

7.4  
134



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“MODIFICACIONES EN EL ESPERMOGRAMA  
INDUCIDAS POR LA PREPARACION  
DE SEMEN HUMANO PARA  
INSEMINACION ARTIFICIAL”.**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A**  
**ULISES MEZA VILLANUEVA**

C. U. MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	PAG.
I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCION .....	2
III. ANTECEDENTES .....	4
IV. OBJETIVOS .....	7
V. MATERIAL Y METODO .....	8
VI. RESULTADOS .....	11
VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	22
VIII. REFERENCIAS .....	25

## I. RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de un método de preparación del semen para inseminación artificial sobre la concentración, viabilidad y motilidad de los espermatozoides de 21 muestras diferentes de semen humano.

El método de preparación del semen para inseminación artificial involucró una dilución inicial (1:1) de las muestras de semen con un medio de lavado (Ham F-10), esta mezcla fue centrifugada a 3600 revoluciones/minuto durante 10 minutos, el sobrenadante fue desechado. El botón obtenido se resuspendió en 2 mililitros de medio fresco y la mezcla se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 3600 revoluciones/minuto, el sobrenadante fue desechado. Finalmente se agregaron 500 microlitros de medio Ham F-10 complementado con 7.5% de suero homólogo de mu-  
jer estimulada con pergonal y gonadotropina coriónica al botón-final y se incubó de 30 minutos a 1 hora a 37°C en atmósfera al-5% de CO<sub>2</sub>.

Las muestras de semen utilizadas en este trabajo y sometidas al método de preparación del semen para inseminación artificial arriba citado, mejoraron significativamente su calidad en términos de concentración, viabilidad y motilidad de espermatozoides por milímetro<sup>3</sup>.

## II. INTRODUCCION

Aún cuando existen problemas por la sobrepoblación humana a nivel mundial, hay un grupo numeroso de parejas que tienen incapacidad para llevar a cabo la fecundación, fenómeno conocido con el nombre de esterilidad. La frecuencia de esta alteración es del orden del 10 al 15% en la población total; y dentro de este porcentaje mencionado, entre el 30 y 50%, el hombre es el responsable de ella (1, 3 y 4).

La inseminación artificial es uno de los métodos clínicos utilizados en el tratamiento de la esterilidad. Se conoce con el nombre de inseminación artificial al procedimiento de depositar el semen directamente en el tracto genital femenino (4). Una ventaja importante de la inseminación artificial es que en esta forma más espermatozoides alcanzan la cavidad uterina, mejorando las posibilidades de fecundación (14).

Considerando que la esterilidad masculina es responsable de un alto porcentaje de los casos de esterilidad de parejas, se ha propuesto que se incluya un método de preparación del semen, anterior a la inseminación artificial, con la finalidad de aumentar las posibilidades de fecundación (5,15,17,18 y 24).

Este método de preparación incide principalmente sobre tres características funcionales del semen que son: la concentración, el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de motilidad de los espermatozoides.

Los hombres oligospermicos quienes producen espermatozoides de buena calidad en muy pequeño número pueden beneficiar

se de un programa de inseminación artificial que incluya un método de preparación y concentración del semen, previo a la inseminación (19).

La calidad del semen anterior y posterior al tratamiento es usualmente expresada por la concentración, el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de motilidad de los espermatozoides. Estos parámetros son comunmente utilizados a pesar de que ellos no son necesariamente los indicadores óptimos de la capacidad de fecundación del espermatozoide, estos pueden ser suficientes para la evaluación de diferentes métodos de preparación del semen para inseminación artificial (2).

No obstante que la relación entre la concentración, -- porcentaje de viabilidad y porcentaje de motilidad no está claramente establecida con respecto a la capacidad de fecundación, la posibilidad de realizar diversas pruebas cuantitativas simples incrementa la oportunidad de identificar correctamente al semen de buena calidad que puede ser utilizado en un programa de inseminación artificial.

### III. ANTECEDENTES

La inseminación artificial en el humano se define como un procedimiento terapéutico por el cual el semen o los espermatozoides del esposo, o en otros casos de un tercero denominado donante, son introducidos mediante maniobras instrumentales, en el tracto genital de la mujer. Este procedimiento ocupa hoy día un lugar importante en el tratamiento de infertilidad (21).

La inseminación artificial con semen o espermatozoides provenientes del esposo se llama inseminación homóloga, mientras que la que se hace con semen de un tercero (donante) se llama heteróloga. Algunos autores prefieren no usar el término "artificial" y proponen que se diga inseminación terapéutica (12).

El tema de la inseminación artificial no es nuevo, es sin embargo en las últimas décadas cuando el procedimiento se ha convertido en parte importante del tratamiento terapéutico de la infertilidad de parejas, y su apoyo vino de la evidencia del éxito de su empleo en las prácticas veterinarias.

La inseminación artificial llevada a cabo por el hombre en los animales, probablemente es muy antigua. Don Ponchom hizo experimentos exitosos con peces alrededor del año 1420 (21) aunque el primer caso referido en animales (peces) se atribuye al alemán L. Jacobo, quien en 1742 realizó sus experimentos (25).

El primer intento registrado, hecho en los mamíferos, se debió al italiano L. Spallanzani, quien en 1785 realizó experimentos utilizando una perra en celo, y con una jeringa le

depositó en el tracto genital una cantidad pequeña de esperma - obtenido por masturbación de un perro. Pasados sesenta y dos días nacieron tres pequeños perros. Posteriormente Rossi, un - compañero de Spallanzani, repitió exitosamente este tipo de in - seminación también en perras (8, 21 y 22).

La inseminación artificial fue una curiosidad experi - mental hasta que Iwanoff, en 1899, tomó en consideración su va - lor práctico en veterinaria. Iwanoff trabajó principalmente -- con caballos, obteniendo un porcentaje de concepciones diez ve - ces mayor que con uniones naturales (8 y 21).

En cuanto a la inseminación artificial en el humano, - el primer éxito referido ha sido atribuido a diferentes investi - gadores. Koerner (13) cita a Eustaquio, quien a mediados del - siglo XVI habría hecho la primera inseminación artificial huma - na con éxito. En la última década del siglo XVIII J. Hunter -- realizó un experimento, cuyo procedimiento consistió en recoger el semen emitido durante el coito recién efectuado, y con una - jeringa especial lo inyectó profundamente en la vagina. Este - es el primer caso relatado de inseminación artificial exitosa - en humanos (5 y 21).

A pesar de la referencia mencionada de Hunter, Valen-- sín (25) sostiene que el primer caso de inseminación artifi - cial exitosa en el humano fue debido a Thouret, quien la practi - có en 1785, en su propia esposa. Esto, dice Valensín, aparece - en un folleto anónimo que ahora parece se atribuye a Thouret, - y en el se describe con detalle el experimento por el cual me - diante la inyección intravaginal de semen colocado en una jerin - ga logró el embarazo de su esposa y el nacimiento de un niño.

En Estados Unidos, M. Sims realizó el primer intento - exitoso de inseminación artificial, empleando la técnica uteri -



na, en 1886 (5 y 21).

Hasta finales del siglo pasado, la única clase de inseminación artificial era la practicada con el semen del esposo.- En 1884 el profesor Pancoast, practicó la primera inseminación con el semen de un donador en una mujer (21).

En Alemania, a principios de este siglo, se practicó la inseminación artificial homóloga por Doderlein, Stockel y -- Fraenkel, quienes además propagaron el procedimiento. La técnica usada por ellos era la intrauterina; muchos autores la llamaron "el método alemán" (21).

Roheledet en 1904 informó del primer embarazo con material obtenido por punción testicular. Mientras que Dickinson en 1903 informó acerca de dos casos de inseminación artificial-heteróloga (21). Schorowa, en 1927, publicó 33 casos exitosos de inseminación artificial realizada en 88 pacientes. Y Séguy en 1935 publicó 7 éxitos de inseminación artificial entre 16 -- pacientes.

Actualmente las investigaciones en el campo de la reproducción humana, concerniente a la inseminación artificial se hayan enfocadas principalmente hacia el mejoramiento de las técnicas utilizadas uno de cuyos aspectos importantes es sin lugar a dudas el mejoramiento en las características funcionales del semen. Este es el tema central del presente trabajo.

#### IV. OBJETIVOS

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de un método de preparación de semen para inseminación artificial, sobre las siguientes características:

- . Concentración de espermatozoides
- . Porcentaje de viabilidad de los espermatozoides.
- . Porcentaje de motilidad de los espermatozoides.

## V. MATERIAL Y METODO

Las muestras de semen utilizadas para la realización -- del presente trabajo fueron colectadas por masturbación de pa-- cientes con problemas de fertilidad y esterilidad en el Hospi-- tal de Gineco Obstetricia del Centro Médico Nacional.

El método de preparación de semen para inseminación ar-- tificial utilizado, es una modificación al método propuesto por McDowell J. S. (18), e involucró los siguientes pasos:

. Obtención de la muestra de semen por el paciente en un recipiente estéril.

. Una cantidad de medio de lavado igual al volúmen de la muestra fue añadida. El medio para lavado fue el Ham F-10 -- (18).

. La mezcla fue centrifugada por 10 minutos a 3600 re-- voluciones/minuto.

. El sobrenadante, conteniendo el plasma seminal fue -- decantado y desechado.

. Dos mililitros de medio de inseminación fresco fue-- ron agregados al botón obtenido, el cual se resuspendió y se -- centrifugó por 10 minutos a 3600 revoluciones/minuto.

. El sobrenadante fue desechado.

. Finalmente se agregaron 500 microlitros de medio -- Ham F-10 complementado con 7.5% de suero homólogo de mujer esti

mulada con pergonal y gonadotropina coriónica. El suero fue --  
obtenido en el periodo ovulatorio en mujeres que estan en el --  
programa de Fertilización "in vitro" con inducción de la ovula-  
ción de acuerdo al método propuesto por el Grupo de Norfolk - -  
(23). Se resuspendió.

. La muestra fué incubada de 30 minutos a 1 hora a --  
37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

Los siguientes parámetros de la muestra de espermatozoi-  
des antes y después del tratamiento fueron evaluados:

. Determinación del porcentaje de motilidad.

Se realizó por el conteo de 100 espermatozoides con la-  
ayuda de un microscopio óptico (400X); diferenciandose además -  
los siguientes grados de motilidad (7):

- motilidad I o "in situ"
- motilidad II o de progresión lenta
- motilidad III o de progresión rápida
- carencia de motilidad

. Determinación del porcentaje de viabilidad.

Se llevó a cabo por medio de una prueba de exclusión -  
del colorante (10) utilizando azul de tripán; los espermatozoi-  
des teñidos se contabilizaron como muertos, mientras que los no  
teñidos se cuantificaron como espermatozoides vivos. Se anali-  
zaron 100 espermatozoides por muestra.

. Determinación de la concentración de espermatozoides  
por mililítro.

Se siguió el método del hemocitómetro para el conteo - de plaquetas (6).

Los resultados fueron evaluados estadísticamente usando la prueba de t Student para muestras apareadas.

## VI. RESULTADOS

Para el caso de la concentración de espermatozoides por mililitro antes y después del tratamiento, la diferencia fue -- significativa (cuadro I), observandose un aumento después del - tratamiento.

CUADRO I

Análisis estadístico de los valores de la concentración de espermatozoides antes y después de someterlos al tratamiento, expresados en millones de espermatozoides por mililitro.

N: 21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	82.476	56.480	12.325	49.952	3.37 +
Después	132.428	71.533	15.610		

+  $P < 0.05$

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.

Aún cuando el porcentaje de viabilidad posterior al tratamiento fue significativamente menor que el porcentaje inicial (cuadro II), la concentración final de espermatozoides vivos -- por mililitro fue significativamente mayor después del tratamiento que antes del mismo (cuadro III).

## CUADRO II

Análisis estadístico de los valores del % de viabilidad de los espermatozoides antes y después de someterlos al tratamiento.

N:21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	89.619	3.294	0.719	12.571	5.93 +
Después	77.048	10.656	2.325		

+  $P < 0.05$

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.

## CUADRO III

Análisis estadístico de los valores de la concentración de espermatozoides vivos antes y después de someterlos al tratamiento, expresados en millones de espermatozoides por mililitro.

N:21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	73.938	52.085	11.366		
Después	100.927	55.189	12.043	26.989	2.44 +

+  $P < 0.05$

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.



Aunque la diferencia entre los valores del porcentaje de motilidad total de los espermatozoides antes y después del tratamiento resultó no ser estadísticamente significativa (cuadro IV); la concentración total de espermatozoides móviles por mililitro resultó ser significativamente mayor después del tratamiento (cuadro V).

## CUADRO IV

Análisis estadístico de los valores del % de motilidad total de los espermatozoides antes y después de someterlos al tratamiento.

N:21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	61.190	19.709	4.301	6.095	1.38 -
Después	55.095	20.528	4.480		

- P no significativa

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.

## CUADRO V

Análisis estadístico de los valores de la concentración de espermatozoides móviles antes y después de someterlos al tratamiento, expresados en millones de espermatozoides por mililitros.

N: 21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	52.375	40.846	8.913	22.508	2.24 +
Después	74.884	51.752	11.293		

+  $P < 0.05$

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.

La diferencia entre los valores del porcentaje de motilidad I antes y después del tratamiento no fue significativa -- (cuadro VI). Así mismo, la diferencia entre la concentración -- por mililitro de espermatozoides con motilidad I antes y después del tratamiento, resultó no ser significativa (cuadro VII).

#### CUADRO VI

Análisis estadístico de los valores del % de motilidad I de los espermatozoides antes y después de someterlos al tratamiento.

N:21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	4.857	6.747	1.472	0.047	0.03 -
Después	4.904	5.656	1.234		

- P no significativa.

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.

## CUADRO VII

Análisis estadístico de los valores de la concentración de espermatozoides con motilidad I antes y después de someterlos al tratamiento, expresados en millones de espermatozoides por mililitro.

N: 21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	3.621	5.290	1.154	2.156	0.96 -
Después	5.778	8.872	1.936		

- P no significativa.

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.

El cuadro VIII muestra sin embargo que la diferencia -- entre los valores del porcentaje de motilidad II antes y después del tratamiento fue significativa; observándose una disminución en el porcentaje de motilidad II después del tratamiento. De la misma forma, la concentración por mililitro de espermatozoides con motilidad II disminuyó significativamente después -- del tratamiento (cuadro IX)

### CUADRO VIII

Análisis estadístico de los valores del % de motilidad II de los espermatozoides antes y después de someterlos al tratamiento.

N: 21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	33.142	19.329	4.218	22.190	5.50 +
Después	10.952	6.045	1.319		

+  $P < 0.05$

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.

## CUADRO IX

Análisis estadístico de los valores de la concentración de espermatozoides con motilidad II antes y después de someterlos al tratamiento, expresados en millones de espermatozoides por mililitro.

N: 21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	23.182	15.612	3.407	8.537	2.58 +
Después	14.644	12.958	2.828		

+  $P < 0.05$

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.

Finalmente, la diferencia entre el porcentaje de espermatozoides con motilidad III antes y después del tratamiento, fue significativa (cuadro X); notándose la tendencia al aumento del porcentaje de espermatozoides con motilidad III después del tratamiento. De acuerdo con lo anterior, la concentración de espermatozoides por mililitro con motilidad III fue significativamente mayor después del tratamiento (cuadro XI).

#### CUADRO X

Análisis estadístico de los valores del % de motilidad III de los espermatozoides antes y después de someterlos al tratamiento.

N: 21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	23.286	20.886	4.558	15.952	2.75 +
Después	39.238	24.749	5.401		

+  $P < 0.05$

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m. diferencia de medias.

## CUADRO XI

Análisis estadístico de los valores de la concentración de espermatozoides con motilidad III antes y después de someterlos al tratamiento, expresados en millones de espermatozoides por mililitro.

N: 21	media	d.e.	e.e.	d.m.	t estadística
Antes	25.649	37.316	8.143		
				28.835	2.91 +
Después	54.484	47.665	10.401		

+  $P < 0.05$

N= número de casos; d.e.= desviación estándar; e.e.= error estándar; d.m.= diferencia de medias.



## VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES

El procedimiento de preparación de semen para inseminación artificial, evaluado en el presente trabajo, es una modificación al método propuesto por McDowell, J.S. (14), desarrollado en el Laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional.

A partir de los resultados obtenidos podemos señalar lo siguiente:

1.- La concentración de espermatozoides por mililitro aumentó significativamente después de someter las muestras de semen al tratamiento propuesto en nuestro trabajo.

2.- La concentración de espermatozoides vivos por mililitro aumentó significativamente después de someter las muestras de semen al tratamiento.

3.- La concentración de espermatozoides móviles por mililitro aumentó significativamente después de someter las muestras de semen al tratamiento.

Es decir, las tres características principales que determinan la calidad del semen (2), mejoraron significativamente después de someter las muestras al método de preparación de semen para inseminación artificial propuesto en este trabajo.

La capacidad de fecundación del semen, parece estar más íntimamente relacionada al número de espermatozoides móviles -- que con respecto a las otras características del semen (20). -- Por lo cual es importante analizar los resultados obtenidos con relación a este parámetro:

. La motilidad I ("in situ") no sufrió cambio significativo aparente después del tratamiento.

. Las motilidades II (de progresión lenta) y III (de progresión rápida) cambiaron significativamente después del tratamiento: la primera disminuyendo y la segunda aumentando.

Estos últimos pueden interpretarse como el hecho de -- que espermatozoides con motilidad II antes del tratamiento, -- adquirieron una motilidad III después del mismo. Siendo importante señalar este cambio, ya que se plantea que la motilidad de progresión rápida puede ser el factor más importante dentro de la capacidad de fecundación de los espermatozoides (16 y -- 20).

Podemos afirmar que uno de los efectos del método de -- preparación del semen para inseminación artificial aquí evalua do fue la separación de los espermatozoides del fluido seminal sin perjudicar su motilidad.

Más aún, el aumento en la motilidad progresiva rápida -- observada después del tratamiento confirma la disminución de -- la viscosidad del medio que rodea al espermatozoide, permitien -- dolo progresar más rápidamente (15), o bien, el aporte de al -- gunos metabolitos que incrementan esta motilidad, como ha sido señalado por Hicks y colaboradores (11) en sus estudios sobre -- el incremento de motilidad espermática debido al aumento de -- los niveles hormonales en el líquido de suspensión espermáti -- ca.

Con base en lo anteriormente expuesto, se puede indi -- car que las muestras de semen utilizadas en este trabajo y so -- metidas al método de preparación del semen aquí detallado, me -- joraron su calidad en términos de concentración, viabilidad y --

motilidad de espermatozoides por mililitro y probablemente se incrementó su capacidad fecundante. En estudios posteriores se analizará esta capacidad.

## VIII. REFERENCIAS

- 1.- Beck, W.W. Two hundred years of artificial insemination. Fertil. Steril. 41: 177, 1984.
- 2.- Blasco, L. Clinical test of sperm fertilizing ability. Fertil. Steril. 41: 177, 1984.
- 3.- Cervera, A.R. Evaluación de la esterilidad masculina. En Avances en Biología de la Reproducción. Editado por la Asoc. Mexicana para el estudio de la fertilidad y la reproducción humana, México, D.F. México, pág. 37, 1985.
- 4.- Cervera, A.R. Inseminación artificial en el consultorio. En Avances en Biología de la Reproducción. Editado por la Asoc. Mexicana para el estudio de la fertilidad y la reproducción humana, México, D.F. México. pág. 223, 1985.
- 5.- Dandekar, P.V. & Quigley, M.M. Laboratory setup for human "in vitro" fertilization. Fertil. Steril. 42: I, - - 1984.
- 6.- David, C. et. al. The success of A. I. D. and semen - - characteristics: Study en 1489 cycles and 192 ejaculates. Int. J. Androl. 3: 613, 1980.
- 7.- Eliasson, R. Standars for investigation of human semen. - Androl.3: 49, 1971.
- 8.- Finegold, W.J. Artificial insemination. Edited by C. - - Tomas Publisher. Illinois, U. S. A. 1972.

- 9.- Gerber, C. H. Medical progress in artificial insemination Illinois Med. J. 134: 755, 1968.
- 10.- González Diddi, M., Drewinko, B. y Trujillo, J.M. Viabilidad de células inmunocompetentes en cultivo de tejidos-despues de tripsinización. Bol. Asoc. Med. 7: 113, 1969.
- 11.- Hicks, J. J. et. al. Comunicación personal.
- 12.- Kleegman, S. J. Therapeutic donor insemination. Fertil.-Steril. 5: 7, 1944.
- 13.- Koerner, M. Medicolegal considerations in artificial insemination. Louisiana Law. Rev. 8: 484, 1948.
- 14.- Kremer, J. A new technique for intrauterine insemination.- Int. J. Fertil. 24: 53, 1979.
- 15.- Lee, W.I. Laser light-scattering study of the efect of - washing on sperm motility. Fertil. Steril. 38: 62, 1982.
- 16.- Mahadevan, M.M. et. al. Successful use of human semen - cryobanking for "in vitro" fertilization. Fertil. Steril. 40: 340, 1983.
- 17.- Makler, A. et. al. Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen. 1.- A self-migratory - method. Int. J. Androl. 7: 61, 1984.
- 18.- McDowell, J.S. Preparation of semen for "in vitro" fertilization. Infertil. 6: 149, 1983.
- 19.- McLaren, A. Research on early human embryos from "in vitro" fertilization (IVF): The Warnock recommendations. -- British J. Obstet. Gynaec. 92: 305, 1985.

- 20.- Mitchell, J. A. et. al. Motility of spermatozoa. In Human semen and fertility regulation in men. Edited by -- E. S. E. Hafez. Detroit, U. S. A. pag. 83, 1976.
- 21.- Quintero Monasterio, R. Inseminación artificial humana.- Editado por la Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 1974.
- 22.- Roldán, M. H. El estado actual de la inseminación artificial. (Tesis). Fac. Medicina. U. N. A. M. México, - D.F. México. 1963.
- 23.- Seegar Jones, G. The use of human menopausal gonadotropin for ovulation stimulation in patients for "in vitro" fertilization. *Infertil.* 6: II, 1983.
- 24.- Thorneycroft, I.A. Donor fertility in an artificial insemination program. *Fertil. Steril.* 41: 144, 1984.
- 25.- Valensín, G. The question of fertility. Edited by Doubleday and company, Inc. New York, U. S. A. 1960.