

Efectos de las técnicas de capacitación sobre la morfología espermática y los resultados de la inseminación intrauterina

Effects of techniques for sperm capacitation of sperm morphology and results of Intrauterine Insemination

Soriano MJ, Molina , I, Martínez, JV, Rubio, JM.

Servicio de Ginecología. Hospital Universitario de Valencia

RESUMEN

Antecedentes: La inseminación intrauterina (IIU) combinada con la hiperestimulación ovárica controlada es un tratamiento económico, sencillo, menos estresante e invasivo que otras técnicas de Reproducción Asistida. Su tasa de éxito tras varios ciclos, resulta similar a la obtenida con las técnicas más complejas y depende de varios factores, entre los que destacan la edad, el índice de masa corporal, el grosor endometrial, el número de folículos superiores a 16 mm, la calidad del semen utilizado, la morfología espermática y el tipo de esterilidad de causa femenina. Sin embargo, no existe un consenso sobre la medida en la que estos factores influyen en la probabilidad de conseguir embarazo en IIU.

Objetivos: Analizar la influencia de la morfología espermática sobre la tasa de gestación en IIU con el fin de recomendar la técnica de selección espermática más adecuada para la realización de la inseminación. Además, se pretende identificar los factores que predicen la obtención de gestación en IIU, con el fin de desarrollar un modelo de predicción de gestación basado tanto en las variables femeninas, como en las de la muestra de semen.

Ámbito: Estudio retrospectivo de cohortes de muestras de semen en el laboratorio de Andrología de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia desde Enero de 2013 hasta Abril de 2014.

Diseño: Se analizaron 100 muestras de sémenes diagnósticos para ver la técnica de capacitación más adecuada y 120 muestras de IIU para identificar los factores predictores de gestación.

Material y método: El estudio de los sémenes diagnósticos, incluyó la evaluación de variables ma-

Aceptado: 14 ABRIL 2016

Correspondencia: jvms20@hotmail.com

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

croscópicas, microscópicas y de la morfología mediante la tinción de Diff-quick y el sistema CASA. La preparación de las muestras de semen se realizó utilizando las técnicas de swim-up y gradientes de densidad. Tras finalizar el proceso de capacitación, se evaluó el recuento, motilidad, número total de espermatozoides móviles capacitados y morfología para ambas técnicas de selección espermática.

El estudio de las muestras de semen destinadas a IIU, incluyó la evaluación de recuento, motilidad y morfología en fresco y tras el capacitado de la muestras mediante swim-up. Se evaluó la relación de variables asociadas a la mujer (edad, IMC, número de folículos mayores de 16 mm, causa de esterilidad, grosor endometrial) y al varón (causa de esterilidad, concentración, motilidad, morfología, número de espermatozoides móviles totales utilizados para inseminación, origen de la muestra) con la tasa de gestación en IIU

Resultados: Se analizaron un total de 100 muestras de sémenes diagnósticos, de los cuales el 52 % se correspondieron con varones normozoospermicos y el 48 % con varones oligozoospermicos. Además, se estudiaron un total de 120 ciclos de IIU con un total de 12 embarazos y 2 abortos, lo que supone una TG global por ciclo del 10% y una tasa de aborto del 1,7 %.

Los resultados obtenidos demuestran que la morfología espermática se asocia a la esterilidad de causa masculina y que los gradientes de densidad permiten recuperar un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides normales (p -valor=0,0000), aunque la morfología de la muestra capacitada no influye en la TG en IIU. Los criterios estrictos de Kruger y el sistema CASA no permiten predecir el éxito de la IIU y en el análisis de regresión logística realizado se ha podido observar que las variables femeninas grosor endometrial, número de folículos >16 mm y la variable seminal motilidad en capacitado aumentan la probabilidad de conseguir gestación en IIU.

Conclusiones: La técnica de selección espermática que permite recuperar un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides morfológicamente normales son los gradientes de densidad. Sin embargo, se ha demostrado que la morfología espermática de la muestra de semen capacitada no influye en la TG en IIU. Además, los criterios estrictos de Kruger y el sistema CASA no permiten predecir el éxito de la IIU. Por último, se obtiene un modelo de predicción de gestación en IIU que dependería de las variables femeninas grosor endometrial y número de folículos mayores de 16 mm el día de la hCG, y de la variable motilidad de la muestra capacitada para la realización de la IIU.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 52-66 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: *Reproducción Asistida, CASA, inseminación intrauterina, tasa de gestación*

SUMMARY

Background: The combined intrauterine insemination (IUI) with controlled ovarian hyperstimulation is an inexpensive, simple, less stressful and less invasive treatment compared with other Assisted Reproduction Techniques (ART). Its success rate after several cycles, is similar to that obtained with the most sophisticated techniques and depends on several factors, among which are age, body mass index, endometrial thickness, the number of follicles over 16 mm, semen quality used, sperm morphology and type of female infertility cause. However, there is no consensus on the extent to which these factors influence the likelihood of achieving pregnancy in IUI.

Objectives: The aim of this study is to analyze the influence of sperm morphology on IUI pregnancy rate (PR) to recommend the most appropriate sperm selection technique for performing insemination. Another objective is to relate the morphology parameters with concentration and motility fresh and capacitation semen samples, and identify factors that predict the positive or negative result of pregnancy through a gestation model based on female variables and semen sample characteristics.

Setting: Retrospective cohort study of semen samples in the laboratory of Andrology in the Assisted Human Reproduction Unit of the Hospital La Fe in Valencia, from January 2013 to April 2014.

Design: 100 semen diagnoses samples were studied to identify the most appropriate sperm selection technique and 120 samples of IUI to identify predictors of pregnancy.

Material and method: The study of semen diagnosis included evaluation of macroscopic and microscopic variables, and of morphology by Diff-quick and CASA system. The preparation of semen samples was performed using the swim-up techniques and density gradients. Count, motility, total number of motile sperm and morphology for both sperm selection techniques was evaluated after completing the capacitation.

The study of semen samples intended for IUI, included evaluation of count, motility and morphology in fresh samples and after the samples capacitated by swim-up. The relationship of variables associated with women (age, BMI, number of follicles over 16 mm, cause of infertility, endometrial thickness) and with men (cause of infertility, concentration, motility, morphology, number of total motile sperm used, origin of the sample) was correlated with pregnancy rate after IUI.

Results: A total of 100 semen diagnosis samples were studied: 52% corresponded to normozoospermic men and 48% corresponded to oligozoospermic men. In addition, a total of 120 cycles of IUI were studied; the outcome was 12 pregnancies and 2 miscarriages, which meant a pregnancy rate (PR) of 10% and a miscarriage rate of 1,7%. No multiple pregnancies were obtained and there was one ectopic pregnancy.

The results show that sperm morphology is associated with male infertility causes and density gradients can retrieve a significantly higher percentage of normal spermatozoa (p-value=0,0000), although sperm morphology does not affect the IUI pregnancy rate. Kruger's strict criteria and the CASA system cannot predict IUI success and the logistic regression analysis performed showed that the endometrial thickness, number of follicles > 16 mm and sperm motility increase the likelihood of getting pregnant in IUI.

Conclusions: The sperm selection technique that makes it possible to recover a significantly greater percentage of normal spermatozoa are density gradients. However, it has been demonstrated that sperm morphology of the capacitation semen samples does not affect IUI pregnancy rate. In addition, Kruger's strict criteria and the CASA system cannot predict IUI success. Lastly, a gestation prediction model for IUI is obtained that depends on the female variables: endometrial thickness, number of follicles over 16 mm on the day of hCG and of the sperm motility to perform IUI .

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 52-66 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: Assisted Reproduction, CASA, intrauterine insemination, pregnancy rate

INTRODUCCIÓN

La inseminación intrauterina (IIU) es una Técnica de Reproducción Asistida (TRA) de eficacia reconocida utilizada en distintos casos de infertilidad. Resulta económica, sencilla, fácil de reproducir, presenta pocas restricciones y además, destaca por la ausencia de complicaciones potencialmente serias, por lo que su uso en los últimos años se ha incrementado considerablemente. Se considera como el primer tratamiento para parejas con infertilidad por factor masculino moderado, moco cervical hostil, anticuerpos anti-espermatozoide o infertilidad idiopática o de causa desconocida, entre otros (Van Waart et al., 2001). Su éxito está asociado generalmente al número total de espermatozoides móviles (NTSM), al porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (Wainer et al., 2004) y al número de folículos maduros el día de la administración de la hCG (Vargas Hernández et al., 2013). La inseminación artificial consiste en la introducción de una muestra de semen, previamente capacitada, en el interior del útero de la mujer. De esta manera, se acorta la distancia que separa al espermatozoide del óvulo y se facilita el encuentro entre ambos gametos. Las dos técnicas de capacitación más empleadas que mejoran la

calidad de la muestra al aumentar el número de espermatozoides móviles y morfológicamente normales son el swim-up convencional y los gradientes de densidad.

La morfología espermática se considera un parámetro básico en el análisis estándar del semen. Para evaluarla se emplea el sistema automático CASA. Pese a sus múltiples ventajas sobre la rapidez y la uniformidad en el análisis, el sistema presenta una serie de restricciones asociadas a las técnicas de tinción de las muestras de espermatozoides, al uso del programa informático y a la subjetividad del técnico (Graves et al., 2005).

Muchos estudios demuestran que los parámetros de motilidad y morfología normal de la muestra seminal influyen en la tasa de gestación en IIU (Van Voorhis et al., 2001). Aún así, no existe un consenso acerca del valor predictivo de la morfología en IIU porque el criterio estricto de morfología se desarrolló en un principio para técnicas de fecundación *in vitro* (FIV).

El análisis de los espermatozoides asistido por ordenador (Computer-aided sperm analysis, CASA), es un sistema automático diseñado para proporcionar información exacta y precisa acerca de la concentración, motilidad, viabilidad o

morfología espermática. El estudio estadístico se realiza basándose en el análisis de las imágenes procesadas de los espermatozoides tomadas por una cámara de vídeo conectada al microscopio y al ordenador. Para la evaluación de la morfología, el programa detecta la anchura y longitud de la cabeza y de la pieza intermedia del espermatozoide, el porcentaje de integridad del acrosoma, así como el área y perímetro total de la cabeza (Lu et al., 2013).

Se ha demostrado que los espermatozoides morfológicamente normales nadan más rápido y más recto, además de exhibir mayor frecuencia de golpe flagelar (Olmedo et al., 1995). En cambio, las anomalías espermáticas se han asociado con alteraciones de la fertilidad, siendo la mayoría de los espermatozoides morfológicamente anormales frecuentemente inmóviles o con una movilidad muy lenta (Overstreet, 1981). Son muchos los estudios que demuestran que los parámetros de motilidad y morfología normal de la muestra seminal influyen en la tasa de gestación (Van Voorhis et al., 2001). La morfología espermática se considera un parámetro que ayuda a predecir el pronóstico del procedimiento. Un metanálisis reciente encontró mayor tasa de embarazo en parejas con morfología normal ≥ 4 %. Al comparar las características de los grupos con morfología normal frente a anormal existió diferencia en el porcentaje de movilidad progresiva en la muestra de semen capacitada (aproximadamente el 90 y 80 % respectivamente), (Kably-Ambe et al., 2013). Otro estudio también demostró que un porcentaje de espermatozoides normales mayor al 30 % daba una tasa de gestación significativamente mayor cuando el NTSM era superior a los 5 millones (Badawy et al., 2009).

Pese a dichas evidencias, no existe consenso acerca del valor predictivo de la morfología en IUI porque el criterio estricto de morfología se desarrolló en un principio para técnicas de fecundación *in vitro*. Muchos estudios prospectivos y retrospectivos han demostrado que la morfología espermática por sí sola, ya sea analizada antes o después de las técnicas de capacitación, no ayuda a dar un valor predictivo de los resultados de la IUI. En cambio, la evaluación del NTSM en conjunto con el análisis de la morfología espermática se considera un factor importante para la toma de decisiones clínicas (Badawy et al., 2009). A pesar de ello, es necesario un estudio prospectivo con mayor significación clínica, además de un buen diseño experimental para establecer la influencia de este parámetro en el éxito de la IUI (Kably-Ambe et al., 2013).

Los **objetivos** del presente trabajo son:

1. Comparar la morfología espermática antes y después de la capacitación en función de las técnicas de capacitación utilizadas (swim-up y gradientes de densidad).
2. Relacionar los parámetros de morfología con la con-

centración y con la motilidad de la muestra en fresco y en capacitado.

3. Analizar la influencia de la morfología espermática sobre la tasa de gestación en inseminación intrauterina con el fin de recomendar la técnica de selección espermática más adecuada.
4. Establecer un modelo de gestación en IIU basado en las variables femeninas y las variables relacionadas con la muestra de semen.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Tipo de estudio

Estudio retrospectivo de cohortes en el que se incluyeron 100 muestras de sémenes diagnósticos y las muestras de semen procedentes de 120 ciclos consecutivos de inseminación intrauterina realizados desde Enero de 2013 hasta Abril de 2014 en el laboratorio de Andrología de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia. De las 120 inseminaciones intrauterinas (IIU) realizadas, 102 se correspondieron con inseminaciones intrauterinas con semen homólogo (IAH) y 18 con semen de donante (IAD).

2. Diseño experimental

En primer lugar, se analizaron las muestras de sémenes diagnósticos y se evaluó la técnica de selección espermática que permitía obtener un porcentaje mayor de espermatozoides morfológicamente normales.

En segundo lugar, se analizaron las muestras de semen destinadas a IAH o IAD y se evaluó la relación existente entre la morfología espermática tras la capacitación por swim-up y la TG. En el caso de que la morfología espermática mejore las TG en IAH/D se recomendará la utilización de la técnica de capacitación que permita obtener un mayor porcentaje de espermatozoides normales. En caso contrario se recomendará la técnica de selección espermática que permita obtener una mayor motilidad en capacitado.

3. Valoración y preparación de las muestras de semen

El estudio rutinario de las muestras seminales, incluyó la evaluación de variables macroscópicas, microscópicas y de la morfología recomendada por la OMS 1999-2010. Para el análisis de la morfología se utilizó la tinción de Diff-quick y el sistema CASA. Los espermatozoides fueron procesados por el programa informático Integrated Semen Analysis System (ISAS v.1.2 Serial Number: 0030149D). Se determinaron las características morfométricas de la cabeza,

acrosoma y pieza intermedia del espermatozoide en cuanto a tamaño (área, perímetro, longitud y anchura) y forma (elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad), de acuerdo con los criterios estrictos de Kruger y de la OMS 1999-2010.

La preparación de las muestras de semen se realizó utilizando las técnicas de swim-up y gradientes de densidad recomendadas por la OMS del 2010. Tras finalizar el proceso de capacitación, se evaluó el recuento y motilidad, y se calculó el número total de espermatozoides móviles capacitados (REMC) para ambas técnicas de selección espermática. Además, se separó una alícuota de la muestra capacitada por swim-up y de la misma muestra capacitada por gradientes para realizar una extensión sobre un portaobjetos, teñirla y analizar la morfología espermática.

4. Realización de la IIU

El protocolo de inseminación intrauterina incluye los siguientes pasos: Hiperestimulación Ovárica controlada (HOC) suave con el fin de obtener un máximo de 3 folículos maduros, preparación de la muestra de semen, introducción del semen capacitado en la cavidad uterina, apoyo de la fase lútea y test de embarazo.

– Hiperestimulación Ovárica Controlada

Antes de iniciar la HOC, las mujeres son sometidas a un examen físico en el que se anota la edad, el Índice de Masa Corporal (IMC, kg/cm²), un estudio hormonal para conocer los valores de FSH y LH basales, una revisión ginecológica que incluye ecografía abdominal y transvaginal, y una histerosalpingografía para evaluar la permeabilidad de las trompas de Falopio.

El protocolo de estimulación ovárica se lleva a cabo con FSH recombinante (Gonal-F((®)), Serono Laboratorios, Madrid y/o Puregon((®)), Organon Laboratorios, Barcelona) y es individualizado para cada paciente. La dosis de hormona administrada oscila entre 75-170 unidades internacionales (UI), variando según la edad y el IMC de la paciente. Dicha hormona se administra hasta obtener un máximo de 3 folículos entre 18-20 mm de diámetro. Las mujeres que presentaron más de 3 folículos preovulatorios el día de la administración de la hCG fueron canceladas por riesgo de gestación múltiple. La monitorización del crecimiento folicular se realizó mediante determinación de los niveles séricos de estradiol y ecografía transvaginal.

Para inducir la ovulación de forma controlada se administran 250 µg de la hormona gonadotrófica coriónica humana recombinante (hCG, Ovitrelle), la cual provoca un pico endógeno de LH determinando la ruptura folicular y su posterior luteinización. La ruptura folicular ocurre entre las

36-38 horas tras la administración de la hCG, momento en el cual se programa la realización de la inseminación.

– Preparación de la muestra de semen e IIU

Para realizar la inseminación se coloca un espéculo en la vagina de la mujer y se pasa por el canal cervical un catéter blando cargado con 0,2-0,5 ml de la suspensión de espermatozoides capacitados, que se inyectan lentamente con la ayuda de una jeringa de insulina, hasta depositar toda la suspensión en el fondo del útero. Tras 20 minutos de reposo la mujer se reincorpora y sigue con sus hábitos diarios.

– Apoyo de la fase lútea

Para dar soporte a la fase lútea se administran 200 mg/24h de progesterona (Utrogestan) por vía vaginal desde la noche de la inseminación hasta el día en que se realice el test de embarazo. Esta hormona facilita que se produzca la implantación del embrión. En el caso de lograr gestación, la administración de la progesterona se prolonga hasta la semana 12 de la gestación.

– Test de embarazo

Se consideraron gestantes aquellas mujeres que presentaron unos niveles de beta-hCG superiores a 25 mUI/ml (mili unidades internacionales por mililitro) en el día 14 tras la realización de la inseminación. La gestación se confirmó por la presencia de saco gestacional con latido cardíaco a las 3 semanas de la inseminación. La gestación doble se definió como el número de gestaciones dobles por gestación obtenida.

5. Variables consideradas

– **Variables asociadas a la mujer:** edad (<30, 30-35, >35 años), índice de masa corporal, IMC (< 25 y >25) (Macizo et al., 2012), número de folículos ≥16 mm (NF16), causa de esterilidad femenina (anovulación, ANV; endometriosis, END; fase lútea inadecuada, FLI; fallo ovárico prematuro, FOP; función reproductora normal, FRN; lesión tubárica no obstructiva, LTN; malformación genital, MGN), grosor endometrial el día de la hCG y gestación.

– **Variables asociadas al varón y a la muestra de semen:** causa de esterilidad masculina según la OMS del 2010 (varón normal, VN; varón oligoastenozoospermico moderado, OAM; varón azoospermico, IAD), concentración (millones espermatozoides/ml), motilidad progresiva lineal y morfología en fresco y capacitado por ambas técnicas, número de espermatozoides móviles totales utilizados para inseminación, NTSM (NTSM≥5 y NTSM<5) y origen de la muestra de semen (homólogo o donante).

6. Análisis estadístico

Los datos fueron recogidos del programa informático PIERA (Esterilidad y Reproducción Asistida Programa Interactivo, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia). El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Plus versión 5.1 (Manugistics, Inc., Rockville, MA, Estados Unidos). En la evaluación de las muestras diagnóstico se realizó una prueba de comparación de medias (t-Student). Para analizar el efecto de la morfología espermática sobre el tipo de infertilidad del varón se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. La influencia del tipo de semen sobre la tasa de gestación se estudió mediante la realización de tablas cruzadas y el efecto de la morfología sobre la tasa de gestación se evaluó mediante un estudio de regresión logística, en el que se incluyeron todas las variables clínicas femeninas y masculinas analizadas.

RESULTADOS

Efectos de las técnicas de capacitación sobre la morfología espermática en sémenes diagnósticos.

Se estudiaron un total de 100 muestras de sémenes diagnósticos, de los cuales el 52 % se correspondieron con varones normozoospermicos y el 48 % con varones oligoastenoospermicos. En la tabla 1 se comparan los parámetros de concentración, motilidad y morfología en fresco entre muestras normozoospermicas y oligoastenoospermicas. Las muestras normozoospermicas presentaron una concentración y motilidad en fresco significativamente superior a las muestras oligoastenoospermicas, observándose además que la causa de esterilidad masculina se debió fundamentalmente a la motilidad de la muestras (<32 % de motilidad lineal progresiva, astenoospermia), dado que la concentración fue superior a los valores establecidos por la OMS 2010 (>15 millones de espermatozoides/ml). En relación con la morfología en fresco, se observó un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides normales en las muestras normozoospermicas (8,8 vs 4,6; p=0,0128).

En la tabla 2 se compara la morfología espermática en fresco y tras la capacitación con swim-up y gradientes entre muestras normozoospermicas y oligoastenoospermicas.

El número medio de espermatozoides morfológicamente normales resultó mayor tras la capacitación, siendo los gradientes de densidad la técnica que recuperó un mayor número medio de espermatozoides normales tanto en varones normozoospermicos como en varones oligoastenoospermicos (18,8 vs 11,6; p=0,0006).

En la tabla 3 se presenta la media, desviación típica y significación estadística para la concentración, motilidad y morfología de las muestras capacitadas por ambas técnicas

(swim-up y gradientes de densidad). Se observa que la capacitación con gradientes de densidad proporciona una concentración en capacitado similar a la obtenida con el método del swim-up (20,2 vs 24,8; p=0,1900), con una motilidad significativamente inferior a la del swim-up (81,2 vs 84,8; p=0,0023) y con un número medio de espermatozoides morfológicamente normales significativamente superior al que se obtiene con el swim-up (15,0 vs 9,4; p=0,0000).

TABLA 1

Media, desviación típica y significación estadística (p valor) de los parámetros seminales, concentración, motilidad y morfología en fresco en función de las muestras normozoospermicas y oligoastenoospermicas

Normales	Oligoasteno		p-valor
	Media ± SD	Media ± SD	
Total	52	48	
Recuento Fresco	52,7±3,8	21,3±4,0	0,0000
Motilidad Fresco	48,73±0,9	26,1±1,0	0-0000
Morfología Fresco	8,8±0,9	4,6±0,9	0,0128

TABLA 2

Media, desviación típica y significación estadística de la morfología espermática antes y después de la capacitación con swim-up y gradientes entre muestras normozoospermicas y oligoastenoospermicas

Normales		Oligoasteno		p-valor
		Media ± SD	Media ± SD	
Spz normales	Fresco	8,8±0,9	4,6±0,9	0,0128
	Swim-up	11,4±0,9	7,3±0,9	0,0032
	Gradiente	18,8±1,4	11,6±1,4	0,0006

TABLA 3

Media, desviación típica y significación estadística de los parámetros seminales, concentración, motilidad y morfología tras la capacitación por swim-up y gradientes de densidad

	Gradiente	Swim-up	p-valor
	Media ± SD	Media ± SD	
Recuento	20,2±20,1	24,8±20,1	0,1900
Motilidad	81,2±7,8	84,8±6,1	0,0023
Morfología	15±10,1	9,4±7,1	0,0000

Efectos de la morfología espermática, de las variables clínicas femeninas y de la muestra de semen sobre la tasa de gestación en inseminación intrauterina

Se estudiaron un total de 120 ciclos de inseminación intrauterina con un total de 12 embarazos y 2 abortos obtenidos, lo que supone una tasa de gestación (TG) global por ciclo del 10 % (12/120) y una tasa de aborto por ciclo realizado del 1,7 % (2/120). No se obtuvieron gestaciones múltiples.

En las IUI realizadas con semen homólogo (IAH) la TG por ciclo fue del 9,8 % (10/102) y la tasa de aborto por ciclo fue del 2 % (2/102). En el caso de los varones azoospermicos en los que se utilizaron muestras congeladas de donantes anónimos (IAD) se obtuvo una tasa de gestación del 11,1 % y no se obtuvieron gestaciones múltiples ni abortos (tabla 4).

Efectos de las variables asociadas a la muestra de semen sobre la TG en IUI

No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables relacionadas con la muestra de

TABLA 4

Resultados de la tasa de gestación y de aborto por ciclo en IAH, IAD y en el total de inseminaciones

	IAH (%)	IAD (%)	TOTAL (%)
TG	9,8 (10/102)	11,1 (2/18)	10 (12/120)
TA _b	2 (2/102)	0 (0/100)	1,7 (2/120)

semen utilizada para la realización de la inseminación intrauterina. Tanto la concentración como la motilidad en fresco y en capacitado así como la morfología en capacitado y el NTSM presentaron unos valores similares cuando se compararon en función de la obtención de gestación (tabla 5).

En la tabla 6 se muestra la TG en función de los intervalos considerados para NTSM (Wainer et al., 2004), morfología en capacitado por los criterios estrictos de Kruger y tipo de muestra (semen homólogo/donante) utilizada para la realización de la inseminación.

No se observaron diferencias significativas en función de los intervalos considerados para el NTSM ni en los intervalos

TABLA 5

Medias, desvío estándar y significación estadística para las variables de la muestra de semen utilizada para la IUI en función de la TG

		No gestación Media ± SD	Gestación Media ± SD	p-valor
FRESCO	Recuento	46,0 ± 2,6	48,3 ± 7,8	0,7783
	Motilidad	37,6 ± 1,7	42,9 ± 5,0	0,2875
	Recuento	33,5 ± 2,6	36,5 ± 7,8	0,7093
	Motilidad	82,2 ± 0,7	85,4 ± 2,2	0,1721
Morfología en capacitado		18,6 ± 1,2	23,0 ± 3,5	0,2449
NTSM		11,0 ± 0,8	12,6 ± 2,6	0,5640

TABLA 6

TG en función de los intervalos considerados para NTSM, morfología en capacitado y tipo de semen utilizado

		TOTAL (%)	TG (%)	p-valor
NTSM	< 5	28 (34/120)	6 (2/34)	0,5434
	≥ 5	72 (86/120)	11,6 (10/86)	
Morfología	< 4	5,8 (7/120)	0 (0/7)	0,6026
	4 – 14	36,6 (44/120)	9 (4/44)	
	> 14	80 (69/120)	11,6 (8/69)	
Tipo de semen	H	85 (102/120)	9,8 (10/102)	0,8647
	D	15 (18/120)	11 (2/18)	

los correspondientes a la morfología en la muestra capacitada. Tampoco se observaron diferencias significativas en función de la utilización de semen homólogo o de donante. Sin embargo, cabe destacar que las TG resultaron mayores cuando el NTSM ≥ 5 millones de espermatozoides/ml, cuando el porcentaje de espermatozoides normales era superior al 14% y en el caso de uso de semen de donante.

En función del tipo de muestra de semen utilizada para la IIU (homólogo/donante), se observó que las muestras de semen homólogo presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales tras capacitar con un número de NTSM significativamente superior. A pesar de ello, la TG fue superior para las muestras de donante. Todo ello parece indicar que la mayor TG obtenida para las muestras de donante, aunque las diferencias no fueron significativas, no se debería ni a la morfología espermática ni al NTSM.

Efectos de las variables femeninas sobre la TG en IIU

No se observan diferencias estadísticamente significativas en los valores medios de la edad, del IMC y del grosor endometrial en función de la obtención o no de gestación. Se observó un mayor grosor endometrial en el caso de las mujeres que consiguieron gestación tras IIU aunque las diferencias obtenidas no alcanzaron significación estadística (9,4 vs 10,6 $p=0.2328$) (tabla 7).

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en los intervalos considerados para edad (Merviel et al., 2010), IMC (Macizo et al., 2012) y número de folículos mayor a 16 mm. Se observa una TG del 13,7 % para mujeres < 35 años y del 7,2% para ≥ 35 , observándose también un aumento de la TG conforme aumenta el número de folículos ≥ 16 mm el día de la hCG. Sin embargo, en el caso del IMC no se observan diferencias en la TG (tabla 8).

Respecto a la distribución de las distintas causas de esterilidad femenina y su correspondiente TG se observó que las causas de esterilidad más frecuentes fueron la función re-

TABLA 8

TG en función de los intervalos considerados para la edad, el IMC y el NF16

		TOTAL (%)	TG (%)	p-valor
Edad (años)	< 35	42,5 (51/120)	13,7 (7/51)	0,3888
	≥ 35	57,5 (69/120)	7,2(5/69)	
IMC (kg/cm ²)	≤ 25	75 (90/120)	10 (9/90)	1,0000
	> 25	25 (30/119)	10 (3/30)	
NF ≥ 16 mm	1	79 (95/120)	8,4 (8/95)	0,2523
	2	19 (23/120)	13 (3/23)	
	3	1,6 (2/120)	50 (1/2)	

productora normal (55,8 %), anovulación (15 %) y la fase lútea inadecuada (8,3 %). Se observaron diferencias estadísticamente significativas para la TG en función de la causa de esterilidad ($p=0,0001$), siendo la malformación genital (100 %) y la lesión tubárica no obstructiva (42,9 %) las causas que mayor TG presentaron. Sin embargo, dado el bajo tamaño de la muestra para las causas de esterilidad de endometriosis (5,8 %), fallo ovárico prematuro (7,5 %) y malformación genital (2 %), estas diferencias no deben tomarse en consideración a la hora de establecer un valor pronóstico para la TG en IIU en función del tipo de esterilidad.(tabla 9)

Análisis de regresión logística para las variables femeninas y de la muestra de semen utilizada para la IIU en función de la gestación.

Los resultados del análisis de regresión logística binaria stepwise para las variables femeninas y de la muestra de semen en función de la gestación mostraron coeficientes de correlación significativos y positivos para el NF16 ($p=0,0534$), grosor endometrial ($p=0,0242$), tipo de esterilidad ($p=0,0001$) y motilidad en capacitado ($p=0,0496$). Estos coeficientes de regresión positivos indican un aumento en la probabilidad de obtener gestación conforme aumenta el número de folículos ≥ 16 mm, el grosor endometrial y la motilidad de los espermatozoides en la muestra capacitada (tabla 10).

DISCUSIÓN

La tasa de éxito de la IIU depende de varios factores, incluyendo la causa y la duración de la infertilidad, la edad de la mujer, la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) y el número de intentos de IIU realizadas anteriormente (Merviel et al., 2010; Cao et al., 2013). Otros factores importantes que tienen una fuerte influencia en el resultado de la IIU incluyen tanto la calidad del semen, como parámetros seminales relacionados con la muestra capacitada, como el re-

TABLA 7

Medias, desvío estándar y significación estadística para las variables clínicas de la mujer y de la respuesta ovárica a la HOC en función de la obtención o no de gestación

	No gestación Media \pm SD	Gestación Media \pm SD	p-valor
Edad (años)	33,6 \pm 0,9	34,0 \pm 0,9	0,6685
IMC (kg/cm ²)	23,4 \pm 0,3	24,1 \pm 0,9	0,5175
Grosor endometrial (mm)	9,4 \pm 0,18	10,6 \pm 0,5	0,2328

TABLA 9

Distribución de las distintas causas de esterilidad femenina con su correspondiente tasa de gestación y significación estadística

	TOTAL (%)	TG (%)	p-valor
FRN	55,8 (67/120)	6 (4/67)	0,0001
ANV	15 (18/120)	5,5 (1/18)	
FLI	8,3 (10/120)	20 (2/10)	
END	5,8 (7/120)	0 (0,7)	
FOP	7,5 (9/120)	0 (0/9)	
LTN	5,8 (7/120)	42,9 (3/7)	
MGN	2 (2/120)	100 (2/2)	

TABLA 10

Pruebas de razón de verosimilitud del análisis de regresión logística para las variables femeninas y de la muestra de semen utilizada para la IIU en función de la gestación

Factor	Chi-cuadrado	Df	p-valor
Motilidad Capacitado	3,85521	1	0,0496
NF \geq 16 mm	3,73032	1	0,0534
Grosor	5,08016	1	0,0242
Tipo esterilidad	27,065	6	0,0001

cuento total de espermatozoides móviles tras capacitar o NTSM (Ombelet et al., 1996; Ombelet et al., 1997; Ombelet, 2003, Wainer et al., 2004).

La morfología de los espermatozoides es otro factor que puede influir en los resultados de IIU. De hecho, Van Waart et al. (2001), obtuvieron unas TG significativamente superiores cuando el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales era superior al 4 % según los criterios estrictos de Kruger. Algunos autores observaron también que la probabilidad de embarazo tras IIU disminuye cuando menor es el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales tras la capacitación (Francavilla et al., 1990; Toner et al., 1995; Burr et al., 1996; Lindheim et al., 1996; Hauser et al., 2001). Sin embargo, Araujo et al. (2013), no observaron efectos de la morfología espermática sobre la TG en IIU ni antes ni después de realizar la capacitación. Varios estudios retrospectivos y prospectivos han llegado a las mismas conclusiones (Matorras et al., 1995; Karabinus y Gelety, 1997; Dickey et al., 1999).

Además, el sistema de evaluación de la morfología esper-

mática puede variar considerablemente en función de las condiciones de la tinción y de la observación a través del sistema CASA. La preparación de la muestra de semen podría modificar las características seminales e influir sobre el número de espermatozoides móviles, por lo que la morfología espermática debería evaluarse después de la capacitación (Graves et al., 2005)

Por todo ello, en el presente trabajo nos planteamos comparar la morfología espermática antes y después de la capacitación en función de las técnicas de selección espermática utilizadas (swim-up y gradientes de densidad), relacionar los parámetros de morfología con la concentración y con la motilidad de la muestra en fresco y en capacitado, y analizar la influencia de la morfología espermática sobre la tasa de gestación en inseminación intrauterina con el fin de recomendar la técnica de selección espermática más adecuada.

En relación con la morfología en fresco, se observó un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides normales en las muestras normoozoospermicas que en las oligoastenozoospermicas (8,8 vs 4,6; $p=0,0128$). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Guzick et al., 2001; Olmedo et al., 1995), que observaron un mayor porcentaje de espermatozoides anormales en varones oligoastenozoospermicos cuando los compararon con varones normoozoospermicos.

En cuanto a la técnica de capacitación utilizada, cuando comparamos ambas técnicas de selección espermática (swim-up frente a gradientes de densidad), se observa que los gradientes proporcionan una concentración en capacitado similar a la obtenida con el swim-up (20,2 vs 24,8; $p=0,1900$), con una motilidad significativamente inferior a la del swim-up (81,2 vs 84,8 $p=0,0023$) y con un número medio de espermatozoides normales significativamente superior al que se obtiene con el swim-up (15,0 vs 9,4 $p=0,0000$). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Azantee et al. (2013), que además no observaron diferencias en la TG en IIU en función de la técnica de capacitación utilizada (14 % gradiente vs 12 % swim-up).

Araujo et al. (2013), observaron que la morfología mejoró después de la capacitación con gradientes en casi tres cuartas partes del total de los varones. Estos resultados justifican que el valor pronóstico de la morfología en relación con la TG tras IIU sería la correspondiente a la muestra capacitada y no a la morfología de la muestra en fresco. A pesar de ello, estos autores no obtuvieron diferencias significativas para la TG en función de la morfología espermática antes o después de la capacitación. En el presente trabajo se evaluó la morfología espermática a partir de una alícuota de la muestra utilizada para la IIU y capacitada con la téc-

nica de swim-up (protocolo IIU Hospital La Fe), no observándose tampoco diferencias significativas para la TG en función de la morfología espermática ($p=0,2449$).

Además de la morfología espermática, el NTSM utilizados para la IIU también podría influir en la TG. [Ombelet et al. \(1997\)](#), sugirieron que un bajo NTSM podría estar relacionado con una mayor proporción de espermatozoides morfológicamente anormales, puesto que observaron que a medida que disminuía el NTSM, también lo hacía el porcentaje de espermatozoides normales. Sin embargo, hay que indicar que estos autores analizaron la morfología espermática de la muestra en fresco.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las muestras de semen homólogo presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides normales tras capacitar (19,6 vs 15,8; $p=0,2349$), con un número significativamente superior de NTSM (12,3 vs 4,8; $p=0,0009$). A pesar de ello, la TG fue superior para las muestras de donante (9,8 vs 11; $p=0,8647$). Todo ello parece indicar que la mayor TG obtenida para las muestras de donante, aunque las diferencias no fueron significativas, no se debería ni a la morfología espermática ni al NTSM.

Ya que la morfología espermática de la muestra capacitada no influye sobre los resultados de la IIU, y puesto que numerosos autores ([Ombelet et al., 1996](#); [Ombelet et al., 1997](#); [Ombelet, 2003](#), [Wainer et al., 2004](#)) indican que los parámetros seminales más relacionados con la obtención de gestación en IIU serían los relativos a la muestra capacitada, recomendamos realizar la capacitación de la muestra de semen con la técnica de swim-up que nos permite obtener una motilidad lineal progresiva significativamente superior (84,8 vs 81,2; $p=0,0023$).

Otro de los objetivos del presente trabajo consistió en analizar los efectos de las variables clínicas de la mujer en función de la obtención de gestación en IIU. En relación con la edad de la mujer, a pesar de la elevada TG obtenida en mujeres menores de 35 años, el bajo número de ciclos realizados no permitió obtener diferencias significativas ($p=0,3888$). El efecto de la edad sobre la TG en IIU se debería a la disminución de la calidad oocitaria asociada a edades avanzadas. Numerosos autores han demostrado una disminución significativa en la tasa de éxito en mujeres mayores de 40 años, con una TG de tan sólo un 1,4% ([Fredrick et al., 1994](#)), de un 1,5% ([Kambly et al., 2011](#)) y de un 4,1% ([Nuojuua-Huttunen et al., 1999](#)), lo que demostraría que la utilización de la IIU en mujeres mayores de 40 años con independencia del tipo de esterilidad sería una opción de tratamiento poco adecuada.

Sin embargo, también existen trabajos que indican que la TG en IIU es independiente de la edad de la mujer ([Ibérico](#)

[et al., 2004](#)). A pesar de ello, la disminución de la fertilidad de la mujer conforme aumenta su edad está bien documentada tanto en la reproducción natural como en la Reproducción Asistida ([Van Noord-Zaadstra et al., 1991](#)). Esta disminución estaría asociada al agotamiento folicular progresivo, deterioro de la función de las células de la granulosa, la mala calidad de los ovocitos asociada a un incremento en las tasas de anomalías cromosómicas y a la disminución de la receptividad endometrial.

En relación con el IMC, la TG obtenida fue la misma (10 %) con independencia del nivel de IMC considerado. Diversos autores observaron que el IMC afecta significativamente a la tasa de embarazo ([Wang et al., 2000](#)). Sin embargo, también se han publicado trabajos en los que no se observaron diferencias significativas en función del IMC ([Souter et al., 2011](#)). Por otra parte, [Macizo et al. \(2012\)](#) indican que el sobrepeso estaría asociado a la anovulación, por lo tanto, la HOC previa a la IIU podría beneficiar a las mujeres con este tipo de esterilidad.

En relación con el grosor endometrial, se observó un mayor grosor endometrial en el caso de las mujeres que consiguieron gestación tras IIU aunque las diferencias obtenidas no alcanzaron significación estadística (9,4 vs 10,6 $p=0,2328$). ([Jeon et al. 2013](#)), observaron una tendencia hacia una mayor tasa de embarazo con un grosor endometrial > 7 mm. Estas observaciones indicarían que en el caso de la IIU se requiere un grosor endometrial mínimo que asegure la implantación embrionaria.

Cuando se evaluaron el NF16 en función de la obtención de gestación, se observó que el 79 % de las mujeres presentaron 1 solo folículo > 16 mm el día de la hCG, el 19 % presentaron 2 folículos y sólo el 1,6 % de las mujeres presentaron 3 folículos. Aunque las TG fueron superiores conforme aumenta el NF >16, el bajo número de ciclos realizados no permitió obtener diferencias significativas ($p=0,2523$). Estos resultados coinciden con los obtenidos por [Plosker y Amato \(1994\)](#), que demostraron que el reclutamiento de al menos dos folículos aumentó las tasas de éxito en la IIU de un 6 % para un folículo, a un 15 % para dos o más folículos. [Stone et al. \(1999\)](#) estudiaron 9963 ciclos de IIU observando resultados similares, con tasas de embarazo de 7,6 % para un folículo, 10,1 % para dos folículos y 18,6 % para tres o más folículos. [Macizo et al. \(2012\)](#) sugirieron que para el éxito de la IIU se requieren al menos 2 folículos maduros. Todos estos resultados indicarían que el desarrollo multi-folicular daría lugar a un mayor número de ovocitos fertilizables y a una mejor calidad de endometrio y de la fase lútea, mejorando así la fertilización y las tasas de implantación en IIU.

En el análisis de regresión logística realizado para establecer

un modelo de gestación en IIU basado en el efecto de las variables femeninas y de la muestra de semen utilizada sobre las TG, se ha podido observar que las variables femeninas grosor endometrial, número de folículos ≥ 16 mm y la variable seminal motilidad en capacitado aumentan la probabilidad de conseguir gestación. Un estudio más amplio en el que se aumentara el tamaño de la muestra, podría ayudar a identificar otros factores relacionados con la gestación y desarrollar un modelo más completo de predicción de embarazo para los siguientes ciclos de IIU. En la práctica diaria, el tratamiento de IIU suele ir seguido de otros tratamientos si no se produce embarazo. Por lo tanto, un modelo válido y contrastado con un estudio prospectivo podría ayudar a crear directrices y guías de buena práctica que facilitarían a las parejas y a los especialistas tomar las decisiones más convenientes para el tratamiento de la esterilidad de estas parejas.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que un alto porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales se asocia a la esterilidad de causa masculina. La técnica de selección espermática que permite recuperar un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides morfológicamente normales son los gradientes de densidad. Sin embargo, se ha demostrado que la morfología espermática de la muestra de semen capacitada no influye en la TG en IIU. Además, los criterios estrictos de Kruger y el sistema CASA no permiten predecir el éxito de la IIU. Por último, se obtiene un modelo de predicción de gestación en IIU que dependería de las variables femeninas grosor endometrial y número de folículos ≥ 16 mm el día de la hCG, y de la variable motilidad de la muestra capacitada para la realización de la IIU.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal A, Allamaneni S.** Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005;84:850-3.
- Agrawal SK, Buyalos RP.** Clomiphene citrate with intrauterine insemination: Is it effective therapy in women above the age of 35 years? *Fertil Steril*. 1996;65:759-63.
- Ahmad L, Jalali S, Shami S, Akram Z.** Sperm preparation: DNA damage by comet assay in Normo and Teratozoosperms. *Arch Androl* 2007;53:325-38.
- Ahmed Badawy, AbouBakr Elnashar and Mohamed El-totongy.** Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*. Vol. 91, No. 3, March 2009.
- Aitken R, Baker M.** Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006;250:66-9.
- Alberto Kably-Ambe, Jorge A Campos-Cañas, Gustavo E González, Esperanza Carballo, Armando Roque.** Influencia del estudio seminal en el éxito de la inseminación intrauterina y en las complicaciones perinatales. *Ginecol Obstet Mex* 2013;81:365-369.
- Araújo LF, Fácio CL, Bossoni MC, Machado-Paula LA, Corrente JE, Cavagna M, Matheus PC, Pontes A.** Efficacy of sperm motility after processing and incubation to predict pregnancy after intrauterine insemination in normospermic individuals. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013 Oct 22;11:101. doi: 10.1186/1477-7827-11-101.
- Azantee, MClin Embry, Ahmad Murad, R Roszaman, Hayati, M A Norsina.** Associated Factors Affecting The Successful Pregnancy Rate of Intrauterine Insemination at International Islamic University Malaysia (IIUM) Fertility Centre. *Med J Malaysia* Vol 66 No 3 August 2011.
- Barros Delgadillo JC, Rojas Ruiz JC, Molina Munguía AC, Villalobos Acosta S, Sánchez Solís V, Barroso Villa G.** Prognostic factors of pregnancy in intrauterine insemination. *Ginecol Obstet Mex*. 2006;74:611-25.
- Belcheva A, Ivanova-Kicheva M, Tzvetkova P, Marinov M.** Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. *International J Androl* 2004;27:296-300.
- Bernard J.Cohlen, Egbert R.te Velde, Roelof J.van Kooij, Caspar W.N.Looman and J. Dik F.Habbema.** Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treating male subfertility: a controlled study. *Human Reproduction* vol.13 no.6 pp.1553-1558, 1998.
- Brasch JG, Rawlins R, Tarchala S, Radwanska E:** The relations between total motile sperm count and the success of intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1994, 62:150-154.
- Burr RW, Siegborg R, Flaherty SP, Wang XJ, Matthews CD:** The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. *Fertil Steril*. 1996;65:127-32.
- Campana A, Sakkas D, Stalberg A, Bianchi PG, Comte I, Pache T, et al.** Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Hum Reprod*. 1996; 11:732-6.
- D.Sakkas, G.C.Manicardi, M.Tomlinson, M.Mandrioli, D.Bizzaro, P.G.Bianchi and U. Bianchi.** The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up

method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Human Reproduction* vol.15 no.5 pp.1112-1116, 2000.

David S. Guzik, Sandra Ann Carson, Christos Coutifaris, James W. Overstreet, Pam Factor-Litvak, Ph.D., Michael P. Steinkampf, M.D., Joseph A. Hill, M.D., Luigi Mastroianni, Jr., M.D., John E. Buster, M.D., Steven T. Nakajima, M.D., Donna L. Vogel, M.D., Ph.D., and Robert E. Canfield. Efficacy of Superovulation and Intrauterine Insemination in the Treatment of Infertility. *N Engl J Med* 1999; 340:177-183.

Dickey RP, Pyrzak R, Lu PY, Taylor SN and Rye PH (1999). Comparison of the sperm quality necessary for successful intra uterine insemination with World Health Organisation threshold values for normal sperm. *Fertil Steril* 71,684-689.

Donnelly E, O'Connell M, McClure N, Lewis S. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1552-61.

Dorjpurev U, Kuwahara A, Yano Y, Taniguchi T, Yamamoto Y, Suto A, Tanaka Y,

Dres. Brugo Olmedo, Calamera, J. C., González, Deparci, A., Verdinelli, J., Casal, J. M. Ale, R. Urrutia, Grippo, Lic. Nodar, F. La morfología espermática y su importancia como diagnóstico de capacidad fertilizante. Desarrollo de un nuevo método de valoración por Video-Imágenes y su aplicación clínica. *Rev. Arg. de Urol.*, Vol. 60, N2 1, Pág. 35, 1995.

E.H. Duran, M. Morshedi, S. Taylor and S. Oehninger. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction* Vol. 17, No. 12 pp. 3122-3128, 2002.

ESHRE Capri Workshop Group, 2009. Intrauterine insemination. *Hum Reprod Update*. 2009 May-Jun;15(3):265-77.

Esra Tonguc, Turgut Var, Gogsen Onalan, Sibel Altinbas, Aytakin Tokmak, Nafiye Karakas and Cavidan Gulerman. Comparison of the effectiveness of single versus double intrauterine insemination with three different timing regimens. *Fertility and Sterility* Vol. 94, No. 4, September 2010.

Francavilla F, Romano R, Santucci R and Poccia G (1990). Effect of sperm morphology and motile sperm count on outcome of intrauterine insemination in oligozoospermia and/or asthenospermia. *Fertil Steril* 53,892-897.

Gaudoin M, Dobbie R, Finlayson A, Chalmers J, Cameron IT, Fleming R. Ovulation induction/intrauterine inse-

mination in infertile couples is associated with low-birth-weight infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188:611-6.

Gerardo Barroso, Miguel Chaya, Rubén Bolaños, Yadir Rosado, Fernando García León, Eduardo Ibarrola. Valor pronóstico en las tasas de recuperación para la aplicación de técnicas de preparación seminal y su evaluación en la función espermática. *Ginecol Obstet Mex* 2005; 73:221-8.

Gustavo Pérez. Aspectos clínicos de la inseminación homóloga. ¿Es actualmente una técnica eficaz?. ISSN 0123-3122 pers. *Bioét.* Vol.15. Núm.1. pp 25-39, 2011.

Hammadeh M, Kühnen A, Amer A, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *Int J Androl* 2001;24:360-8.

Hauser R, Yogev L, Botchan A, Lessing JB, Paz G and Yavetz H (2001). Intrauterine insemination in male factor subfertility: significance of sperm motility and morphology assessed by strict criteria. *Andrologia* 33,13-17.

Hughes EG. The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. *Hum Reprod* 1997; 12: 1865-72.

Ibérico G, Vioque J, Ariza N, et al. Analysis of factors influencing pregnancy rates in homologous intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2004; 81(5): 1308-13.

Instituto Nacional de Estadística. Movimiento natural de la población 2008. Madrid, Instituto Nacional de Estadística, 2010.

Irene Souter, Lina M. Baltagi, Damien Kuleta, John D. Meeker, John C. Petrozza. Women, weight, and fertility: The effect of body mass index on the outcome of superovulation/intrauterine insemination cycles. Volume 95, Issue 3, 1 March 2011, Pages 1042-1047.

J. Van Waart, T.F. Kruger, C.J. Lombard and W. Ombelet. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Human Reproduction Update*, Vol.7, No.5 pp. 495-500, 2001.

J.C Lu, Y.F Huang and N.Q Lü. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* 2013, xx, 1-10.

Jennifer E. Graves, H. Lee Higdon III, William R. Boone, and Dawn W. Blackhurst. Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 22, No. 5, May 2005.

- Karabinus DS and Gelety DS** (1997). The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertil Steril* 67,536–541.
- Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG.** Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001;80:74-81.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF and Oehninger S.** Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49,112–117.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, van Zyl J and Smith K.** Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46,1118–1123.
- Lalich RA, Marut EL, Prins GS, Scommegna A.** Life table analysis of intrauterine insemination pregnancy rates. *Am J Obstet Gynecol.* 1988; 158-980-4.
- Lindheim SR, Barad DH, Zinger M, Witt B, Amin H, Cohen B, Fish H and Barg P** (1996). Abnormal sperm morphology is highly predictive of pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet* 13,569–572.
- M.J. Tomlinson, J.B. Amisshah-Artur, K.A. Thompson, J.L. Kasraie and B.Bentick.** Prognostic indicators for intrauterine insemination (IUI): statistical model for IUI success. *Human Reproduction* vol.11 no.9 pp.1892-1896, 1996.
- Macizo Soria, Gálvez Pradillo, Jorquera García, Peinado Ramón, Álvarez Castillo, Canteras Jordana, Parrilla Paricio.** Pregnancy Predictors after Intrauterine Insemination: Analysis of 3012 Cycles in 1201 Couples. *J. Reprod Infertil.* 2012;13(3):158-166.
- Matorras R, Corcostegui B, Perez C, Mandiola M, Mendoza R and Rodriguez-Escudero FJ** (1995). Sperm morphology analysis (strict criteria) in male infertility is not a prognostic factor in intrauterine insemination with husband's sperm. *Fertil Steril* 63,608–611.
- Merviel P, Heraud MH, Grenier N, Lourdel E, Sanguienet P, Copin H.** Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril.* 2010 Jan;93(1):79-88.
- Michael De Brucker, Patrick Haentjens, Jan Evenepoel, Paul Devroey, John Collins and Herman Tournaye.** Cumulative delivery rates in different age groups after artificial insemination with donor sperm. *Human Reproduction*, Vol.24, No.8 pp. 1891–1899, 2009.
- Michaeli M, Peer S, Anderman S, Ballas S, Ellenbogen A.** Post swim up versus original semen quality, and strict criteria morphology, it's influence on fertilization rate in vitro fertilization program: a pilot study. *International Congress Series* 2004;1271:181-4.
- Miller DC, Hollenbeck BK, Smith GD, Randolph JF, Christman GM, Smith YR, Lebovic DI, Ohl DA:** Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology* 2002, 60:497–501.
- Montanaro-Gauci, M., Kruger, T.F., Coetzee, K. et al.** (2001) Stepwise determinant of pregnancy outcome following intrauterine insemination. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 6, 381-385.
- Nuojua-Huttunen S, Tomas C, Bloigu R, Tuomivaara L, Martikainen H.** Intrauterine insemination treatment subfertility: an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod.* 1999;14:698-703.
- O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales B, Chan P, Robaire B.** Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 2008;23:1044-52.
- Oehninger S, Acosta AA, Morshedi M, Vecl LL, Swanson RJ, Simmons K and Rosenwaks** (1988). Corrective measures and pregnancy outcome in vitro fertilization patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertil Steril* 50,283–287.
- Overstreet, J. W., Price, M. J., Blazak, W. F., Lewis, E. L. and Katz, D. F.** (1981). Simultaneous assessment of human sperm motility and morphology by videomicrography. *J. Urol.* 126:357-360.
- Pieterneel Steures, Jan Willem, Ben W. J. Mol, Marinus J. C. Eijkemans, Fulco van der Veen, Dik F. Habbema, Peter G. A. Hompes, Patrick M. M. Bossuyt, Harold R. Verhoeve, Yvonne M. van Kasteren, and Peter A. van Dop.** Prediction of an ongoing pregnancy after intrauterine insemination. *FERTILITY AND STERILITY VOL. 82, NO. 1, JULY 2004.*
- Plasencia W, García R, Torres A, Guillén V, Sánchez V, Domingo J, García JA.** Análisis de 2304 ciclos de Inseminación Artificial Intrauterina. *Revista iberoamericana de fertilidad.* Vol. 21- n° 4 - Julio-Agosto 2004.
- Plosker SM, Jacobson W, Amato P.** Predicting and optimizing success in an intra-uterine insemination programme. *Hum Reprod.* 1994; 9:2014-21.
- Prakash P, Leykin L, Chen Z, Toth T, Sayegh R, Schiff I, et al.** Preparation by differential gradient centrifugation

is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertil Steril* 1998;69:722-6.

Rawe V. Columnas de anexina V como metodología de selección molecular de espermatozoides no apoptóticos durante ICSI. *Reproducción Humana* 2009;6:12-7.

Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G. Semen preparations methods and sperm apoptosis: swim up versus gradient density centrifugation technique. *Fertil Steril* 2009;91:632-8.

Robert Wainer, Martine Albert, Agne`s Dorion, Marc Bailly, Marianne Berge`re, Raoul Lombroso, Myriam Gombault and Jacqueline Selva. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. *Human Reproduction* Vol.19, No.9 pp. 2060–2065, 2004.

S. Vitthala, T.A. Gelbaya, H. Hunter, S.A. Roberts, L.G. Nardo. Stimulated intrauterine insemination (SIUI) and donor insemination (DI) as first line management for a selected subfertile population: the Manchester experience. *J Assist Reprod Genet* (2008) 25:431-436.

Sahakyan M, Harlow BL, Hornstein MD. Influence of age, diagnosis, and cycle number on pregnancy rates with gonadotropin-induced controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 1999; 72:500-4.

Sakkas D, Manicardi G, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi P, et al. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod* 2000; 15:1112-6.

Sánchez I, Amorós D, Lucco F, González S, Ballesteros A, Pellicer A. Inseminación artificial. *Práctica de esterilidad y reproducción humana*. 3ª edición. Ed. McGraw-Hill. 2007: 123-138.

Sergiere M, Miesusset R, Daudin M, Thonneau P, Bujan L. Ten-year variation in semen parameters and sperm deoxyribonucleic acid integrity in a healthy fertile man. *Fertil Steril* 2006;86:11-8.

Sharon T. Mortimer. CASA—Practical Aspects. February, 2000.

Shulman A, Hauser R, Lipitz S, Frenkel Y, Dor J, Bider D. Sperm motility is a major determinant of pregnancy outcome following intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet*. 1998;15:381-5.

Smit M, Romijn J, Wildhagen M, Veldhoven J, Weber R, Dohle G. Increased sperm DNA fragmentation after surgical varicocelectomy is associated with increased pregnancy rate. *J Urol* 2010;183:270-4.

Sociedad Española de Fertilidad (SEF). Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI). Año 2011.

Stone, B.A., Vargyas, J.M., Ringler, G.E., Stein, A.L. and Marrs, R.P. Determinants of the outcome of intrauterine insemination: analysis of outcomes of 9963 consecutive cycles. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 180, 1522-1534, 1999.

The European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, Vol.28, No.9 pp. 2318–2331, 2013.

Toner JP, Mossad H, Grow DR, Morshedi M, Swanson RJ and Oehninger S (1995). Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia* 27,143–148.

Tucker KE, Jansen CA. Sperm separation techniques: comparison and evaluation of gradient products. 2nd International Workshop for Embryologists: troubleshooting activities in the ART lab. Ed. R. Basuray and D. Mortimer, 2002.

Uranchimeg Dorjpurev, Akira Kuwahara, Yuya Yano, Tomoko Taniguchi, Yuri Yamamoto, Ayako Suto, Yu Tanaka, Toshiya Matsuzaki, Toshiyuki Yasui and Minoru Irahara. Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intrauterine insemination. *The Journal of Medical Investigation* Vol. 58 2011

V.M Vargas-Hernández, J.M Tovar-Rodríguez, G. Acosta-Altamieto y M.A. Moreno-Eutimio. Papel de la inseminación intrauterina en la era de la fertilización in vitro. Elsevier Doyma. *Clin Invest Gin Obst*. 2013.

Van Voorhis B, Barnett M, Sparks A, et al. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2001;75:661-668.

W. Ombelet, H. Vandeput, G. Vau de Putte, A. Cox, M. Janssen, P. Jacobs, E. Bosmans, O. Steeno and T. Kruger. Intrauterine insemination after ovarian stimulation with clomiphene citrate: predictive potential of inseminating motile count and sperm morphology. *Human Reproduction* vol. 12, no.7 pp. 1458-1463, 1997.

Wang YC, Chang YC, Chen IC, Cnien HH, Wu GJ. Comparison of timing of IUI in ovarian stimulated cycles. *Arch Andrology* 2006; 52: 371-4.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition, 2010.

Willem Ombelet, Karen Deblaere, Eugene Bosmans, An-

nemie Cox, Petra Jacobs, Mia Janssen, Martine Nijs. Semen quality and intrauterine insemination. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol.7, No.4, 485-492. July 2003.

William M. Buckett. A review and meta-analysis of prospective trials comparing different catheters used for embryo transfer. *Fertility and Sterility* Volume 85, Issue 3, Pages 728-734, March 2006.

Yang JH, Wu MY, Chao KH, Chen SU, Ho NH, Yang YS: Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination in subfertility. How many treatment cycles are sufficient? *J Reprod Med* 1998; 43 (10): 903-8.

Younglai E, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper R. Sperm swim up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001;16:1950-3.

Yulian Zhao, Nikos Vlahos, David Wyncott, Carolina Petrella, Jairo Garcia, Howard Zacur and Edward E. Wallace. Impact of Semen Characteristics on the Success of Intrauterine Insemination. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 21, No. 5, May 2004.

Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009;30:219-29.