



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

**CORRELACION DE LOS NIVELES DE LA HORMONA  
ANTIMULLERIANA EN EL PLASMA SEMINAL EN  
PACIENTES INFÉRTILES CON OLIGOZOOSPERMIA COMO  
MARCADOR INDIRECTO DE FALLA EN LA  
ESPERMATOGENESIS: ESTUDIO PILOTO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS MEDICAS**

**P R E S E N T A**

**ALFREDO MARTIN RIVERA MONTES**

**DR. JUAN GERARDO BARROSO VILLA  
DIRECTOR DE TESIS**



**MÉXICO, D. F.**

**2011**



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 esta 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.

# **AUTORIZACIÓN DE TESIS**

**CORRELACION DE LOS NIVELES DE LA HORMONA  
ANTIMULLERIANA EN EL PLASMA SEMINAL EN  
PACIENTES INFÉRTILES CON OLIGOZOOSPERMIA COMO  
MARCADOR INDIRECTO DE FALLA EN LA  
ESPERMATOGENESIS: ESTUDIO PILOTO**

---

**DR. JUAN GERARDO BARROSO VILLA  
DIRECTOR DE TESIS**

**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

Introducción	1
Justificación	7
Objetivos	7
Diseño del estudio	8
Material y Métodos	9
Metodología	10
Resultados	13
Discusión	19
Anexos	22
Bibliografía	24

*Para Rosa María, María José y Sebastián, los amores de mi vida, los amo con toda mi alma, son mi motivo de despertar cada día y mi motor para que día más parejas que no pueden lograrlo puedan disfrutar a sus hijos, como los disfruto Yo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme despertar cada mañana.

A Rosa María, mi amor, por ser mi amiga, mi sostén en los momentos difíciles que nos tocó vivir lejos de casa, eres mi vida. Gracias mi vida por todo tu sacrificio y por los hijos que tenemos TE AMO.

A María José, mi princesa hermosa, es increíble verte crecer cada día, eres lo máximo, TE AMO.

A Sebastián, mi hijo, cada día nos enseñas más cosas, TE AMO

A mis padres, que aunque estemos lejos, siempre me han apoyado en todo momento. Alfredo eres y serás siendo mi Maestro. Lucha gracias por tus oraciones diarias

A mis hermanas, Mabel y Cecilia, a Renato, Eduardo, mis sobrinos y mis suegros; gracias por siempre darme ánimos y estar pendientes de su familia en México

Al Dr. Gerardo Barroso, por su tiempo y asesoría para la realización de ésta tesis. Que sin su apoyo y dedicación no hubiera posible realizarla.

A mis maestros y compañeros de la Maestría por sus enseñanzas y paciencia.

A mis pacientes, que día a día disfrutamos y lloramos juntos.

## **RESUMEN**

**OBJETIVO:** Comparar cuantitativamente los niveles de hormona anti-Mülleriana (HAM) en líquido seminal de pacientes infértiles con oligozoospermia con varones fértiles

**MATERIAL Y METODO:** Se realizó un estudio piloto, descriptivo incluyendo muestras seminales de 20 sujetos para la cuantificación de HAM y muestras séricas para valorar su perfil endocrinológico. Se compararon 2 grupos de estudio el grupo A, (pacientes con oligozoospermia severa) y grupo B, control, (voluntarios fértiles, con antecedente de embarazo previo dentro de los últimos 12 meses). Los parámetros seminales fueron evaluados de acuerdo a los estándares internacionales definidos por OMS, 2010. Con el uso de ensayos por quimioluminiscencia se estableció cuantitativamente los niveles séricos del perfil endocrinológico. La HAM fue cuantificada por medio de ensayo de ELISA. Las variables relacionadas con tabaquismo, infecciones genitourinarias, ingesta de sustancia tóxicas y exposición a agentes ambientales fueron excluidos en ambos grupos de estudio.

**RESULTADOS:** Por diseño de estudio se encontraron diferencias significativas en concentración, movilidad y morfología espermática. No hubo diferencias significativas en la cuantificación del perfil endocrinológico basal, sin embargo, se observó una disminución en la concentración seminal de la HAM en sujetos con oligozoospermia ( $0.7 \pm 0.05$ ) comparado con el grupo de sujetos fértiles ( $1.85 \pm 3.61 \text{ pg/ml}$ )  $p < 0.005$ .

**CONCLUSIONES:** La disminución cuantitativa de la HAM en el líquido seminal en sujetos infértiles, nos provee de una herramienta importante adicional para el estudio del varón infértil. El futuro para la cuantificación de los niveles de HAM a nivel seminal nos permitirá evaluar el impacto en los pacientes con diagnóstico de infertilidad y de esta manera podamos tener valores de cohorte que sean predictivos para técnicas de reproducción asistida, como la probabilidad de éxito de una fertilización in vitro.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** There are around 80 million couples in the World with at least one form of reproductive dysfunction. The male factor represents today at least 50% of the causes of reproductive problems in the couple, which has generated new therapeutic alternatives beyond in vitro fertilization. The search for spermatogenesis markers could allow us to identify germinal cells that could be used in reproductive techniques.

**OBJECTIVE:** Qualitative comparison of the levels of Anti-Müllerian hormone (AMH) on seminal liquid on infertile patients with oligozoospermia against fertile males.

**MATERIAL AND METHODS:** we performed a pilot study that included 20 sperm samples of to quantify seminal AMH and blood samples to evaluate their endocrinologic status. They were divided in two groups, group A (patients with severe oligozoospermia) and group B, control (fertile volunteers, with a spontaneous pregnancy on the previous 12 months). The seminal parameters were evaluated according to the international standards defined by the WH. The endocrinologic status was evaluated by quantitative quimioluminescence essays. AMH was quantified by ELISA.

**RESULTS:** Because of the study design differences in sperm count, motility and morphology were found. There were no statistical differences in the endocrinologic status, however, there was a diminished quantification on the seminal AMH on men with oligozoospermia ( $0.7 \pm 0.05$  pg/ml) compared with the normal control group ( $1.85 \pm 3.61$  pg/ml)  $p < 0.005$ .

**CONCLUSION:** The diminished quantitative AMH level in the seminal fluid in infertile men provides us with an additional important tool for the study of the infertile male. In the future the levels of AMH on seminal fluid will allow us to determine the impact on fertility and to have cut values that can be predictive for assisted reproductive techniques, as well as the success rates on IVF.



## INTRODUCCIÓN

La infertilidad afecta a un 15% de las parejas en todo el mundo, y se define según la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM), como la incapacidad de una pareja para lograr un embarazo después de mantener relaciones sexuales durante un año sin protección anticonceptiva. Los factores causales de la disminución en la fertilidad de una pareja pueden ser uno o varios. En general, se dividen en los siguientes grupos: i) factor masculino (se presenta en el 40 al 50% de los casos), ii) ovárico (presente en el 20-30% de los casos), iii) tubárico (presente en el 15-20%), iv) cervical (presente en el 5-10% de los casos), v) de causa desconocida (presente en el 5-10%) y vi) en más del 30% de los casos hay trastornos múltiples simultáneos.<sup>1-3</sup>

El factor masculino, es responsable del 50% de los casos de infertilidad. La espermatobioscopía directa, la valoración endocrinológica, el ultrasonido testicular y la biopsia testicular constituyen las armas más importantes en el estudio del varón infértil.<sup>1</sup> Con respecto al análisis seminal nos basamos en los parámetros propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>4</sup> y los parámetros más importantes son:

- Concentración espermática es un indicador sensible de la espermatogénesis, excepto en los casos de obstrucción total o parcial de la vía seminal; y por tanto, refleja la normalidad de la interacción de las células del epitelio germinal con las células de Leydig, de Sertoli y miotubulares; así como la normalidad de la regulación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-testículo.<sup>5</sup>
- Movilidad espermática está relacionada con diferentes características anatómicas y funcionales de los espermatozoides. Para que el espermatozoide pueda desplazarse requiere de la integridad anatomo-funcional de las mitocondrias y el flagelo en el cual se encuentran el axonema, organelo formado por un conjunto de microtúbulos y micro filamentos dispuestos en forma circular.<sup>(1,3)</sup>
- Morfología espermática, cuantifica un porcentaje, por cualquiera de dos métodos de clasificación, uno propuesto por la OMS<sup>4</sup> y otro que se basa en los criterios estrictos de Kruger.<sup>6</sup> Aunque inicialmente los valores de normalidad entre ambas clasificaciones eran muy diferentes, recientemente la OMS ha cambiado sus criterios, lo que ha logrado que las diferencias sean más estrechas. Actualmente se considera normal tener más de 4% de espermatozoides con morfología normal.<sup>4</sup>

El manual de la OMS ha sufrido diversas modificaciones en sus respectivas ediciones, la última no está dirigida exclusivamente a laboratorios que tratan infertilidad, sino también a las necesidades de aquellos laboratorios que investigan métodos potenciales para la regulación de la infertilidad masculina o que estimulan la toxicología reproductiva masculina. En este contexto se dan los rangos de referencia, basados en la experiencia clínica de varios investigadores que han estudiado poblaciones de hombres fértiles sanos. Ya que estos no son los valores de semen mínimos necesarios para lograr la concepción, por ejemplo, obtenidos por la evaluación de *in vivo* o *in vitro* en una población subfétil, esta categorización se ha cambiado de valores “normales” a valores de “referencia”. Por lo tanto, aquellos hombres cuyas variables de semen son bajas a las indicadas en este manual pueden ser inferiores. Los valores de referencia dados por la OMS<sup>4</sup> son:

**Tabla 1.** Valores normales en el análisis seminal o espermatoscopia directa.

Indicadores	Valores normales
Volumen eyaculado/mL	Más de 2ml
pH del semen	7.2 – 8.0
Concentración espermatozoides/mL	20 x 10 <sup>6</sup>
Conteo total de espermatozoides	40 x 10 <sup>6</sup>
Movilidad lineal progresiva (a+b)	50 %
Movilidad lineal rápida (a)	25 %
Morfología normal	50 %
Criterio estricto de Kruger	>4%
Viabilidad	50 %
Aglutinaciones	< 10 %

Con esta base, se inicia el diagnóstico y tratamiento preciso para cada paciente. A pesar de los estudios realizados de manera rutinaria en las clínicas de infertilidad, no existen marcadores séricos o seminales que hablen indirectamente de espermatogénesis, por lo que la búsqueda de estos marcadores podría resultar en una mejor perspectiva para el especialista en cuanto a las pautas a seguir en el tratamiento de la pareja infértil.

En el estudio de la pareja infértil, el análisis de la muestra seminal es una de las pruebas básicas para la elaboración de un diagnóstico en reproducción. El estudio elemental del eyaculado, esto es: concentración, movilidad y morfología espermática son los parámetros iniciales fundamentales para conocer si la esterilidad es de origen masculino. Sin embargo, para que este estudio pueda ser completo tiene que realizarse en profundidad y por personal especializado que pueda interpretar los datos que se analizan.<sup>1</sup> La tendencia actual es identificar marcadores bioquímicos que nos hablen indirectamente de la espermatogénesis y su relación con la calidad seminal. Se ha propuesto a la hormona folículo estimulante (FSH), a la inhibina B y a la hormona anti-Mülleriana (HAM) para estos fines, encontrando diferentes resultados.

La HAM es la sustancia inhibidora de los conductos de Müller. Su existencia fue propuesta por primera vez en 1947 por el profesor Alfred Jost,<sup>7</sup> quien demostró que un componente testicular, distinto de la testosterona, al cual llamó “müllerain l’hormone inhibitrice”, era responsable de la destrucción de los conductos de Müller en el desarrollo embriológico masculino.<sup>8</sup> Fueron necesarios no menos de 20 años para que dos laboratorios de investigación independientes pudieran purificar la proteína. El grupo de Donahoe,<sup>9</sup> y el laboratorio del Dr. Josso,<sup>10</sup> llamaron a esta proteína sustancia inhibidora mülleriana. Más tarde, el laboratorio de Josso cambió el nombre a hormona antimülleriana, el cual es utilizado actualmente.<sup>11</sup>

Por décadas el significado clínico de HAM ha estado limitado a su rol crítico en el desarrollo sexual fetal. Sin embargo, en los últimos 15 años, con la combinación de los avances en las investigaciones básicas, clínicas y experimentales, la HAM ha incrementado su relevancia y ha surgido como un marcador de función ovárica.<sup>7</sup>

La HAM es un marcador gonadal específico. En el hombre, se expresa fuertemente en las células de Sertoli, desde la diferenciación testicular intra-útero hasta la pubertad, reprimiendo el desarrollo de los conductos de Müller; de los cuales derivan las trompas, útero y porción superior de la vagina. En mujeres, se expresa en menor grado que en los varones, es producida por las células de la granulosa de los folículos ováricos que se encuentran en los estadios iniciales de desarrollo.<sup>11</sup>

La HAM es una glicoproteína dimérica compuesta por 2 monómeros de 72 kDal unidos por puentes disulfuro, que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento, que incluye al transformante Beta, y a las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), las inhibinas y activinas, todas ellas involucradas en los procesos de crecimiento y diferenciación celular.<sup>11</sup> El gen de HAM y su receptor se halla en el cromosoma 19 p13.3.<sup>12</sup>

La HAM actúa a través de su receptor específico HAM-RII y otro inespecífico HAMRI, reclutado por el primero con el que forma un heterodímero.<sup>14</sup> El HAMR-II es una proteína con 2 sitios de N-glicosilación y tres dominios: extracelular, transmembrana e intracelular. Actúa a través de una serina/treonina quinasa por mecanismos de fosforilación y su gen se localiza en el cromosoma 12. El receptor tipo I es compartido con otros miembros de la familia de TGF.<sup>15</sup>

En el varón, una de las principales funciones de la HAM, se lleva a cabo en la etapa fetal del individuo al actuar sobre la regresión de los conductos de Müller. La HAM, un producto de las células de Sertoli, se secreta en grandes cantidades desde la etapa fetal hasta la pubertad. Sin embargo, al inicio de la pubertad, la HAM se encuentra regulada de manera negativa por las altas concentraciones intratesticulares de testosterona y por la presencia de células germinales meióticas<sup>16-17</sup>. Otra de las funciones realizadas por la HAM es la que ejerce sobre la célula de Leydig durante la esteroidogénesis al actuar como modulador negativo en la diferenciación y función de estas células.<sup>18</sup>

Se conoce que la secreción de HAM se lleva a cabo de manera bi-direccional por la célula de Sertoli, esto es: i) paracrina, de manera apical hacia los túbulos seminíferos y ii) exocrina, de forma basal hacia el intersticio y la circulación. Los datos que se

tienen acerca de las concentraciones sanguíneas y seminales de la HAM nos indican que durante la vida adulta, la secreción de esta hormona se lleva a cabo con un franco predominio paracrino, dando una mayor diferencia respecto a la concentración seminal de la HAM.<sup>19</sup> Por lo tanto, en la actualidad, la mayoría de los autores relacionan las bajas concentraciones de HAM en el plasma seminal con una espermatogénesis alterada.

La importancia de la medición de la HAM en los pacientes masculinos radica en que esta molécula es reconocida como un excelente marcador de desarrollo testicular pre-puberal por lo que ha sido utilizada para investigar estados intersexuales.<sup>20</sup> Además, el descenso en las concentraciones de HAM en suero en la pubertad es un marcador temprano de la actividad de la testosterona y del desarrollo de las espermatogonias en el testículo.<sup>19</sup> Aparentemente, una concentración seminal baja de HAM está relacionada con disfunción espermática y con una representación importante de células de Sertoli inmaduras ya que la célula de Sertoli inmadura carece de capacidad para secretar HAM hacia su capa apical dentro de los túbulos seminíferos. Por lo tanto, en las células de Sertoli inmaduras, la secreción es basal, es decir, hacia el intersticio y por ello, las concentraciones séricas de HAM son mayores en estos casos.<sup>21-22</sup>

Las concentraciones séricas de HAM se han estudiado por un largo periodo de tiempo, sin embargo, las concentraciones seminales de la misma hormona, han despertado poco interés en los investigadores. Existen diferentes publicaciones en donde se establece una relación directa entre las concentraciones seminales de HAM y las concentraciones espermáticas.<sup>23</sup> Por ejemplo, en un estudio realizado en el 2002, se midió la concentración de HAM en el plasma seminal de 10 hombres fértiles y 39 pacientes con oligozoospermia para examinar la asociación de la HAM en el plasma seminal con la espermatogénesis. Los resultados demostraron que los pacientes con oligozoospermia presentaban concentraciones significativamente menores de HAM respecto a los pacientes fértiles. De esta manera se concluyó que existe una correlación entre las concentraciones de HAM en el plasma seminal y la concentración espermática<sup>18</sup> sin embargo al medir las concentraciones de las hormonas, su comportamiento endocrinológico no se ha corroborado.

Por otra parte, se ha reportado que existe una relación inversamente proporcional entre las concentraciones de HAM y la movilidad espermática.<sup>24</sup> Sin embargo, otros

grupos han demostrado que la administración de HAM recombinante en el paquete celular de los espermatozoides, mejora la longevidad, movilidad y morfología del semen fresco y crioprecipitado, en modelo murino.<sup>21</sup> Al parecer, esto tiene que ver con la interacción de la HAM con los receptores de la superficie celular del espermatozoide que dan origen a varios mecanismos intracelulares como la fosforilación de la tirosina. Estos eventos intracelulares resultan en el retraso o prevención de la capacitación espermática y de la reacción acrosomal lo que explicaría la aparente mejoría en la longevidad, movilidad y viabilidad espermática después de 22 horas de haber administrado la HAM.<sup>21</sup>

Otra de las funciones de la HAM en el hombre es la presencia de receptores para HAM en las células de Leydig y su capacidad para regular su función. Se ha demostrado que la HAM es un modulador negativo para la diferenciación y para la producción de testosterona, apoyándose en el hecho de que otros miembros de la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  producen inhibición de la esteroidogénesis.<sup>21</sup>

Como se mencionó con anterioridad, la tendencia actual en cuanto a la valoración de una muestra seminal es identificar marcadores bioquímicos que nos hablen indirectamente de la espermatogénesis. Además de la HAM, otras de las hormonas propuestas para estos fines ha sido la inhibina B, una hormona glicoproteica de origen gonadal, que participa en la retroalimentación del eje hipófisis gonadal.<sup>25</sup>

A pesar de la controversia existente, el comportamiento de la HAM en el líquido seminal de sujetos fértiles e infértiles, se hace necesario establecer esta relación con el comportamiento endocrinológico que el presente trabajo pretende señalar.

## **JUSTIFICACIÓN**

Durante la última década el factor masculino se ha convertido en la primera causa de infertilidad. Cerca de 80 millones de individuos en edad reproductiva cursan con algún problema de infertilidad y más del 50% de estos están relacionados a anomalías funcionales y estructurales en el espermatozoide. La presencia de un espermatozoide anómalo se ha relacionado directamente con fallas en el proceso de fertilización y en la expresión genética; además como vector en la transmisión de alteraciones estructurales del espermatozoide y el devenir reproductivo.

Hoy sabemos que existe una relación directa entre las técnicas de reproducción asistida y las características en el devenir reproductivo, no solo en la búsqueda de un recién nacido sano sino a lo que el proceso obstétrico se ha relacionado como la presencia de enfermedades placentarias (definiendo la placentación como derivado espermático) como es la hipertensión inducida por el embarazo o preeclampsia, la restricción del crecimiento intrauterino, y por ende la presencia de productos de bajo peso al nacer.

El presente trabajo tiene como objetivo comparar las concentraciones de la HAM a nivel seminal en sujetos varones fértiles e infértiles.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Comparar cuantitativamente las concentraciones de hormona anti-Mülleriana en líquido seminal de pacientes infértiles con oligozoospermia con varones fértiles.

### **HIPOTESIS:**

Existe diferencia entre los niveles de las concentraciones seminales de la HAM entre el grupo de pacientes fértiles e infértiles.

## **DISEÑO DEL ESTUDIO**

Es un estudio piloto, descriptivo

Es un estudio transversal y analítico.



## MATERIAL Y MÉTODO

### Criterios de Inclusión y Exclusión:

- Criterios de Inclusión:
  - Pacientes con 1 año de búsqueda intencionada de embarazo sin haberlo logrado y sin factor femenino asociado que autoricen su participación.
  - Pacientes con diagnóstico de infertilidad masculina basado en los criterios de la OMS 2010
  - Voluntarios que han demostrado embarazo de la pareja en un periodo menor a un año.
  - Espermocultivo negativo.
  - Muestra seminal con cuenta leucocitaria menor a  $1 \times 10^6$  /ml.
  - Concentración espermática menor a 20 millones/ml.
  - Perfil Hormonal normal (FSH, hormona luteinizante (LH), prolactina (PRL), estradiol y testosterona.
  
- Criterios de Exclusión:
  - Pacientes con trastornos eyaculatorios.
  - Pacientes con eyaculación retrógrada.
  - Pacientes con menos de 3 días y más de 6 días de abstinencia sexual.
  - Pacientes que se encuentran con medicación sistémica.
  - Pacientes con enfermedad sistémica.
  - Pacientes con varicocele.

## **METODOLOGIA:**

El presente estudio se realizó en el servicio de Reproducción Asistida del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, con aprobación de los comités de Investigación y de Bioética.

Se obtuvieron muestras seminales con un período de 3 a 5 días de abstinencia sexual; los sujetos fueron divididos en 2 grupos de estudio el grupo A, (n=10) (pacientes con oligozoospermia) y el grupo B, control (n=10), (voluntarios fértiles, con antecedente de embarazo previo dentro de los últimos 12 meses de la realización del presente estudio).

Todos participaron en forma voluntaria y luego de firmar el consentimiento informado.

Todos los participantes tenían una historia clínica completa y un examen físico normal.

Se excluyeron a los pacientes o voluntarios con enfermedades crónico-degenerativas, uso de medicación en forma crónica, exposición crónica a gonadotóxicas (tabaco, alcohol, agentes quimioterápicos). Se descartó varicocele, infecciones del tracto genitourinario incluyendo chlamydia, mycoplasma y ureaplasma; con un número no mayor de  $1 \times 10^6$  células blancas en el eyaculado.

### **Muestras seminales:**

Las muestras seminales fueron colectadas a través de masturbación y el análisis seminal se realizó luego de permanecer 30 minutos en temperatura ambiente para su licuefacción. La evaluación de los parámetros seminales se llevo a cabo usando los criterios de la OMS, 2010<sup>4</sup> y la morfología espermática se valoró usando los criterios estrictos de Kruger.<sup>6</sup> La concentración y movilidad espermática fue realizada con la cámara de Makler (Irving Scientific, Santa Ana, CA) y para la morfología espermática se utilizó tinción con Diff-Quick dye (Dade Diagnostics AG, Dudingen, Switzerland) a una magnificación de 100x. Los remanentes de las muestras se centrifugaron a 400g a 4°C durante 10 minutos con el objeto de aislar el plasma seminal.

El plasma seminal se dividió y almacenó en dos alícuotas a -80°C para la cuantificación de la HAM a través del método de ELISA.

### **Determinación de HAM por método de ELISA:**

Una vez obtenido el plasma seminal se procedió a lectura de los niveles de HAM.

Día 1:

- a. Se colocaron 100µl en cada pozo de una placa de ELISA del anticuerpo primario a una concentración previamente estandarizada, procurando que el volumen total cubra el fondo del pozo y sellar la placa. Posteriormente se incubó toda la noche a 37°C.

Día 2:

- a. Se decantó el primer anticuerpo y se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.05%. Inmediatamente se puso 300µl de solución bloqueadora (PBS 1X pH 7.4 con 1% de BSA y 0.05% de azida de sodio) en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente se lavó.
- b. Se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de proteína recombinante y se puso 100µl de cada una de ellas por duplicado con 100µl de las muestras a analizar. Se incubó toda la noche a 4°C.

Día 3

- a. Se lavó la placa y se puso 100µl del anticuerpo de detección a una concentración preestablecida diluido con TBS-BSA-Tween.
  - a. TBS (Tris buffer saline): 8.0g de NaCl, 0.2g de KCl y 3.0g de trizma base para 1 L)
  - b. TBS-BSA-Tween: TBS con BSA (0.1%) y Tween 20 (0.05%)
- b. Se incubó por lo menos 2 horas a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS-Tween.
- c. Se diluyó 10-20µl de estreptavidina fosfatas alcalina en 10ml de TBS-BSA-Tween por cada placa, se puso 100µl en cada pozo e incubó por 90 minutos a 37°C.
- d. Se lavó 3 veces con PBS-Tween y se puso el sustrato: se diluyeron 2 tabletas de paranitrofenil fosfato (pNPP) de 5mg cada una en 10ml de buffer de cromógeno (5ml de MgCl<sub>2</sub> 1mM + 9.5µl de dietanolamina, se ajustó el pH a 9.5 y se aforo a 10ml), se puso 100µl en cada pozo e se incubaron por 30min a 37°C. a

e. Se leyeron a 410nm en el espectrómetro.

**Determinación hormonal sérica:**

En la misma mañana y antes de la recolección de la muestra seminal a todos los participantes se les tomó una muestra de sangre para realizar la medición de FSH, LH, PRL, testosterona, estradiol, índice de andrógenos libres (IAL, calculado como el total de testosterona dividido entre los niveles de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) por 100) y SHBG. Posterior a la centrifugación a 100xg el suero fue separado y mantenido a -20°C hasta realizar el análisis.

Los niveles hormonales fueron cuantificados por ensayos de quimioluminiscencia inmunométrica usando el sistema Immulite (SIEMENS, Los Angeles, CA).

**Análisis Estadístico:**

Todos los datos fueron expresados como su promedio ( $\bar{x}$ )  $\pm$  desviación estándar (DS) y por el tipo de distribución de la curva se utilizaron pruebas no paramétricas de dos grupos independientes, como la prueba de Wilcoxon.

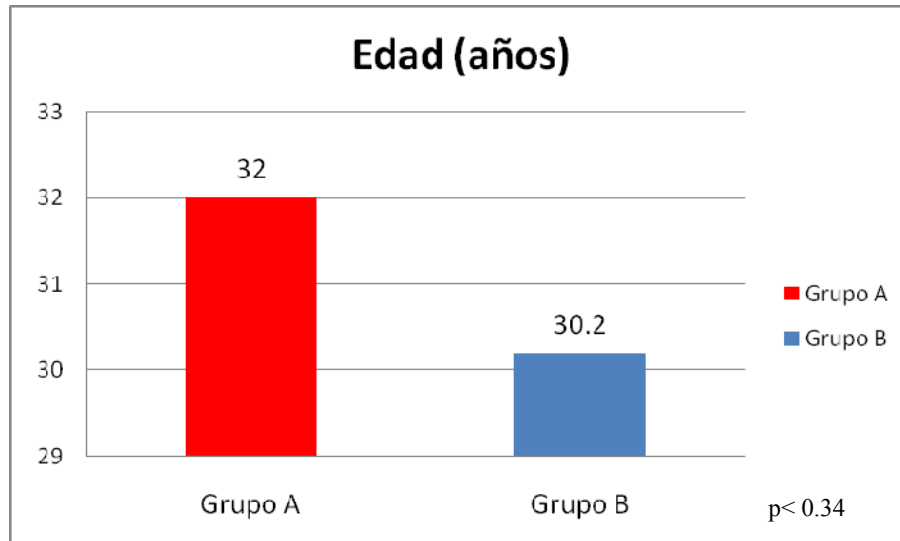
Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS versión 17 (Chicago-IL) se procedió al análisis de las variables usando estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión.

## RESULTADOS

Se analizaron las muestras seminales y de sangre de 20 pacientes que fueron atendidos en el Servicio de Reproducción Asistida. A todos los pacientes se les realizó una espermato biocopia directa para determinar las características seminales de cada uno de los participantes del estudio y poder dividirlos en los 2 grupos de estudio.

En la gráfica No. 1 se aprecian las medias y las desviaciones estándar de las edades de los 20 pacientes incluidos en el estudio. Al aplicar la prueba estadística no se encontró diferencia significativa.

**Gráfica No. 1 Comparación entre los 2 grupos de estudio en relación a la edad en años.**



En la tabla No. 1 se muestran las diferencias entre ambos grupos de acuerdo a las concentraciones de las hormonas realizadas en sangre de los pacientes estudiados. Los niveles de prolactina fueron mayores en el grupo de estudio con un promedio de  $13.45 \pm 3.93$  comparado con el grupo control, B, con un promedio de  $7.89 \pm 3.04$ , con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ).

Los niveles de FSH promedio en el grupo A fueron de  $3.73 \pm 1.75$  comparado al grupo B de  $3.50 \pm 1.3$ , sin diferencia estadísticamente significativa.

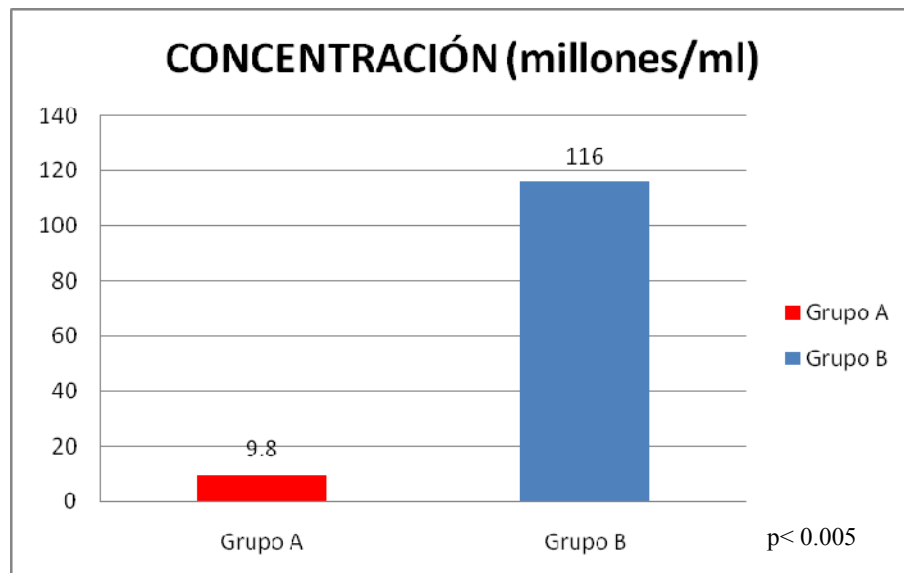
Los niveles de LH, estradiol, testosterona, SHBG, IAL entre ambos grupos fueron similares y no hubo diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla No. 1 Niveles sanguíneos de las hormonas en estudio de los 2 grupos de estudio**

Hormonas	Grupos de Estudio		
	Grupo A	Grupo B	
FSH (mUI/ml)	$3.73 \pm 1.75$	$3.5 \pm 1.30$	NS
LH (mUI/ml)	$3.09 \pm 1.54$	$3.6 \pm 1.52$	NS
Testosterona (ng/ml)	$14.59 \pm 6.43$	$24.48 \pm 8.32$	NS
Estradiol (pg/ml)	$28.7 \pm 11.6$	$24.4 \pm 1.22$	NS
SHGB	$30.57 \pm 9.21$	$24.4 \pm 1.23$	NS
Indice de androgenos libres	$65.8 \pm 7.6$	$43.72 \pm 7.4$	NS
Prolactina	$13.4 \pm 3.93$	$7.89 \pm 3.04$	$p < 0.005$

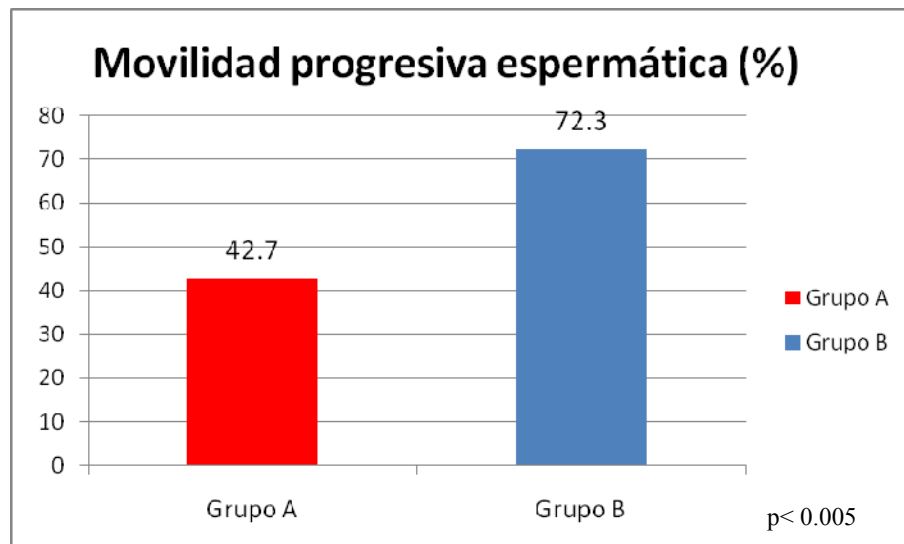
En la gráfica No. 2 se aprecian los resultados de los promedios de las concentraciones espermáticas de ambos grupos de estudio. En el grupo A se observó una menor concentración  $9.8 \pm 4.44$  comparado con el grupo B, control, de  $116 \pm 8.79$  millones de espermatozoides por ml; con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ).

**Gráfica No. 2. Comparación entre los 2 grupos de estudios en relación a la concentración espermática.**



En la gráfica No. 3 se aprecian los resultados de los promedios de la movilidad progresiva espermática de ambos grupos de estudio. En el grupo A se observó una menor movilidad espermática  $42.7 \pm 20.29$  comparado con el grupo B, de  $72.3 \pm 15.7$  porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva; con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ).

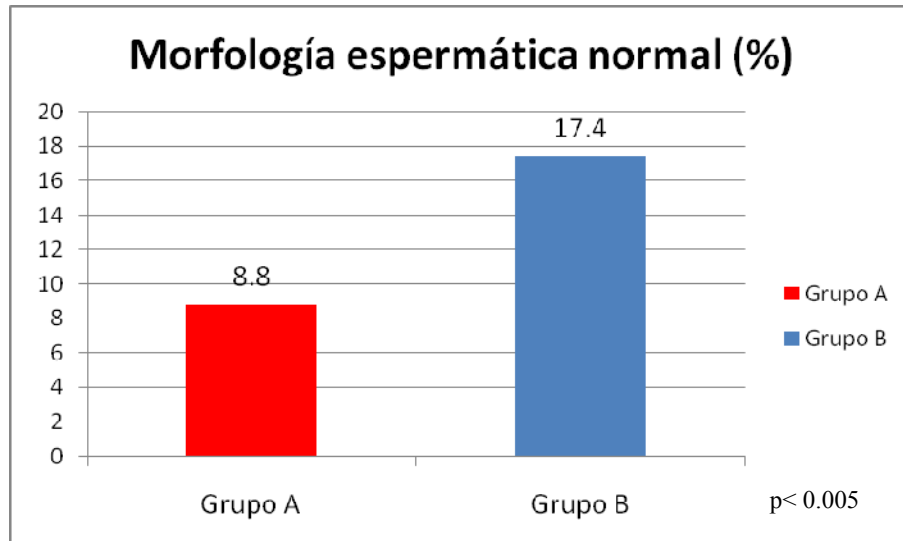
**Gráfica No. 3. Comparación entre los 2 grupos de estudios en relación a la movilidad progresiva espermática.**





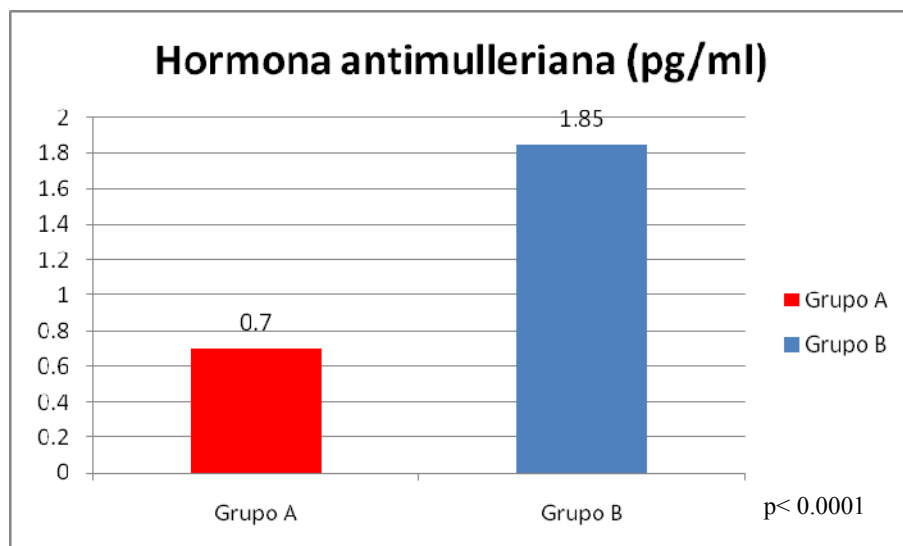
En la gráfica No. 4 se aprecian los resultados de los promedios de la morfología espermática de ambos grupos de estudio. En el grupo A se observó una menor cantidad de espermatozoides normales  $8.8 \pm 3.15$  comparado con el grupo B, de  $17.4 \pm 11.9$  porcentaje de espermatozoides con morfología normal; con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ).

**Gráfica No. 4. Comparación entre los 2 grupos de estudio en relación a la morfología espermática normal.**



En la gráfica No. 5 se aprecia los resultados de las concentraciones de hormona antimulleriana en plasma seminal, donde el promedio en el grupo A fue de  $0.7 \pm 0.05$  pg/ml y con  $1.85 \pm 3.61$  pg/ml en el grupo B. Al aplicar la prueba estadística se encontró diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ).

**Gráfica No. 5 Comparación entre los niveles de AMH en plasma seminal entre ambos grupos de estudio**



## DISCUSION

Este es uno de los primeros estudios que comparan cuantitativamente los niveles de HAM en el líquido seminal en sujetos subfértiles (oligozoospermicos) y que se comparan con sujetos controles con fertilidad comprobada. A pesar de que existe información amplia de la HAM en los procesos reproductivos, su evaluación diagnóstica, y principalmente su valor pronóstico ha sido poco estudiado en pacientes masculinos con algún grado de infertilidad.

En la especie humana, es reconocido que la producción de HAM es mayor en el desarrollo testicular en la etapa fetal y postnatal.<sup>26, 27, 28</sup> La disminución en la expresión de la AMH refleja la diferenciación final de las células de Sertoli y probablemente su regulación este asociada al inicio de la meiosis,<sup>29</sup> sugiriendo que la HAM es principalmente secretada en el polo apical de la célula de Sertoli hacia la luz del túbulo seminífero.<sup>24, 30</sup> Mientras que ciertas cantidades de HAM es secretada después de la pubertad, en adultos las concentraciones de HAM son significativamente mayores en el plasma seminal que a nivel sanguíneo.<sup>30</sup>

En el presente estudio hemos demostrado que las concentraciones de HAM a nivel de plasma seminal son menores en pacientes que cursan con alguna alteración en la espermatogénesis comparado con grupo de varones fértiles voluntarios, lo cual establece la base inicial de este estudio para evaluar el efecto de la HAM en aquellos pacientes con una disminución en el conteo seminal

Del mismo modo, no solo hemos medido los niveles de HAM a nivel seminal sino también los niveles del perfil endocrinológico masculino en pacientes con oligozoospermia y en varones voluntarios con fertilidad comprobada para poder establecer una asociación entre la producción de espermatozoides y los niveles de HAM seminal. Los estudios que han explorado el valor pronóstico de la HAM han sido en aquellos pacientes que cursan con azoospermia no obstructivas y que han sido llevados a técnicas de alta complejidad. Desafortunadamente el valor pronóstico encontrado ha sido controversial como en el caso de un estudio retrospectivo<sup>31</sup> y de algunos estudios prospectivos también.<sup>32, 33</sup>

Duvilla y cols<sup>33</sup> en un estudio prospectivo donde se incluyeron 68 pacientes azoospermicos y 28 oligozoospermicos y un grupo control para determinar el valor pronostico de HAM e inhibina B, establecieron valores de normalidad de AMH a 97.08 pmol/L sin embargo los valores de dispersión fueron muy variables (0.7-605) por lo que estos valores no fueron concluyentes como pronóstico en el resultado de la biopsias testiculares (TESE).

Por otro lado Zalata y cols<sup>34</sup> en un estudio donde se compararon pacientes infértiles con oligoastenoteratozoospermia (OAT) y un grupo control con valores seminales normales, encontraron una cuantificación de la HAM significativamente mayor en varones fértiles comparado con aquellos con algún grado de OAT, estos valores fueron realizados a nivel sérico. En nuestro estudio encontramos no solamente una variación significativa en líquido seminal que por primera vez contrastan con los valores a nivel sérico de la HAM.

El valor de la HAM como marcador en la función de la espermatogénesis en las células de Sertoli ha sido contextualizado desde principios de la década que nos precedió. Fusikawa y cols<sup>18</sup> correlacionó la concentración de la HAM con el volumen testicular estableciendo el comportamiento funcional de la hormona y también lo comparo con sujetos fértiles voluntarios con resultados similares a los encontrados en nuestro estudio. Es reconocido el valor en los parámetros seminales dirigidos no solo en la evaluación diagnóstica del sujeto infértil sino en la toma de decisiones para la aplicación de técnicas de reproducción asistida como la fertilización *in vitro* (FIV) y técnicas alternas como la inyección intracitoplasmática de espermias (ICSI). A pesar de que se han revisado múltiples estudios buscando el valor diagnóstico y pronóstico de la HAM se ha dejado a un lado la evaluación de los parámetros seminales y esto debido a que la cantidad para la evaluación es mínima por el uso de la biopsia testicular. Nuestro estudio encuentra diferencias importantes en los valores seminales y principalmente en el factor morfológico que desde hace mucho tiempo es reconocido su valor pronostico en los procesos de falla en la fertilización y en la generación de los pronúcleos en la fase temprana del desarrollo embrionario.

A pesar de que no existan valores que describan el perfil de los pacientes con OAT de origen inexplicable en el presente estudio realizamos una valoración del perfil en donde

los valores basales no se observaban diferencias importantes, si hubo una discreta tendencia en los niveles séricos de prolactina, pero dentro de parámetros normales; quedando por determinar su papel en este tipo de pacientes.

En el meta-análisis realizado por La Marca y cols<sup>35</sup> encontraron que los niveles de HAM a nivel seminal tienen una relación directa con la espermatogénesis comparado a los niveles de HAM a nivel sérico. Solo hay un estudio<sup>18</sup> en el cual se valoró a pacientes con OAT ya que otros estudios<sup>32, 33</sup> únicamente se han valorado a pacientes con azoospermia no obstructiva (ANO) y obstructiva con niveles no detectables en pacientes con ANO; por lo cual se requiere estudios como este que evalúen la función espermática en pacientes con OAT para evaluación espermática en técnicas reproductivas.

Este estudio de fase inicial aunque discreto ha sentado las bases de los procesos de espermatogénesis evaluados en individuos subfértiles que impactan directamente en las características seminales evaluadas en técnicas de alta complejidad reproductiva. También es de mencionar que a pesar de no tener diferencias estadísticamente significativas en el perfil endocrino valdrá la pena evaluar el comportamiento de hormonas regulatorias como prolactina.

El futuro para la cuantificación de las concentraciones de HAM a nivel seminal nos permitirá evaluar el impacto en los pacientes con diagnóstico de infertilidad y de esta manera podamos tener valores de cohorte que sean predictivos para técnicas de reproducción asistida, como la probabilidad de éxito de una fertilización in vitro.

## ANEXOS

### INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES (INPerIER)

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “CORRELACION DE LOS NIVELES DE LA HORMONA ANTIMULLERIANA EN EL PLASMA SEMINAL EN PACIENTES INFÉRTILES CON OLIGOZOOSPERMIA COMO MARCADOR INDIRECTO DE FALLA EN LA ESPERMATOGENESIS: ESTUDIO PILOTO”

Responsable: Dr. Gerardo Barroso Villa Subdirector de Medicina Reproductiva, Instituto Nacional de Perinatología, Teléfono 55209900 ext 239.

Invitación de Participación:

Se le invita a participar en un estudio de investigación realizado por el INPer.

**PROPÓSITO:** El propósito de este estudio es analizar los niveles de una hormona presentes en el plasma seminal (Anti-Mülleriana) en pacientes fértiles e infértiles con diferente concentración espermática. Todo esto con la finalidad de observar la utilidad de estas hormonas como marcadores pronósticos de la calidad de la muestra seminal. Durante esta investigación requeriremos la donación de una muestra seminal que nos permita identificar la calidad de la misma y contar con datos que eventualmente podrían ayudar al diagnóstico y pronóstico oportuno de infertilidad.

**METODOLOGÍA:** Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, se le pedirá una muestra seminal. Este estudio es solicitado regularmente por los especialistas de Biología de la Reproducción. Este estudio se realiza en forma cotidiana en el protocolo de toda pareja infértil que está buscando embarazo.

**RIESGOS:** La obtención de la muestra seminal es de uso rutinario en las instituciones como el INPer IER y no representa riesgo alguno para el hombre ni su capacidad de fertilidad.

**BENEFICIOS:** No existe beneficio directo para usted, pero su participación podrá dar resultados favorables a otros pacientes vistos en el futuro en nuestra institución.

**COSTOS FINANCIEROS:** Todos los estudios mencionados arriba se harán sin costo alguno para usted y serán utilizados por su médico tratante para orientar su manejo en el Instituto y en su caso, para el seguimiento normal del manejo de la pareja infértil. Independientemente de que decida o no participar en el estudio, usted deberá cubrir el resto de los procedimientos relacionados con el programa de estudio de la pareja infértil en el INPer IER, como cualquier otro paciente perteneciente al instituto.

**ALTERNATIVAS:** Si usted decide no participar en el estudio, su atención médica no se verá afectada de ninguna manera.

**COMPENSACIÓN:** Si usted decide participar en el estudio, le notificamos que no existirá ningún tipo de compensación extra por su participación.

**CONFIDENCIALIDAD:** Se intentará mantener toda la información obtenida en este estudio estrictamente confidencial, excepto la requerida por la ley. Una vez publicados los resultados del estudio, su nombre no será mencionado.

**INFORMACIÓN ADICIONAL:** Cualquier información que se identifique durante el estudio y que perjudique su bienestar, le será informado de inmediato.

**ABANDONO DEL ESTUDIO:** Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y es muy importante que sepa que podrá negarse a participar en cualquier momento, sin que esto afecte su atención médica presente o futura en el INPer.

**LESIONES / COMPLICACIONES:** Este tipo de estudio no se ha relacionado con la presencia de lesiones o complicaciones por la forma en que se lleva a cabo.

**DERECHOS DEL SUJETO:** Si usted requiere obtener mayor información acerca de sus derechos como sujeto de investigación, puede al médico responsable a los teléfonos que aparecen en la primera página. Tenga en cuenta que usted tiene la oportunidad de hacer cualquier pregunta relacionada con el estudio y que ésta le sea contestada a su entera satisfacción.

**DESTINO DE LAS MUESTRAS:** Las muestras analizadas serán desechadas a los recipientes biológicos y no serán utilizadas para ningún otro fin que no sea el de la investigación del protocolo en cuestión.

**CONCLUSIONES:** 1) Usted ha leído y entendido la presente forma de consentimiento informado. 2) Usted está de acuerdo en participar en este estudio de investigación. 3) Al firmar usted recibirá una copia de esta carta.

**\*Nota:** Los testigos no deben tener ninguna relación con el paciente y deben informar y reportar sus datos generales al momento de firmar.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la paciente / fecha / hora.

Testigo 1\*:

Nombre y Firma: \_\_\_\_\_

Fecha y Hora: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Testigo 2\*

Nombre y Firma: \_\_\_\_\_

Fecha y Hora: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la persona que obtiene el consentimiento / fecha / hora

## BIBLIOGRAFÍA

1. The Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association , Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Report on optimal evaluation of the infertile male, *Fertil Steril* 2006;86:S202-209.
2. Lipshultz L, Howards S, *Infertility in the Male* 3rd Ed. Mosby-Year Book 1997.
3. Speroff L, Fritz M, *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 7th Ed. Lippincot Williams Wilkins 2005
4. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen. 5th ed. Switerland: WHO Press, 2010.
5. Auger J, Eustace F, Ducot B, Blandin T, Daudin M and Diaz I. Intra and inter individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod* 200; 15:2360–2368
6. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Matta JF. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology* 1987;30:248-51
7. Josso N, et al; Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical application. *Pediat Endocri Rev* 2006;3(4):347-58
8. Jost A. Recherches sur la differentiation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat crose Morphol Exp* 1947;36:271-315.
9. Donahoe PK, Ito Y, Marfatia, Hendren WH 3rd. The production of Müllerian inhibiting substance by fetal, neonatal and adult rat. *Biol Reprod* 1976;15:329-34.
10. Josso N. Permeability of membranes to the Müllerian inhibiting substance synthesized by the human fetal testis in vitro: a clue to its biochemical nature. *J Cilm Endocrinol Metab* 1972;34 265-70.
11. De Caro R, Sicaro L. Hormona Antimulleriana, de la embriología a la Fertilidad. VI Curso de Especialización en Endocrinología Ginecológica y Reproductiva. SAEGRE 2008.
12. La Marca A, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endoclinol* 2006;64:603-10.



13. Cohen-Haguenuer O, et al.; Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Gener* 1987;44:2-6.
14. Massague J, Wotton D. transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO Journal* 2000;19:1745-54.
15. Zylbersztein C. La hormona anti Mülleriana. Su influencia en la salud reproductiva de la mujer. *Rev Soc Argentina de Endocrinología y Reproducción* 2008;15:13-28.
16. Feyereisen E, Mendez DH, Taieb J, Hesters L, Frydman R, Fanchin R. Anti-Müllerian hormone: clinical insights into a promising marker of ovarian follicular status. 2006, *Reprod Biomed Online*;12:695-703
17. Young J, Chanson P, Salenave S, Noël M, Brailly S, O'Flaherty M et al. Testicular Anti-Müllerian Hormone Secretion Is Stimulated by Recombinant Human FSH in Patients with Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:724-728.
18. Fujisawa M, Yamasaki T, Okada H, Kamidono S. The significance of anti-Müllerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis. *Hum Reprod* 2002; 17: 968-970.
19. Hutson JM, Fallat ME, Kamagata S. Phosphorylation events during Müllerian duct regression *Science* 1986;223:586-589.
20. Josso N, Picard JY, Rey R, Clemente N. Testicular anti-müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications, 2006;3:347-358.
21. Racine C, Rey R, Forest M.G, Louis F, Ferré A, Josso N, et al. Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:594-599.
22. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe P. Müllerian Inhibiting Substance: An Instructive Developmental Hormone with Diagnostic and Possible Therapeutic Applications. *Endocr Rev* 2001; 22: 657-674.
23. Siow Y, Fallat M.E, Amin F.A, Belker A.M. Müllerian Inhibiting Substance Improves Longevity of Motility and Viability of Fresh and Cryopreserved Sperm. *J Androl* 1998; 19: 568-572.
24. Fallat M.E, Siow Y, Belker A.M, Boyd J.K, Yoffe S, MacLaughlin D.T. The presence of Müllerian inhibiting substance in human seminal plasma. *Hum Reprod* 1996; 11: 2165-2169.

25. Anderson R, Stewart Irvine D, Balfour C, Nigel P.G, Riley S.C. Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum Reprod* 1998;13:920-926
26. Tran D, Picard JY, Millar MR, Brooks AN. Immunocytochemical detection of anti-Müllerian hormone in Sertoli cells of various mammalian species including human. *J Histochem Cytochem* 1987;35:733-43
27. Sweeney T, Saunders PTK, Millar MR, Brooks AN. Ontogeny of anti-Müllerian hormone, 3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and androgen receptor expression during ovine fetal gonadal development. *J Endocrinol* 1997;153:27-32.
28. Kuroda T, Lee MM, Haqq CM, Powell DM, Mangano TF. Müllerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle stimulating hormone in the rat testes. *Endocrinology* 1990;127:1825-32
29. Meyts ER, Jorgensen N, Grem N et al. Expression of anti-müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3836-44.
30. Fenichel P, Rey R, Poggioli S et al. Anti-müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Human Reprod* 1999;14:2020-24
31. Mitchell V, Boitrelle F, Pigny P, Robin G, Marchetti C, Marcelli F, Rigot JM. Seminal plasma levels of anti-Müllerian hormone and inhibin B are not predictive of testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: a study of 139 men. *Fertil Steril* 2010;94:2147-50.
32. Mostafa T, Amer MK, Abdel-Malak G, Nasser TA, Zohdy W, Ashour S, El-Gayar D, Awad HH. Seminal plasma anti-Müllerian hormone level correlates with semen parameters but does not predict success of testicular sperm extraction (TESE). *Asian J Androl* 2007;9(2):265-70.
33. Duville E, Lejeune H, Trombert-Paviot B, Gentil-Perret A, Tostain J, Levy R. Significance of inhibin B and anti-Müllerian in seminal plasma: a preliminary study. *Fertil Steril* 2008;89:444-8.
34. Zalata AA, Hasan AH, Nada AP, BRagais FM, Agarwal A, Mostafa T. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism and seminal anti-Müllerian hormone in fertile and infertile men. *Andrologia* 2008;16(2):392-7.

35. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A, Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human Reprod Update* 2010;16(2):113-30.