

Efecto de la albúmina humana en la movilidad y viabilidad espermática de muestras seminales preparadas para inseminación intrauterina

LEONOR DURÁN-MONTERROSAS,^a ADRIANA FLORES-REYES,^a EVA VEGA-HERNÁNDEZ,^a MIRNA ECHAVARRÍA-SÁNCHEZ,^b CARLOS A. VILLANUEVA-DÍAZ^c

RESUMEN

Objetivo: Analizar el efecto de la albúmina humana sobre la viabilidad espermática.

Material y métodos: Se procesaron por el método de swim-up 15 muestras de semen de sujetos sanos con semen normal (criterios de la OMS) utilizando HTF y HTF con albúmina humana al 10%, en alícuotas de la misma muestra. Al final de la preparación y a las 24 horas se midieron los parámetros de movilidad espermática utilizando el analizador automático Hamilton-Thorn IVOS 2000. Como medida de viabilidad se utilizó el índice de movilidad.

Resultados: La velocidad en línea recta (VSL) disminuyó de 17.14 ± 5.77 um/seg. (media \pm D.E.) a 12.21 ± 3.86 um/seg, y 12.14 ± 3.13 um/seg, en las muestras procesadas con y sin albúmina, respectivamente. A 24 horas de la preparación seminal, el IM disminuyó 11.41% en las muestras preparadas con albúmina y 21.75% en las muestras seminales que se prepararon con HTF sin albúmina ($z = 1.88$, $p = 0.05$). Los valores de la prueba hiposmótica obtenidos con el medio sin albúmina, fueron de $88.85\% \pm 6.90\%$ y con albúmina de $91.92\% \pm 4.55\%$ ($p = 0.02$). La integridad acrosomal también fue mayor en las muestras que se prepararon con albúmina ($86.14\% \pm 3.08\%$ vs. $81.57\% \pm 2.53\%$; $p < 0.01$).

Conclusiones: Estos datos sugieren que la albúmina humana en el medio de preparación seminal, protege funcionalmente a los espermatozoides separados por swim-up y aumenta su sobrevivencia.

PALABRAS GUÍA: Viabilidad espermática, movilidad espermática.

INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática del espermatozoide juega un papel central en el proceso de la fertilización, en todas las especies de mamíferos hasta ahora estudiadas.^{1,2} En este organelo celular es en el que finalmente descansan las funciones de adherencia a la zona pelúcida y fusión con el oolema, que podrían considerarse pasos limitantes en el proceso reproductivo.^{3,4} Sin embargo, su trascendencia en otros pasos de la fecundación es evidente, si se analiza su papel en la movilidad y capacitación espermáticas y en la reacción acrosomal.^{5,6}

La preparación del gameto para la fecundación implica una serie de cambios estructurales y funcionales

^a Investigadores del Departamento de Andrología.
Instituto Nacional de Perinatología (INPer). México.
^b Jefa del Departamento de Andrología.
^c Subdirector de Investigación Clínica del INPer. México.

Correspondencia:
Dr. Carlos A. Villanueva Díaz,
Subdirección de Investigación clínica,
Montes Urales 800, Col Lomas de Virreyes
CP 11000 México, D.F.
Tel. 5520-9900 ext 365
E-mail: villanueva-carlos@usa.net

Recibido: 6 de julio de 1999.
Aceptado: 14 de julio de 1999.

de la membrana plasmática, que forman un continuo: desde el paso de esta célula por el epidídimo hasta su llegada al sitio de la fertilización en el tercio externo de la trompa de Falopio. Aparentemente, estos cambios podrían ocurrir de manera programada para favorecer que en su encuentro los dos gametos tengan condiciones similares de "madurez".^{7,8}

La mayoría de los métodos empleados en la separación de la fracción móvil de espermatozoides para la reproducción asistida en el humano se basan en la centrifugación.⁹⁻¹¹ Es bien conocido que estos métodos pueden causar daño irreversible al espermatozoide, lo cual puede disminuir su capacidad de fertilización.^{12,13} El efecto deletéreo de estos métodos de preparación de semen parece estar relacionado tanto con el daño mecánico producido por la citosedimentación como con la generación de radicales libres que ocurre como consecuencia de ésta; debido a que la membrana plasmática del espermatozoide tiene un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y es muy sensible a la oxidación.¹⁴

Diferentes funciones espermáticas parecen alterarse con el procesamiento *in vitro* y algunas de éstas podrían relacionarse con reducción en la capacidad de unión a la zona pelúcida.¹⁵ Sin embargo, otras de las funciones espermáticas que también se verían afectadas por el procesamiento de semen, como es el caso de la sobrevivencia, no han sido analizadas. En teoría, la disminución de la viabilidad de los espermatozoides tendría su mayor impacto impidiendo que un número suficiente de espermatozoides llegara a la trompa de Falopio, en el caso de la inseminación intrauterina; o a una sobrevivencia disminuida en el medio de cultivo, en los casos en los que se lleva a cabo la fertilización *in vitro*.

El uso de albúmina en los medios de cultivo de gametos se ha relacionado con una mejor eficiencia en la fertilización, la segmentación y el desarrollo embrionario; lo cual aparentemente se debe a su efecto protector en las membranas. En un estudio previo, se ha demostrado que el uso de albúmina humana disminuye el efecto deletéreo de la centrifugación en la membrana plasmática de espermatozoides, preparados para la reproducción asistida.¹⁶

En el presente trabajo analizamos en forma comparativa la viabilidad *in vitro* de espermatozoides separados por la técnica de swim-up, utilizando un medio de cultivo con y sin albúmina humana, en un intento de establecer si el efecto protector de la albúmina humana durante la centrifugación se relaciona con una mayor viabilidad celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron 15 muestras de semen de igual número de sujetos sanos, las cuales tenían características normales, de acuerdo a los criterios propuestos por la OMS¹⁷: concentración $> 20 \times 10^6/\text{mL}$, movilidad $> 50\%$, movilidad progresiva rápida $> 25\%$. Las muestras fueron obtenidas en recipientes de plástico no tóxico, después de un periodo de abstinencia sexual de 3-6 días y posteriormente incubadas a 37°C , hasta que ocurrió la licuefacción.

Separación de las células móviles

Centrifugado y swim-up con HTF: Se colocó el semen en tubos cónicos de $13 \times 100 \text{ mm}$ y se adicionó un volumen igual de medio HTF (Human Tubal Fluid). La muestra se mezcló y se centrifugó a 1,200 rpm durante 7 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y a la pastilla se le adicionaron 0.5 mL de medio HTF, con el tubo inclinado en un ángulo de 45° , incubándose durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se separó aproximadamente el 70% de sobrenadante y se transfirió a otro tubo. Éste se homogeneizó para tomar 8.0 mL de muestra en un portaobjetos de $25 \times 75 \text{ mm}$, con cubreobjetos de $24 \times 40 \text{ mm}$, para el análisis de movilidad.

Centrifugado y swim-up con HTF-10% albúmina humana: Se mezcló un volumen igual de semen con el medio HTF, suplementado con albúmina al 10%, en un tubo cónico de 13×100 y se centrifugaron a 1,200 rpm, durante 7 minutos. El sobrenadante fue desechado y a la pastilla se le adicionaron 0.5 mL de medio con albúmina al 5 %, con el tubo inclinado en un ángulo de 45° , se incubó por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se separó aproximadamente el 70% de sobrenadante y se transfirió a otro tubo.

Prueba hiposmótica

Se preparó una solución que contenía fructosa 0.15 M y citrato de sodio 0.05 M (150 mOsm). A 1 mL de esta solución se agregaron 100 uL del preparado de espermatozoides, incubándose por 30 minutos a 37°C , en baño María. Después de este período, se colocó una alícuota de 10 mL, en portaobjetos de 25 mm, con cubreobjetos de $22 \times 22 \text{ mm}$ y se cuantificó en el microscopio de contraste el porcentaje de espermatozoides que presentaron encorvamiento del flagelo. En total, se contaron 100 espermatozoides, restando a esta cuenta el valor de la muestra inicial para obtener los valores de respuesta específica.¹⁸



Integridad acrosomal

La integridad acrosomal se valoró empleando el método de la triple tinción.¹⁹ Una alícuota de semen se incubó en una solución de azul tripán al 2%, durante 15 minutos a 37° C. Posteriormente se fijó durante una hora con 1 mL de glutaraldehído al 3%, en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 y se centrifugó 5 minutos a 1,200 rpm. Se separó el sobrenadante y se agregó amortiguador fosfosalino (PBS 0.1 M, pH 7.4), para eliminar el exceso de colorante. El paquete celular obtenido se resuspendió, para hacer un frotis que se dejó secar a temperatura ambiente y se tiñó con café Bismarck (0.8%) y rosa de Bengala (0.8%). Al final de este proceso, se contaron en el microscopio de campo claro con el objetivo de 100x un total de 100 células, en las que se definen las células muertas (teñidas en azul), acrosomas reactivos (teñidos en café en la región acrosomal) y acrosomas intactos (teñidos de rosa en la región acrosomal).

Viabilidad espermática

La viabilidad del espermatozoide capacitado por los dos métodos se valoró midiendo los parámetros de cinética del espermatozoide a las 24 horas de haber sido capacitado *in vitro*. Para tal efecto, se analizaron los parámetros de movilidad de los espermatozoides antes y después de la preparación seminal con los dos medios de cultivo. Brevemente, una alícuota de 7.5 mL de la muestra original se colocó en un portaobjetos de 25 × 75 mm con cubreobjetos de 24 × 40 mm. Una vez que se logró el extendido, la muestra se revisó para asegurarse de que se encontrara distribuida de manera homogénea y se colocó en la platina automática del equipo. El análisis de las muestras seminales preparadas, que fueron ajustadas a una concentración de 20 millones por mL, se realizó en alícuotas de 8 mL aplicadas en un portaobjetos de 25 × 75 mm con cubreobjetos de 24 × 40 mm. En ambos casos las muestras seminales se analizaron con ayuda del analizador automático de semen Hamilton-Thorn IVOS 2000 (Versión 8.1), según se describe a continuación: la lectura de concentración y movilidad se llevó a cabo en las siguientes condiciones: tiempo de lectura, 30 segundos; contraste mínimo, 7; tamaño mínimo, 5; ventana de tamaño, 0.5-1.8; ventana de intensidad, 0.4-1.6; tamaño de cabeza de espermatozoide inmóvil, 10; intensidad de espermatozoide inmóvil, 20; valor medio de velocidad progresiva, 15; valor mínimo de la velocidad progresiva, 5. Todas las lecturas se realizaron en 5 campos seleccionados al azar, en un mínimo

de 30 exposiciones y con una velocidad de adquisición de 60 Hz, condiciones que fueron previamente estandarizadas²⁰. Bajo estas condiciones experimentales se registraron los siguientes parámetros de movimiento de los espermatozoides: velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido del flagelo (BCF) y los índices de rectitud (STR), linearidad (LIN) e índice de movilidad (IM).

Análisis estadístico

Se realizó análisis descriptivo de las variables. Las diferencias entre los dos procedimientos se analizaron con la prueba de *t* no pareada, con un nivel α de 0.05. Las diferencias entre las muestras seminales, antes y después de la preparación, se analizaron con la prueba de *t* pareada. Para las variables que no mostraron una distribución normal, se utilizó la *prueba de Wilcoxon*.

RESULTADOS

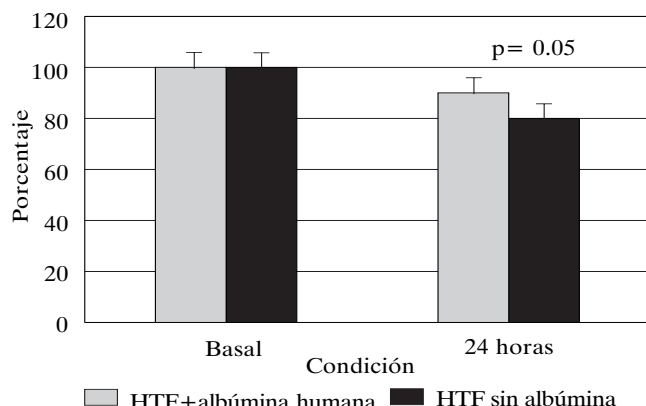
Los principales cambios que se presentaron con la preparación seminal fueron: disminución de la velocidad en línea recta (VSL) y de la viabilidad (IM). Los valores que se obtuvieron para la VSL en la muestra seminal antes de la preparación fueron de 17.14 ± 5.77 mm/seg. (media \pm DE), en tanto que el valor que se obtuvo después de la preparación fue de 12.21 ± 3.86 mm/seg en las muestras preparadas con albúmina y de 12.14 ± 3.13 mm/seg en las muestras preparadas con HTF. Ambas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Aunque se observó una tendencia al aumento en los valores de la VCL posterior a la preparación con los dos métodos, este cambio no fue significativo (basal: 60.07 ± 9.13 um/seg, albúmina: 62.28 ± 8.24 mm/seg, HTF: 63.21 ± 7.13 mm/seg).

El índice de movilidad (IM) se incrementó solamente después de la preparación seminal con albúmina (basal: 0.60 ± 0.06 , albúmina: 0.67 ± 0.08 ; $p < 0.02$). Veinticuatro horas después de la preparación seminal, el IM, analizado como índice de viabilidad funcional de los espermatozoides, disminuyó 11.41% en las muestras preparadas con albúmina y 21.75% en las muestras seminales que se prepararon con HTF sin albúmina (figura 1). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($z = 1.88$, $p = 0.05$).

La VCL en las muestras en las que se usó albúmina se mantuvo a las 24 horas (basal: 62.28 ± 8.24 mm/seg, 24 horas: 61.78 ± 8.30 mm/seg; $p = 0.87$), mientras que en las alícuotas preparadas con HTF sin albúmina, la

Figura 1

Viabilidad espermática (24 horas) medida como el IM (movilidad A + movilidad B/100) en muestras preparadas con HTF + albúmina humana y con HTF sin albúmina.



VCL disminuyó en forma significativa (basal: 63.21 ± 7.13 mm/seg; 24 horas: 57.14 ± 6.59 mm/seg; $p = 0.02$).

La VSL también disminuyó a 24 horas de preparada la muestra seminal en las alícuotas en las que se utilizó el HTF sin albúmina (basal: 12.14 ± 3.13 mm/seg; 24 horas 9.14 ± 2.98 mm/seg; $p = 0.01$); en cambio, en las que se utilizó el medio HTF con albúmina, la VSL no mostró ninguna modificación (basal: 12.21 ± 3.86 mm/seg; 24 horas: 11 ± 4.05 mm/seg; $p = 0.42$).

En los otros parámetros de la movilidad espermática, analizados por el método computarizado, no se encontraron diferencias significativas.

En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis de la integridad membranal y acrosomal de los espermatozoides preparados con los dos medios. En ambos casos se observó un incremento significativo en

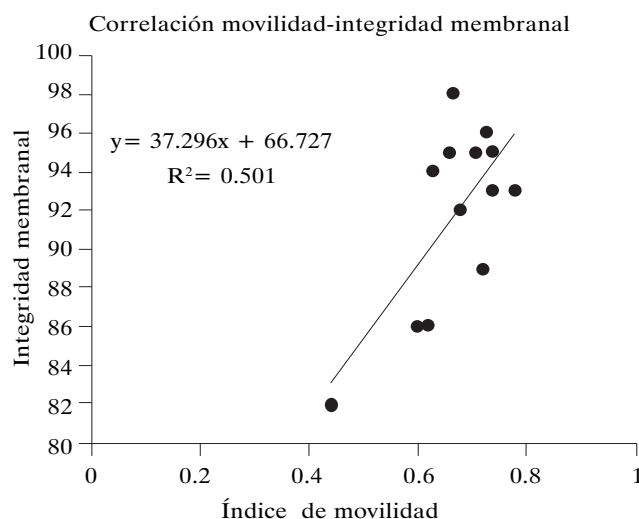
Tabla 1.

Integridad membranal y acrosomal. La prueba hiposmótica y la triple tinción se realizaron en las muestras, inmediatamente después de la preparación seminal. Los resultados se presentan como el Promedio \pm DE de un total de 15 muestras de sujetos normales.

	BASAL	HTF	ALBÚMINA
HOST	82.7 ± 6.26	88.8 ± 6.90	91.9 ± 4.5
IA	80.7 ± 2.53	81.5 ± 2.53	86.14 ± 3.08

Figura 2

Análisis de correlación de la movilidad e integridad membranal (HOST) de las muestras preparadas con medio HTF + albúmina al 10% ($n = 13$). La asociación de estas variables fue altamente significativa ($r = 0.75$; $p < 0.01$).



el porcentaje de espermatozoides con membrana y acrosoma íntegros como resultado de la preparación seminal (basal vs. HTF; $p < 0.01$ y basal vs. HTF + albúmina; $p < 0.01$). También se encontraron diferencias en los valores de estas dos pruebas de función espermática entre las alícuotas preparadas con y sin albúmina. En el caso de la prueba hiposmótica los valores obtenidos con el medio sin albúmina fueron de $88.85\% \pm 6.90\%$ y con albúmina de $91.92\% \pm 4.55\%$ ($p = 0.02$). La integridad acrosomal también fue mayor en las muestras que se prepararon con albúmina ($86.14\% \pm 3.08\%$ vs $81.57\% \pm 2.53\%$; $p < 0.01$).

El análisis de correlación entre los porcentajes de movilidad progresiva (IM) de la prueba hiposmótica y de la tinción acrosomal de las alícuotas tomadas después de la separación de la fracción móvil se presenta en la figura 2. Solamente en las alícuotas que se procesaron con albúmina al 10% se encontró una correlación positiva entre los resultados de la prueba hiposmótica y del índice de movilidad ($r = 0.75$; $p < 0.01$).

DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue analizar los parámetros cinéticos y la viabilidad de espermatozoides recuperados de la preparación seminal utilizando un medio de cultivo sin albúmina y otro con albúmina



humana al 10%, con la finalidad de demostrar el posible efecto protector de la albúmina humana en la función de los espermatozoides. En este caso se eligió a la movilidad del espermatozoide como un parámetro más fidedigno de la integridad anatómica y funcional de la membrana del espermatozoide y no la tinción supravital, debido a que la viabilidad de los espermatozoides medida por tinciones supravitales solamente valora la capacidad de la célula para excluir los colorantes; de hecho, sólo valora la permeabilidad a iones y a moléculas de bajo peso. Por otra parte, existen múltiples evidencias en la literatura acerca de la correlación entre el daño a la membrana plasmática y la movilidad espermática.^{21,22}

La separación de la fracción móvil de espermatozoides por citosedimentación con HTF sin albúmina se asoció con una disminución significativa de la viabilidad de los espermatozoides, lo cual confirma los datos reportados anteriormente en estudios de microscopía electrónica en los que se ha observado que estos métodos de separación alteran la membrana plasmática.¹⁶ En cambio, los espermatozoides que se prepararon con albúmina al 10% no solamente mostraron mejores condiciones de funcionalidad de la membrana plasmática y en la integridad del acrosoma, sino que tuvieron una mejor sobrevivencia a 24 horas.

La diferencia observada en la sobrevivencia de los espermatozoides después de la preparación seminal con el medio sin albúmina puede ser explicada por el impacto mecánico de la centrifugación en medios de cultivo con baja densidad; aunque existe la posibilidad también de que la albúmina pueda actuar reduciendo el efecto de los radicales libres liberados durante la centrifugación o como un intercambiador de colesterol.^{23,24} Este último efecto podría coadyuvar en la estabilización de la estructura de la membrana celular y en consecuencia favorecer la integridad estructural y funcional de las proteínas que forman parte de este organelo celular.²⁵

Un aspecto interesante de este estudio experimental es que intencionalmente se eligieron muestras seminales de sujetos sanos con seminogramas normales debido a que se esperaba una diferencia menor en el resultado de las técnicas de preparación porque estas muestras representan la porción superior del espectro de valores seminales que pueden ser encontradas en la población normal. Como hemos demostrado en un estudio anterior, en este intervalo la movilidad espermática y la integridad membranal no muestran correlación.¹⁶ Dadas estas condiciones, los resultados

de este trabajo indican que las alteraciones que se producen en los espermatozoides con la centrifugación pueden ser medidas con instrumentos más sensibles, como son los sistemas computarizados, que permiten detectar ligeros cambios en las características cinéticas de estas células, lo cual sugiere que algunas de estas alteraciones ocurren en el nivel subcelular.²⁶

En otros trabajos se ha reportado que la preparación seminal induce una serie de cambios en los distintos parámetros cinéticos que pueden ser obtenidos en el análisis computarizado. De hecho, es posible registrar un comportamiento peculiar de los espermatozoides al que se ha llamado patrón de hiperactivación, que se caracteriza por un incremento de la VCL y de la amplitud media de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), así como de disminución de la VSL.²⁷ En las muestras seminales analizadas inmediatamente después de la preparación no se observó un incremento significativo de la VCL, ni en las muestras separadas con medio que contenía albúmina ni en las que se utilizó el medio sin albúmina, pero sí se apreció un decremento en la VSL. Este decremento no se asoció con la disminución del IM, a juzgar por los resultados del análisis de correlación que no se presentan en este artículo. Esto plantea la posibilidad de que la preparación seminal tiene un efecto diferente en la movilidad curvilínea y en la movilidad lineal de los espermatozoides, que puede ser explicado por la diferencia que existe en los mecanismos celulares que controlan por separado el movimiento flagelar.²⁸ Una explicación alternativa a este fenómeno es que no se analizaron las muestras en el intervalo transcurrido entre el final de la preparación seminal y el final del periodo de incubación a las 24 horas; situación que pudo haber evitado el observar los cambios antes mencionados.

Es de gran interés la correlación que se encontró entre los valores de la prueba de integridad membranal y del índice de movilidad en las muestras procesadas con el medio que contenía albúmina, ya que esta relación no se encontró en las muestras tratadas en el medio sin albúmina. Este resultado sugiere que el daño que se produce durante la centrifugación podría producir alguna alteración estructural o funcional del aparato motriz del espermatozoide (axonema, mitocondrias, proteínas-quinasas) y con ellas del patrón de movimiento.²⁹

Para conocer el significado clínico de las diferencias encontradas en estos experimentos se requeriría la

valoración de su impacto en las tasas de fertilización, de desarrollo embrionario, de implantación y de embarazo en el modelo de la fertilización *in vitro* o *in vivo*, debido a que se ha documentado recientemente que la calidad espermática está relacionada también con eventos posteriores a la fertilización.

En el futuro sería interesante analizar el resultado de los diferentes métodos de separación de espermatozoides móviles en la sobrevida a tiempos más prolongados y en la capacidad de fusión membranal (ensayo de fertilización de Hámster). También sería importante definir en estudios posteriores el impacto de

la preparación seminal con albúmina al 10% en muestras seminales anormales y limítrofes, debido a que es en este tipo de biológicos en los cuales los métodos de separación tienen mayores efectos deletéreos.

El estudio de los parámetros cinéticos de los espermatozoides inducidos por la manipulación *in vitro* de semen es importante para diseñar mejores métodos de recuperación de espermatozoides para la reproducción asistida, particularmente para la inseminación intrauterina, basados no solamente en su movilidad sino también en otras características funcionales que son importantes.

ABSTRACT

Objective: The aim of present study was to analyze the effects of human serum albumin (HSA) added to the sperm preparation medium on sperm viability of semen samples prepared for intrauterine insemination.

Material and methods: Fifteen semen samples from healthy donors with normal semen (WHO criteria) were divided in two aliquots and processed by the swim-up method using either Human Tubal Fluid (HTF) or HTF added with 10% HSA for separation of the motile fraction of sperm. At the end of sperm preparation and 24 hours later; sperm motility parameters were compared using the Hamilton-Thorn IVOS 2000 semen analyzer. Progressive motility was used as a measure of viability in the samples.

Results: VSL decreased from 17.14 ± 5.77 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (mean \pm SD) to 12.21 ± 3.86 $\mu\text{m}/\text{seg}$ and 12.14 ± 3.13 $\mu\text{m}/\text{seg}$ in the samples processed with and without 10% HSA, respectively. At 24 hours progressive motility decreased 11.41% in aliquots processed with HTF-HSA and 21.75% in those prepared with HTF ($z = 1.88$; $p = 0.05$). HOST test results of HTF and HTF-HSA treated samples were $88.85\% \pm 6.90\%$ and $91.92\% \pm 4.55\%$ respectively ($p = 0.02$). Acrosomal integrity was also higher in samples processed with HSA ($86.14\% \pm 3.08\%$ vs. $81.57\% \pm 2.53\%$; $p < 0.01$).

Conclusions: These data suggest that HSA could help preserve some of the molecules related to sperm motility and enhance sperm survival.

KEY WORDS: *Sperm viability, sperm motility.*

REFERENCIAS

1. Ajay PS Gopal CM, Suniti M, Amitabha G. Lipid change of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Physical Acta* 1991; 1061: 185-196.
2. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds): *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press 1994; 189-317.
3. Bedford JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod* 1983; 28 :108-120.
4. Vaidya RA, Glass RH, Dandekar P et al. Decrease in the electrophoretic mobility of rabbit spermatozoa following intrauterine incubation. *J Reprod Fertil* 1971; 24: 299-301.
5. Dentwood JB. Capacitation, acrosome reaction and fertilization. *Biochemistry of mammalian reproduction*. New York, John Wiley & sons, 1982: 203-256.
6. Suzuki F, Yanagimachi R. Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res* 1989; 23:335-347.
7. Chang MC. The meaning of sperm capacitation *J Androl* 1984; 5: 45-50.
8. Duncan AE, Frase LR. Cyclic AMP-dependent fosforilation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro. *Reprod Fertil* 1993; 97:287-299.
9. Gorus FK, Pipellers DG. A rapid method for the fraction of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril* 1981; 35: 662-667.
10. Makler A, Murillo O, Huszar G, Tarlatzis B, De Cherney A. Improved techniques for separating motile spermatozoa from human semen. *Int J Androl* 1984; 7:71-78.
11. Berger TD. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 1985; 43(2):268-273.
12. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; 81:459-469.
13. Mortimer ST, Mortimer D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J. Androl* 1990; 11:195-203.

14. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Story BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8:338-348.
15. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidant in defining efficiency of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9:367-376.
16. Villanueva C, Díaz MA, Barrón A, López E, Villegas H. Ultrastructural changes of human sperm during in vitro capacitation. *Mol Androl* 1993; 5: 101-104.
17. OMS. Manual de laboratorio de la Organización Mundial de la salud para el examen de semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Panamericana, Buenos Aires 1992.
18. Jeyendran RS, Van der ven J, Pelaez PM, Crabo BG. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219-228.
19. Talbot P, Chacon SR. A triple-stain technique for evaluation of normal acrosome reaction of human sperm. *J Exp Zool* 1981; 215:202-208.
20. Díaz PM, Zarate G, Sanchez M, Flores A, Villanueva C. Factores que alteran los resultados del análisis computarizado de semen. *Perinatol Reprod Hum* 1995; 9:208- 215.
21. De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992; 13:368-378.
22. Leclerc P, Gagnon C. Phosphorylation of Triton X-100 soluble and insoluble protein substrates in a desmembranated/reactivated human sperm model. *Mol Reprod Dev* 1996; 2:200-211.
23. Davis BK. Interactions of lipids with the plasma membrane of sperm cells I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch Androl* 1980; 5:249-252.
24. Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985; 32:145-153.
25. De Lamirande E, Gagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:487-495.
26. De Geyter C, De Geyter M, Koppers B, Nieschlag E. Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum Reprod* 1998; 9:2512-2520.
27. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 8:2139-2146.
28. Si Y, Okuno M. Activation of mammalian sperm motility by regulation of microtubule sliding via cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent phosphorylation. *Biol Reprod* 1995; 5:1081-1087.
29. Armstrong JS, Mahadevan R, Hellstrom WJ, Surech C. Antioxidant potential of human serum albumin: Role in the recovery of high quality human spermatozoa for Assisted Reproductive Technology. *J Androl* 1998; 19:412-419.

