomarcador proveniente de las GSAM que permite seleccionar los pacientes para FIV convencional a partir de un método sencillo y no subjetivo.

---

**Correspondencia:** Conrado Avendaño  
Correo electrónico: andrologiachubut@yahoo.com.ar

**Palabras claves.** GSAM, capacidad fecundante, hipersecreción prostática, tasa de fertilización, FIV.

## Predictive value of male accessory sex glands (MASG) secretions on in vitro fertilization outcomes

### Summary

*The use of conventional in vitro fertilization (IVF) has been declining worldwide while intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has dramatically increased. Clinical arguments are controversial and include increased embryos to transfer or improvement fertilization rate with ICSI. The criteria to choose the assisted reproductive technique are based upon the basic seminal parameters (concentration, motility and morphology). The evaluation of male accessory sex glands (MASG) secretions has fallen into disuse for basic evaluation of male fertility, due to the absence of clinical studies. However, a positive effect on reproduction has been showed in animal models. This controlled, prospective, multicenter study was designed to determine the effect of MASG secretions on the sperm fertility potential. The major finding in this study is that prostatic hyper-secretion may have a negative impact in the fertilization rate. We have shown for the first time, the usefulness of evaluating MASG secretions to choose the best treatment for each patient.*

**Key words.** MASG, fertility potential, prostatic hypersecretion, fertilization rate, IVF.

### Introducción

La reproducción asistida de alta complejidad ha permitido que, luego del primer bebé en 1978, hayan nacido más de 5 millones de niños en todo el mundo.<sup>1, 2</sup> La técnica de fertilización in vitro (FIV) ha sido utilizada con éxito a partir de ese año, en pacientes con obstrucción tubaria e infertilidad masculina moderada.<sup>3</sup> La aparición de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) permitió inicialmente que parejas que no podían lograr el embarazo utilizando FIV convencional por diagnóstico de factor masculino severo pudieran hacerlo con esta técnica.<sup>4</sup>

Sin embargo, en la actualidad el ICSI se ha

convertido en el método de elección para la gran mayoría de los tratamientos de reproducción asistida, sin importar la etiología de la infertilidad, mientras que la utilización clínica de la FIV convencional ha disminuido.<sup>5-11</sup> La explicación a este fenómeno, aunque controvertida, se ha justificado en la mayor obtención de embriones al día de la transferencia o un aumento en la tasa de fertilización con la técnica de ICSI, entre otros motivos.

Los espermatozoides necesitan experimentar diferentes procesos fisiológicos para adquirir la capacidad fecundante, que en su conjunto son conocidos como proceso de capacitación.<sup>12</sup> Asimismo, en el momento de la eyaculación, los espermatozoides se enfrentan a los líquidos seminales provenientes de las glándulas sexuales anexas masculinas (vesículas seminales y próstata, principalmente). Se ha demostrado que el plasma seminal tiene una variedad de acciones tanto en las gametas como en el tracto reproductor femenino.<sup>13</sup> Además, la remoción de algunas o todas las glándulas sexuales accesorias afecta la fertilidad en cobayos,<sup>14</sup> ratas,<sup>15</sup> ratones<sup>16</sup> y hámsters.<sup>17</sup> Una gran cantidad de componentes, principalmente proteínas, aunque también vesículas, fueron aisladas y caracterizadas en plasma seminal y han sido asociadas con efectos sobre la función de los espermatozoides y la fertilidad.<sup>18</sup> Algunas de estas proteínas se unen específicamente a los espermatozoides favoreciendo o modulando la capacitación o la fertilización.<sup>12</sup> Muchas de ellas han sido identificadas en plasma seminal humano, aunque su función no ha sido comprobada.

Los valores seminales para discernir qué técnica de reproducción asistida se usará en cada paciente se basan generalmente en los estándares básicos subjetivos (concentración, movilidad y morfología) propuestos por la Organización Mundial de la Salud.<sup>19</sup> Sin embargo, estos parámetros han sido ampliamente cuestionados.<sup>20-22</sup> Por otro lado, la evaluación de la secreción de las glándulas sexuales anexas masculinas fueron siendo dejadas de lado en la evaluación rutinaria del hombre infértil, circunscribiéndose exclusivamente a situaciones patológicas específicas como la azoospermia o infecciones del tracto reproductor.

Teniendo presente el efecto de la secreción de las vesículas seminales y la próstata demostrado en modelos animales, el objetivo de este trabajo fue evaluar el posible valor predictor del éxito en FIV convencional mediante la estimación no subjetiva de la secreción de las glándulas anexas.

## Materiales y Métodos

**Muestras:** se estudiaron un total de 46 muestras de pacientes que fueron tratados mediante FIV convencional. Las muestras de semen fueron recolectadas por masturbación y luego de la licuefacción se evaluó la concentración, movilidad y morfología espermática de acuerdo con las especificaciones de la OMS.<sup>19</sup> Una porción de la muestra de semen de cada paciente utilizada para el tratamiento fue centrifugada para obtener el plasma seminal y conservadas a -16 °C hasta el momento de la evaluación.

**FIV convencional:** luego de la punción de los folículos, los complejos de cúmulus-ovocito (CCOs) fueron cuidadosamente lavados en medio HTF modificado suplementado con 3% de albúmina de suero humano (HTF/alb) y colocados en 0,5 ml de medio G-IVF Plus (Vitrolife Sweden AB, V. Frölunda, Suecia) cubierto con aceite mineral Ovoil (Vitrolife Sweden AB) en placas de Petri de 4 pozos (Nunclon, Nunc, Dinamarca), donde permanecieron hasta el momento de la inseminación. Los espermatozoides se seleccionaron a través de gradientes discontinuos de densidad 90 y 50% (SpermGrad), seguido de un lavado en medio HTF/alb. Los pellets se resuspendieron en un volumen apropiado del mismo medio. La FIV se llevó a cabo 4-6 horas después de la extracción de los ovocitos en las mismas placas de Petri de 4 pozos en las que los CCOs permanecían desde el momento de su captación; cada pocillo contenía de 1 a 4 CCOs. La cantidad de espermatozoides inseminados fue ajustado a aproximadamente 200.000 células móviles. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C en una atmósfera seca de 5,8% de CO<sub>2</sub> y 7% de O<sub>2</sub> en aire. Diecisiete horas más tarde, los ovocitos inseminados fueron inspeccionados cuidadosamente para detectar la presencia de

dos pronúcleos (2PN), a través de un microscopio invertido equipado con óptica diferencial de contraste de interferencia Hoffman. La tasa de fertilización fue calculada dividiendo el número de células con 2PN por la cantidad de ovocitos inseminados.

**Determinación de la secreción de las vesículas seminales y próstata:** la secreción de las vesículas seminales y la próstata fue estimada a partir de la evaluación de la concentración en plasma seminal de fructosa y ácido cítrico, respectivamente. Brevemente, la concentración de fructosa fue evaluada a partir del método colorimétrico utilizando resorcinol en medio ácido, previa precipitación deferencial de proteínas con ZnSO<sub>4</sub> en medio alcalino, desarrollado por Roe.<sup>23</sup> Para determinar la concentración de ácido cítrico se utilizó el método colorimétrico de piridina en medio anhidro, previa precipitación de proteínas con ácido tricloro acético desarrollado por Chambon.<sup>24</sup> Los valores de fructosa entre 150 y 450 mg% y de ácido cítrico entre 350 y 670 mg% fueron considerados normo-secretores, mientras que los valores inferiores o superiores a los mencionados fueron considerados patológicos, hipo e hiper secreción respectivamente.<sup>25</sup>

**Diseño:** estudio descriptivo, de cohorte, comparativo, transversal multicéntrico. La FIV convencional fue realizada en dos centros de medicina reproductiva. Los plasmas seminales de cada muestra fueron conservados y analizados en otro centro, sin información de los resultados de la técnica de reproducción asistida. Luego de las determinaciones de los marcadores de las glándulas anexas, las muestras fueron separadas y se plantearon dos escenarios posibles según los resultados obtenidos. Escenario 1: Fructosa: grupo normo-secretor ( $\geq 150-450 \leq$  mg%) y grupo patológicos ( $< 150-450 >$  mg%). Ácido cítrico: grupo normo-secretor ( $\geq 350-670 \leq$  mg%) y grupo patológicos ( $< 350-670 >$  mg%). Escenario 2: Fructosa: grupo normo-secretor ( $\geq 150-450 \leq$  mg%), grupo hipo-secreción ( $< 150$  mg%) y grupo hiper-secreción ( $> 450$  mg%). Ácido Cítrico: grupo normo-secretor ( $\geq 350-670 \geq$  mg%), grupo hipo-secreción ( $< 350$  mg%) y grupo hiper-secreción ( $> 670$  mg%). En cada uno de estos grupos

se comparó la edad de los pacientes, los análisis de semen básico, el número de ovocitos metafase II recuperados y la tasa de fertilización. Se excluyeron las pacientes con menos de 4 ovocitos metafase II (MII). Las muestras fueron evaluadas por duplicados y el promedio fue informado.

Análisis estadístico: todos los datos fueron analizados utilizando el programa SPSS14.0. El análisis comparativo entre los grupos fue realizado utilizando el test U de Mann-Whitney. Los resultados fueron expresados en media  $\pm$  error estándar. Valores de significancia  $< 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## Resultados

La edad media de las mujeres fue  $36,5 \pm 0,7$  y de los hombre  $36,4 \pm 1,3$ . No hubo diferencias estadísticamente significativas en la edad de los pacientes, los parámetros seminales básicos y los ovocitos recuperados entre los grupos normo-secretores y patológicos. Las medias de cada grupo son mostradas en la Tabla 1.

**Escenario 1:** el 22 % (n: 10) de los pacientes presentaron una secreción de vesículas seminales fuera de los rangos de normalidad establecidos. No se observaron diferencias significativas entre el grupo normo-secretor en relación con el gru-

po patológico en la secreción de esta glándula en cuanto a la tasa de fertilización ( $0,79 \pm 0,03$  vs.  $0,76 \pm 0,06$  respectivamente,  $p > 0,05$ ), Figura 1a.

Por otro lado, el 48% (n: 22) de los pacientes presentaron una secreción protática fuera de los rangos de normalidad establecidos. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de fertilización entre el grupo normo-secretor y el grupo patológico ( $0,86 \pm 0,03$  vs.  $0,71 \pm 0,04$ , respectivamente,  $p < 0,01$ ), Figura 1b.

**Escenario 2:** los pacientes con hipo o híper secreción de las vesículas seminales no mostraron diferencias significativas en las tasas de fertilización respecto del grupo normo-secretor ( $0,77 \pm 0,1$  vs.  $0,79 \pm 0,03$  y  $0,74 \pm 0,08$  vs.  $0,79 \pm 0,03$  para hipo-secreción (n: 5) vs. normo-secretor (n: 36) e híper-secreción (n: 5) vs. normo-secretor (n: 36,  $p > 0,05$ ), Figura 2a.

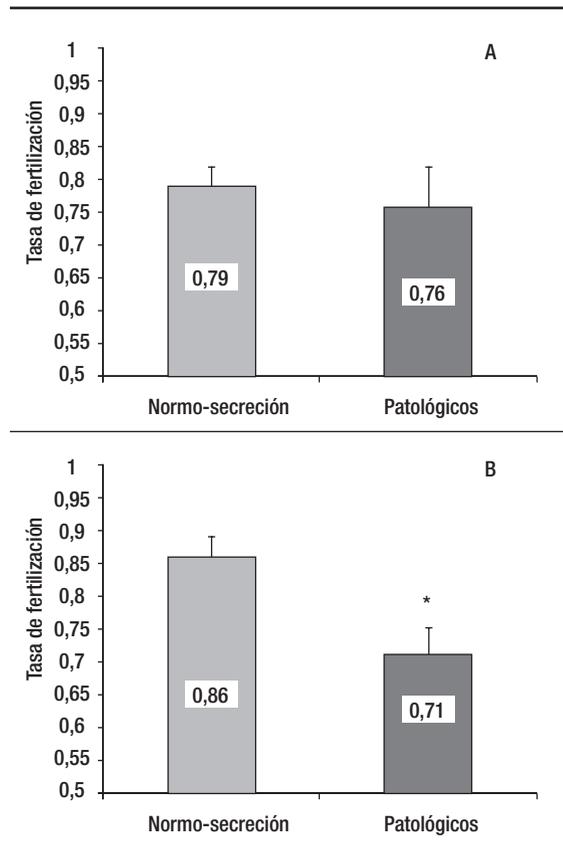
Los pacientes con hipo-secreción prostática (n: 5) no presentaron diferencias significativas en las tasas de fertilización respecto del grupo normo-secretor (n: 24) ( $0,78 \pm 0,08$  vs.  $0,86 \pm 0,03$ , respectivamente,  $p > 0,05$ ), Figura 2b.

Los pacientes con híper-secreción prostática (n: 17) mostraron una diferencia significativa en las tasas de fertilización con respecto del grupo normo-secretor (n: 24) ( $0,69 \pm 0,05$  vs.  $0,86 \pm 0,03$ , respectivamente,  $p < 0,01$ ), Figura 2b.

**Tabla 1.** Media de los parámetros evaluados en relación con la secreción de fructosa y ácido cítrico.

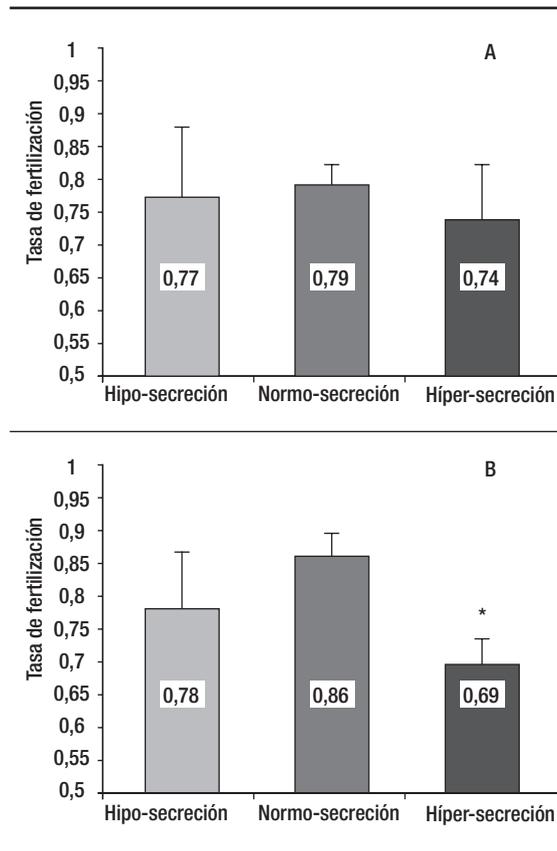
Parámetro	Fructosa normo-secreción media $\pm$ ES (n: 36)	Fructosa secreción patológica media $\pm$ ES (n: 10)	Ácido cítrico normo-secreción media $\pm$ ES(n: 24)	Ácido cítrico secreción patológica media $\pm$ ES (n: 22)
Edad mujer (años)	$36,4 \pm 0,6$	$36,5 \pm 1,1$	$36,7 \pm 0,7$	$36,0 \pm 0,9$
Edad hombre (años)	$37,7 \pm 1,3$	$36,5 \pm 0,9$	$38,3 \pm 0,7$	$36,5 \pm 2,0$
Concentración espermática $\times 10^6/\text{mL}$	$81,3 \pm 8,4$	$82,4 \pm 10,1$	$78,2 \pm 7,8$	$85,2 \pm 11,8$
Movilidad progresiva (%)	$39,9 \pm 2,2$	$45 \pm 7,7$	$44,0 \pm 2,8$	$37,7 \pm 3,9$
Morfología normal espermática (%)	$7,6 \pm 0,6$	$8,4 \pm 1,8$	$8,0 \pm 0,9$	$7,5 \pm 0,9$
Ovocitos MII	$8,6 \pm 0,6$	$8,6 \pm 0,9$	$9,2 \pm 0,7$	$7,9 \pm 0,7$

**Figura 1. a)** Media de la tasa de fertilización de ovocitos provenientes de pacientes con normo-secreción y secreción patológica de las vesículas seminales. **b)** Media de la tasa de fertilización provenientes de pacientes con normo-secreción y secreción patológica de la próstata.



\* < 0,01

**Figura 2. a)** Media de la tasa de fertilización proveniente de pacientes con normo-secreción, hipo-secreción e hiper-secreción de las vesículas seminales. **b)** Media de la tasa de fertilización proveniente de pacientes con normo-secreción, hipo-secreción e hiper-secreción de la próstata.



\* < 0,01

## Discusión

Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en humanos a nivel mundial que propone un efecto negativo de la secreción anormal de la próstata sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides. Si bien el número de pacientes evaluados no es elevado, nuestros resultados demuestran que una hiper-secreción prostática puede disminuir la tasa de fertilización luego de una FIV.

La aparición de la ICSI es uno de los mayores avances en la historia de la medicina reproductiva humana, ya que ha permitido que parejas con diferentes tipos de infertilidad puedan lograr el embarazo.<sup>4</sup> Sin embargo, es una práctica más costosa que la FIV convencional y representa un

riesgo mayor para las gametas, ya que aumenta el tiempo y grado de manipulación.<sup>26</sup>

Los criterios para tratar a un paciente con FIV convencional o con ICSI se basan principalmente en los análisis básicos de calidad seminal (concentración, movilidad y morfología). Los pacientes con severa teratozoospermia, así como hombres con astenozoospermia, presentan bajas tasas de fertilización por FIV convencional,<sup>27,28</sup> el beneficio del uso del ICSI en estos casos ha sido ampliamente demostrado. Sin embargo, en situaciones no tan extremas, la elección de una técnica o la otra es controvertida.<sup>29</sup> Algunos autores han evaluado la posibilidad de usar otros tipos de parámetros seminales para discernir que método de inseminación usar. A

partir de la evaluación subjetiva de la movilidad híperactivada y de la reacción acrosómica se ha demostrado que las muestras con mayor híperactivación y que experimentan reacción acrosomal tienen mayores tasas de fertilización.<sup>30</sup> Sin embargo estos métodos continúan siendo subjetivos, experimentales, costosos y no estandarizados.<sup>31</sup>

Luego de la eyaculación, los espermatozoides deben experimentar una serie de modificaciones que en su conjunto se denominan capacitación espermática, indispensables para la normal penetración y fusión del espermatozoide con el ovocito.<sup>12</sup> Las glándulas sexuales anexas masculinas aportan la mayor cantidad del plasma seminal donde los espermatozoides son suspendidos. Algunas de las proteínas que son aportadas por estas glándulas se unen a los espermatozoides de forma efectiva en el momento de la eyaculación y pueden modular la capacidad fisiológica de estos.<sup>12,32</sup> Entre estos efectos se puede mencionar la modificación de la movilidad de los espermatozoides,<sup>33</sup> la capacitación espermática<sup>12</sup> y la reacción acrosómica.<sup>34</sup>

Además, en modelos animales se ha demostrado que embriones generados a partir de espermatozoides de machos con ausencia total o parcial de las glándulas anexas mostraron un cambio en el ciclo celular y un retraso en la división durante el desarrollo preimplantatorio. Del mismo modo, se ha observado una mayor incidencia de la apoptosis, una mayor proporción de embriones degenerados, una menor tasa de implantación y, por lo tanto, una reducción de la fertilidad.<sup>35-37</sup> Además, se ha visto que la utilización de espermatozoides que no tuvieron contacto con las secreciones de las glándulas anexas dieron lugar a progenies con rasgos anormales.<sup>38</sup>

En humanos se ha estudiado sin éxito la correlación entre la secreción de las glándulas anexas y la concepción. Estudios previos, evaluaron las concentraciones de fructosa, ácido láctico, ácido cítrico y carnitina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en hombres infértiles y los compararon con el éxito de la fertilización in vitro convencional, sin encontrar ningún tipo de correlación.<sup>39</sup> El estudio aquí presentado fue di-

señado para determinar si existe algún grado de relación entre la secreción de las dos principales glándulas sexuales anexas masculinas y la capacidad fecundante de los espermatozoides. Para ello, se evaluó la secreción de dos constituyentes del plasma seminal y marcadores específicos de las vesículas seminales y la próstata, como la fructosa y el ácido cítrico. Se obtuvieron un total de 46 muestras de parejas infértiles, que fueron tratadas con fertilización in vitro convencional en búsqueda de concepción.

Los pacientes fueron separados en grupos de acuerdo con la capacidad secretora de las glándulas anexas: normo-secretores y patológicos (hipo e híper-secreción). Encontramos una clara diferencia de la tasa de fertilización cuando se compararon pacientes normo-secretores con pacientes patológicos en la secreción prostática. Asimismo, nuestros resultados mostraron que existe un efecto negativo principalmente en la híper-secreción prostática sobre la tasa de fertilización, mientras que esa tendencia se observó en el grupo con hipo secreción, pero no fue significativa.

Todas las muestras de semen evaluadas en el estudio estaban dentro de los rangos aceptables para la realización de la FIV y no se encontraron diferencias en las características femeninas. Por lo que podemos postular que la tasa de fertilización baja no estaba relacionada con las condiciones de calidad de los ovocitos o de laboratorio.

En este trabajo multicéntrico hemos demostrado que la evaluación de la secreción de las glándulas anexas puede ayudar a seleccionar el tratamiento de reproducción asistida. Pacientes con secreción normal de la próstata muestran una tasa de fertilización estadísticamente mayor que la de los pacientes con hiper-secreción prostática, cuando los valores de calidad seminal básicos son similares. Hemos descrito por primera vez la utilización de un biomarcador proveniente de las glándulas sexuales anexas masculinas a partir de un método sencillo y no subjetivo, que permite seleccionar los pacientes con altas probabilidades de éxito en los tratamientos de reproducción asistida. Es necesario ampliar el número de casos para confirmar los hallazgos.

## Referencias

- Franklin S. Conception through a looking glass: the paradox of IVF. *Reprod Biomed Online* 2013; 27 (6): 747-755. PubMed PMID: 24139598.
- ESHRE. <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ART-fact-sheet.aspx>. 2014.
- Arslan M, Bocca S, Mirkin S et al. Controlled ovarian hyperstimulation protocols for in vitro fertilization: two decades of experience after the birth of Elizabeth Carr. *Fertil Steril* 2005; 84 (3): 555-569. PubMed PMID: 16169382.
- Palermo GD, Neri QV, Rosenwaks Z. To ICSI or Not to ICSI. *Semin Reprod Med* 2015; 33 (2): 92-102. PubMed PMID: 25734347.
- REDLARA. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. [http://redlara.com/aa\\_espanhol/registro.asp](http://redlara.com/aa_espanhol/registro.asp).
- SAMeR. Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva. RAFA. [http://www.samer.org.ar/rafa\\_presentacion.asp](http://www.samer.org.ar/rafa_presentacion.asp).
- CDC. <http://www.cdc.gov/art/reports/index.html>.
- Kupka MS, D'Hooghe T, Ferraretti AP et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2016; 31 (2): 233-248. PubMed PMID: 26740578.
- Sullivan EA, Zegers-Hochschild F, Mansour R et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2004. *Hum Reprod*. 2013; 28 (5): 1375-1390. PubMed PMID: 23442757.
- Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2005. *Fertil Steril* 2014; 101 (2): 366-378. PubMed PMID: 24188870.
- Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Crosby JA et al. Latin American Network of Assisted R. Assisted reproductive techniques in Latin America: the Latin American Registry, 2013. *Reprod Biomed Online* 2016. PubMed PMID: 26997476.
- Fraser LR. The modulation of sperm function by fertilization promoting peptide. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl 4): 1-10. PubMed PMID: 10091053.
- Mann T, Lutwak-Mann C. *Male Reproductive Function and Semen*: Springer-Verlag, Berlin; 1981.
- Lawlah JW. Studies on the physiology of the accessory glands of the male guinea pig. *The Anatomical Record* 1930; 45: 163-175.
- Queen K, Dhabuwala CB, Pierrepont CG. The effect of the removal of the various accessory sex glands on the fertility of male rats. *J Reprod Fertil* 1981; 62 (2): 423-426. PubMed PMID: 7252923.
- Pang SF, Chow PH, Wong TM. The role of the seminal vesicles, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *J Reprod Fertil*. 1979; 56 (1): 129-132. PubMed PMID: 469833.
- Chow PH, Pang SF, Ng KW et al. Fertility, fecundity, sex ratio and the accessory sex glands in male golden hamsters. *Int J Androl* 1986; 9 (4): 312-320. PubMed PMID: 3804469.
- Maxwell WM, de Graaf SP, Ghaoui Rel H et al. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 64: 13-38. PubMed PMID: 17491139.
- Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition ed2010.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001; 345 (19): 1388-1393. PubMed PMID: 11794171.
- Liu DY, Baker HW. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2000; 15 (3): 702-708. PubMed PMID: 10686223.
- Liu DY, Baker HW. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. *Asian J Androl*. 2002; 4 (4): 281-285. PubMed PMID: 12508129.
- Roe JH. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *J Biol Chem* 1934; 107.
- Chambon P. Dosage de l'acide citrique dans le sang et les autres milieux biologiques. (Determination of Citric Acid in Blood and Other Biological Media). *Ann Pharm Fr* 1963; 21: 613-617. PubMed PMID: 14048148.
- Calamera JC. Interpretación clínica de los exámenes del semen: una mirada práctica. Asociación Laboratorios Alta Complejidad - ALAC 2013.
- Bouwman CA, Lintsen BM, Eijkemans MJ et al. A detailed cost analysis of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection treatment. *Fertil Steril*. 2008; 89 (2): 331-341. PubMed PMID: 17662286.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986; 46 (6): 1118-1123. PubMed PMID: 2946611.
- Verheyen G, Tournaye H, Staessen C et al. Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14 (9): 2313-2319. PubMed PMID: 10469701.
- Van der Westerlaken L, Naaktgeboren N, Verburg H et al. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85 (2): 395-400. PubMed PMID: 16595217.
- Wiser A, Sachar S, Ghetler Y et al. Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: preliminary results. *Andrologia*. 2014; 46 (3): 313-315. PubMed PMID: 23356546.
- Rubino P, Viganò P, Luddi A et al. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Hum Reprod Update* 2016; 22 (2): 194-227. PubMed PMID: 26586241.

32. Franchi AN, Avendano C, Molina RI et al. beta-Microseminoprotein in human spermatozoa and its potential role in male fertility. *Reproduction* 2008; 136 (2): 157-166. PubMed PMID: 18469041.
33. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J et al. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod* 2002; 17 (11): 2904-2911. PubMed PMID: 12407047.
34. Cross NL. Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. *Mol Reprod Dev* 1993; 35 (3): 316-323. PubMed PMID: 8352937.
35. Ying Y, Chow PH, O WS. Effects of male accessory sex glands on deoxyribonucleic acid synthesis in the first cell cycle of golden hamster embryos. *Biol Reprod* 1998; 58 (3): 659-663. PubMed PMID: 9510953.
36. Chan OC, Chow PH, O WS. Total ablation of paternal accessory sex glands curtails developmental potential in preimplantation embryos in the golden hamster. *Anat Embryol* 2001; 204 (2): 117-122. PubMed PMID: 11556527.
37. Wong CL, Chan OC, Lee KH et al. Absence of paternal accessory sex glands dysregulates preimplantation embryo cell cycle and causes early oviductal-uterine transit in the golden hamster in vivo. *Fertil Steril* 2008; 89 (4): 1021-1024. PubMed PMID: 18001727.
38. Wong CL, Lee KH, Lo KM et al. Ablation of paternal accessory sex glands imparts physical and behavioural abnormalities to the progeny: an in vivo study in the golden hamster. *Theriogenology* 2007; 68 (4): 654-662. PubMed PMID: 17597198.
39. Lay MF, Richardson ME, Boone WR et al. Seminal plasma and IVF potential. Biochemical constituents of seminal plasma of males from in vitro fertilization couples. *J Assist. Reprod. Genet* 2001; 18 (3): 144-150. PubMed PMID: 11411429. Pubmed Central PMCID: 3455596.

**CRYOBANK**  
BANCO DE SEMEN

**CONSULTE POR NUESTROS SERVICIOS ESPECIALES:**

- Donante de **Identidad Abierta.**
- Preparado y mejoramiento de muestras de pacientes para **tratamientos de fertilidad.**
- Cryo-envíos de embriones, óvulos y espermatozoides entre institutos con nuestros propios tanques y **personal capacitado.**

Libertad 1173 - Piso 4ºB | Tel. (5411) 4813-0170 • 4811-7111  
Buenos Aires - Argentina | [consultas@cryobank.com.ar](mailto:consultas@cryobank.com.ar)

ABIERTO  
LOS 365 DÍAS  
DEL AÑO!

[www.cryobank.com.ar](http://www.cryobank.com.ar)  
f t Cryobank Argentina