

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA

Y

TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**EFFECTO DE LA SELECCIÓN**  
**ESPERMÁTICA EN LAS**  
**INSEMINACIONES ARTIFICIALES**



TRABAJO FIN DE MÁSTER

**María Barandalla Sobrados**

21 de Junio de 2013



## ***AGRADECIMIENTOS***

Al finalizar un trabajo como éste es inevitable que te invada la necesidad de agradecer la participación de personas e instituciones que han facilitado que este estudio pudiera realizarse.

Es por esto que, quiero expresar mis agradecimientos en primer lugar a todo el equipo de la Unidad de Reproducción Asistida del HUCA, por estar siempre prestos a colaborar y a ayudarme en la ardua tarea de obtención de los datos necesarios. Mención especial para el Dr. Abel Gayo Lana, un gran profesional, director de este trabajo y siempre dispuesto a poner todo de su parte para poder llevarlo a cabo. Gracias por su apoyo y confianza en mis ideas, y sobre todo por su paciencia y dedicación.

Por último, a todas aquellas personas que han hecho que este año fuera de casa haya sido muy especial y una gran experiencia que me ha permitido dar lo mejor de mí misma.

## ÍNDICE

I. LISTADO DE SIGLAS.....	Pág. 2
II. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 3
Inseminación artificial.....	Pág. 3
- Comparación IUI-FIV: Coste - Efectividad.....	Pág. 9
Infertilidad Masculina.....	Pág. 10
- Capacitación espermática.....	Pág. 14
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	Pág. 22
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pág. 23
✦ Estimulación ovárica.....	Pág. 23
✦ Inducción de la ovulación.....	Pág. 24
✦ Procesamiento del semen.....	Pág. 25
- <i>Swim-up</i> .....	Pág. 25
- Gradiente de densidad.....	Pág. 26
- Semen de donante.....	Pág. 27
✦ Método de inseminación.....	Pág. 28
✦ Diagnóstico de embarazo y aborto.....	Pág. 28
✦ Análisis estadístico de los resultados.....	Pág. 28
V. RESULTADOS.....	Pág. 29
VI. DISCUSIÓN.....	Pág. 34
VII. CONCLUSIONES.....	Pág. 41
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 42

## I. LISTADO DE SIGLAS

- CC → Citrato de Clomifeno.
- DGC → Gradiente de Densidad Discontinuo (*Density Gradient Centrifugation*).
- FIV → Fecundación *In Vitro*.
- GnRH → Hormona Liberadora de Gonadotropina (*Gonadotropin Releasing Hormone*).
- HCG → Gonadotropina Humana Coriónica (*Human Chorionic Gonadotropin*).
- IA → Inseminación Artificial.
- IAD → Inseminación Artificial con Semen de Donante.
- IAC → Inseminación Artificial Conyugal.
- IUI → Inseminación Intrauterina
- ICSI → Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (*Intracytoplasmic Sperm Injection*)
- LH → Hormona Luteinizante.
- OMS → Organización Mundial de la Salud (WHO – *World Health Organization*).
- REM → Recuento de Espermatozoides Móviles.
- ROS → Especies Reactivas del Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).
- TRA → Técnicas de Reproducción Asistida.

## II. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el término infertilidad como la incapacidad de conseguir un embarazo o que éste no llegue a término, en aquellas parejas que lleven más de un año manteniendo relaciones coitales sin medidas de anticoncepción.

Se estima que hoy en día la infertilidad afecta alrededor del 10-15% de la población en edad reproductiva y la tendencia de esta cifra va en aumento. En España en particular, se traduce en unas 900.000 parejas afectadas y aparecen unos 16.000 casos nuevos al año.

Por la gran repercusión de la infertilidad a nivel mundial, en el año 2009 la OMS junto con el Comité Internacional para la Supervisión de las Técnicas de Reproducción Asistida (ICMART) reconocieron oficialmente la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductor (Zegers-Hochschild y cols., 2009).

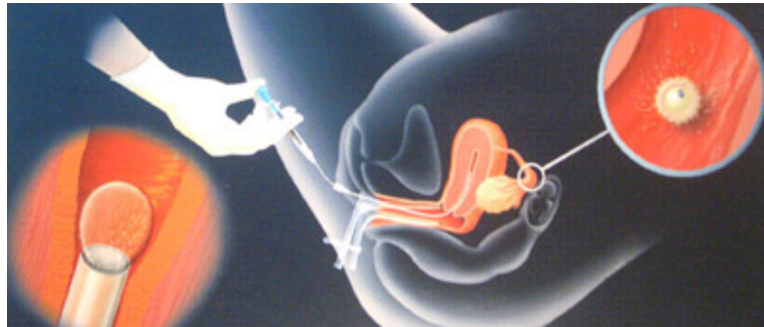
La reproducción asistida y el conjunto de técnicas asociadas a ella (TRA), ayudan a la reproducción humana en los casos de parejas con problemas de infertilidad.

## INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La inseminación artificial (IA) forma parte de la primera línea de tratamiento para la pareja infértil, bien sea por subfertilidad masculina, problemas de fertilidad en la mujer o por patologías asociadas desconocidas (Dorjpurev U. y cols., 2011). Engloba un variado rango de técnicas de inseminación, como la intravaginal, intracervical, intratubárica, intraperitoneal o intrauterina (IUI), siendo esta última la de mayor aceptación y uso. Pero su efectividad ha sido cuestionada por sus bajas tasas de éxito y los potenciales riesgos que conlleva, como el embarazo múltiple y el síndrome de hiperestimulación ovárica. A pesar de ello, sigue siendo una técnica ampliamente utilizada por su simplicidad y su bajo coste, lo cual le da algunas ventajas sobre la fecundación *in vitro* (FIV) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

La IUI se basa en la introducción médica del semen o esperma en el tracto genital femenino, concretamente en el útero, con la finalidad de conseguir una gestación y por consiguiente un niño sano (Figura 1).

La razón para el uso de la IUI, en lugar de la inseminación intravaginal o la inseminación intracervical, es reducir el efecto de factores tales como la acidez vaginal y la hostilidad del moco cervical, además de poder colocar un variable número de espermatozoides móviles y morfológicamente normales lo más cerca posible de los ovocitos en el momento de la ovulación, (Pacheco Romero, J., 2012).



**Figura 1.** Esquema de una Inseminación Intrauterina.

La historia de la inseminación artificial data de varios siglos atrás, se inició en el ganado con la finalidad de mejorar las razas para la producción de leche y carne. En la especie humana la historia es más reciente. Hace unos 200 años, aproximadamente en 1785, momento en el que se le atribuye a John Hunter, en Londres, el primer tratamiento exitoso de IA, resultando en un embarazo. Ya en el siglo diecinueve, a mediados de 1800, J. Mariom Sims inseminó artificialmente a seis mujeres que tenían prueba post-coital negativa, usando el semen de los cónyuges obtenido de la vagina, tras una relación sexual; el procedimiento terminó en un embarazo.

La introducción de la inseminación artificial con semen de donante (IAD) supuso un gran impulso para la popularidad de la IA, ya que durante muchos años la inseminación artificial conyugal (IAC) fue una técnica restringida a casos de disfunción fisiológica o psicológica, como eyaculación retrógrada, vaginismo, hipospadia e impotencia. El primer caso de IAD fue publicado por William Pankhurst, de Filadelfia, EEUU, en 1884.

En 1889, Ilya Ivanovich Ivanova, en Rusia, desarrolló los métodos de inseminación artificial tal como los conocemos hasta hoy. Posteriormente, investigadores como Phillip y Lardy en 1939, ensayaron diferentes métodos para

mejorar las tasas de éxito de la IA , como la utilización de yema de huevo para proteger a los espermatozoides de las bajas temperaturas; Foote y Brotton, de la universidad de Cornell, en 1950 introdujeron la utilización de antibióticos junto con la inoculación de espermatozoides; este preparado que contenía penicilina, estreptomina y polimixina B, fue utilizado durante muchos años como preparación estándar para la protección contra una probable contaminación. En 1953 tuvo lugar el primer embarazo exitoso con la inseminación de esperma congelado y posteriormente descongelado; se produjo así el desarrollo de la criopreservación de semen gracias a Bunge y Sherman, marcando un nuevo hito en la reproducción asistida y dando lugar en la década de los 70 al surgimiento de los bancos de semen. No fue, sin embargo, hasta 1962 cuando se publicó el primer artículo en el que Cohen describió el procedimiento de la IUI en humanos, tal y como la conocemos hoy en día.

La principal razón que reimpulsó un nuevo interés en las inseminaciones artificiales fue, indudablemente, la introducción de la FIV, en 1978, por Steptoe y Edwards, ya que promovió que la técnica de preparación de espermatozoides móviles lavados se refinara. Estos procedimientos de lavado son necesarios para eliminar prostaglandinas, proteínas antigénicas y agentes infecciosos presentes en el eyaculado, mejorando la calidad de la muestra, ya que también permiten descartar gran parte de los espermatozoides no móviles, leucocitos y células germinales inmaduras, obteniendo así mejores resultados. La mejora en las técnicas de selección espermática hizo que se generara una mayor expectativa para los casos de infertilidad por factor masculino, desde leve a severo (Pacheco Romero, J., 2012).

Si bien es cierto que las nuevas técnicas de preparación espermática han hecho posible que el abanico de indicaciones de la IUI se amplíe, también es cierto que hay una permanente discusión acerca de ciertos aspectos relacionados con el procedimiento, como si se debe o no complementar la IUI con la inducción de la ovulación; si es mejor la medicación oral con citrato de clomifeno (CC) y con tamoxifeno, o el uso de gonadotropinas o un tratamiento combinado; si se deben hacer una o dos inseminaciones en cada ciclo; el número total de inseminaciones antes de descartar el procedimiento y pasar a FIV; y finalmente, dados los bajos porcentajes de éxito de la IUI comparado con la FIV, han aparecido estudios que tratan de establecer el coste-beneficio de la IUI frente a la FIV; llegando, hoy en día a descartar en muchos casos la

IUI y pasando a realizar la FIV o ICSI como primera opción de tratamiento (Cohlen, B.J., 2005).

La inseminación intrauterina, con o sin estimulación ovárica, está indicada en un amplio abanico de condiciones diagnósticas, las cuales han ido en incremento en paralelo al desarrollo tecnológico y las necesidades de las personas. Las alteraciones en el proceso de eyaculación han permanecido como la indicación clásica, cuando la pareja masculina es incapaz de depositar el semen en el interior de la vagina (hipospadia, eyaculación retrógrada, impotencia de origen neurológico); a esto se le añaden los casos de disfunciones sexuales (eyaculación precoz, vaginismo o impotencia psicógena), en los cuales se debe intentar inicialmente la terapia psicológica. Con el uso rutinario de las pruebas poscoitales, se agregaron otras indicaciones, tales como el moco cervical hostil y las causas inmunológicas relacionadas con la presencia de anticuerpos antiespermáticos en el moco cervical, siendo una indicación lógica para la IUI, ya que ésta evita el contacto con el moco cervical (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006). Las indicaciones más frecuentes para IUI son los casos de infertilidad por factor masculino de leve a moderado y la infertilidad por causa indeterminada o idiopática; en este caso, el diagnóstico es por exclusión, ya que pese a no encontrarse alteraciones en la evaluación diagnóstica, sí deben existir factores desconocidos relacionados con la infertilidad. Es en esta situación donde la IUI cobra mayor importancia frente a la simple inducción del coito programado, demostrando una mayor eficacia (Bensdorp, AJ. y cols., 2007).

En cuanto a la IAD, las principales indicaciones son la infertilidad por factor masculino severo (oligoastenoteratospermia severa o azoospermia) y la presencia de enfermedades familiares o genéticas, tales como enfermedad de Huntington, hemofilia o incompatibilidad Rh. Aunque en la actualidad la ICSI ha hecho posible que muchos hombres hayan logrado la paternidad, aún cuando el número de sus espermatozoides óptimos es muy reducido, obteniéndolos incluso por aspiración del epidídimo (MESA) o biopsia testicular (TESE) en los casos de azoospermia obstructiva, con lo cual la necesidad de recurrir a la IAD ha disminuido. Pero no todas las personas tienen el potencial económico suficiente como para poder someterse a estos procedimientos sin las subvenciones públicas a las que se accede, tras largas listas de espera; por lo tanto, la IAD es todavía usada en este grupo de pacientes.



Otra situación que viene ocurriendo cada vez con más frecuencia, en los países en que la ley lo permite, es el aumento de mujeres sin pareja o con una pareja femenina que solicitan el uso de estas técnicas, lo que convierte a la IAD en una nueva indicación para estas personas. Teniendo en cuenta todos estos nuevos adelantos, no es de sorprender que, desde la década de los setenta, la industria de los bancos de semen haya logrado gran popularidad.

Por último advertir que la inseminación intrauterina está contraindicada en mujeres con atresia cervical, cervicitis, endometritis u obstrucción tubárica bilateral y evidentemente, en casos de factor masculino severo (The ESHRE Capri Workshop Group, 2009).

Se han propuesto diferentes estrategias para optimizar los resultados de la IUI; entre las que destacan:

- Diferentes protocolos de estimulación ovárica, (Cantineau, AE. y Cohlen, BJ., 2007).
- Prevención del pico de la hormona luteinizante (LH) prematuro, (Allegra, A. y cols., 2007).

La razón del uso de la inducción de ovulación en IUI, aún en pacientes que ovulan normalmente, es incrementar la eficiencia y probabilidad de la ovulación, para así mejorar la posibilidad de embarazo. El hecho de que los espermatozoides y los ovocitos sobrevivan por un periodo limitado de tiempo, hace que la IUI se deba realizar lo más cerca a la ovulación como sea posible. Así mismo, la estimulación aumenta la producción esteroidea, lo cual puede mejorar la posibilidad de fertilización e implantación del embrión. Sin embargo, hay que tener en cuenta que aunque la IUI es menos invasiva y menos costosa que la FIV, cuando está combinada con una estimulación ovárica aumenta el riesgo de embarazo múltiple y de síndrome de hiperestimulación, en comparación con IUI en ciclos naturales (Fauser, B.C. y cols., 2005). Se han desarrollado muchos esquemas de ovulación inducida para su uso en IUI, incluyendo el CC, el tamoxifeno o el letrozol (solos o en combinación con gonadotropinas); gonadotropinas solas y gonadotropina humana coriónica (HCG) utilizada al final de la estimulación (Akanji Tijani, H. y Bhattacharya, S., 2010).

El momento idóneo de la IUI normalmente se determina mediante la detección del aumento de LH. Mediante la administración de HCG se consigue reproducir de forma artificial este pico. El tamaño de los folículos en los que se puede producir un aumento de LH varía entre 16 y 20 mm de diámetro, al igual que el intervalo de tiempo entre el inicio del aumento de LH y la ovulación, entre 24 y 56 horas. Por otro lado, en presencia de un folículo maduro, la administración de HCG dará lugar a la ruptura folicular en las siguientes 36-48 horas (Kyrou, D. y cols., 2012). Sin embargo, hay que tener en cuenta que debido a la presencia de los receptores de HCG en el endometrio humano, la administración de la HCG podría interferir con la receptividad del mismo (Licht, P. y cols., 2007).

En relación con la prevención de este pico de LH prematuro, se ha visto que picos precoces de esta hormona ocurren en un porcentaje significativo de ciclos estimulados (22-43%), lo que interfiere con la elección del momento óptimo para la inseminación, incluso dando lugar a la cancelación del ciclo. (Lee, TH. y cols., 2008). Esta interferencia conduce a tasas de embarazo más bajas, en comparación con ciclos en los que no se produce un aumento de LH prematuro (Cantineau, AE. y Cohlen, BJ., 2007).

Puesto que es imposible predecir un pico de LH prematuro, y tan sólo se disponen de parámetros clínicos como la apariencia ecográfica de los folículos y los niveles séricos de estradiol, se han propuesto otros mecanismos para mejorar en este sentido la efectividad del ciclo estimulado para IUI (Cunha-Filho, JS. y cols., 2003). Entre ellos, la producción de LH puede prevenirse eficazmente mediante la administración de antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), (Olivennes F. y cols., 2003; Alisch, A. y cols., 2004; Cantineau, AE. y cols., 2011).

### **- Comparación IUI-FIV: coste-efectividad**

Es probable que en los países donde ambos procedimientos pueden ser costeados por la sanidad pública no tenga mucha relevancia resolver esta cuestión; pero en la mayoría de países donde los recursos son limitados o recientemente la crisis ha afectado a los servicios públicos, por lo que las parejas deciden o se ven obligadas a pagar por sus tratamientos, el tema de la importancia del coste-efectividad empieza a tener mayor trascendencia.

En 1997 y 2001, se realizaron dos estudios retrospectivos de cohorte comparando el coste-efectividad de la IUI con FIV o FIV-ICSI. En parejas con infertilidad sin causa definida o infertilidad masculina leve, concluyeron que la IUI con estimulación ovárica es más efectiva, económicamente hablando, que la FIV y por lo tanto, recomendaban que la IUI debiera ser realizada antes de iniciar un ciclo de FIV (Van Voorhis, BJ. y cols., 2001).

En nuestro país, mientras que las tasas de éxito con ciclos de FIV parecen haberse incrementado en las dos últimas décadas, las tasas de embarazo después de IUI, con ciclos estimulados, han permanecido más o menos estables. Datos del año 2010 presentaron una tasa de gestación por ciclo iniciado de FIV del 28,2%; una tasa de gestación por ciclo iniciado mediante ICSI o mixta del 29,3%; y una tasa de gestación por ciclo mediante IA del 14,8%; siendo la tasa de embarazo múltiple del 25,0% después de FIV/ICSI y del 12,7% después de IA. Teniendo en cuenta estos resultados y el hecho de que un ciclo de FIV/ICSI es aproximadamente tres veces más caro que un ciclo estimulado de IA, en Europa, parece que la IA con ciclo estimulado sí tiene aún un lugar dentro de los tratamientos por infertilidad (Registro de la Sociedad Española de Fertilidad - SEF, 2010).

En conclusión, la inseminación intrauterina es un procedimiento no invasivo, relativamente sencillo, que permite el tratamiento de ciertas formas de infertilidad con relativo éxito. Su ejecución no requiere de centros muy especializados, a diferencia de la FIV-ICSI, lo cual lo convierte en un procedimiento de bajo coste (Lucchini, C. y cols., 2012).

## INFERTILIDAD MASCULINA

La razón para realizar IUI en casos de infertilidad masculina es mejorar la posibilidad de concepción y embarazo, incrementando la densidad de espermatozoides sanos en el lugar donde se produce la fertilización (Morrell, J.M. y Rodríguez-Martínez, H., 2011).

Existen diferentes variables independientes que pueden influir y ser buenas indicadores de la probabilidad de embarazo tras un tratamiento de fertilidad por IA como por ejemplo, la edad de la mujer; la calidad del semen: el número total de espermatozoides inseminados y el recuento de espermatozoides móviles (REM); el tipo de estimulación que se le aplica a la paciente; el diagnóstico previo de infertilidad (etiología y duración) etc.

Centrándonos en la calidad del semen, el análisis seminal se usa rutinariamente para evaluar el factor masculino en las parejas infértiles, pero los análisis estándar que se realizan hoy en día se han descrito como un pobre indicador del potencial de fertilidad masculina. Esto se debe a que la gran variabilidad entre laboratorios en torno a la estimación de los porcentajes de progresividad, motilidad y morfología influye en la objetividad de los resultados (Youn, JS. y cols., 2011). El manual de la OMS para el análisis del semen humano es ampliamente utilizado como el estándar de referencia para los laboratorios de andrología. Sin embargo, la interpretación y aplicación de lo que este manual de la OMS del año 2010 califica como "normal" o "de referencia" para los valores de los parámetros seminales posee limitaciones, ya que los datos se obtuvieron a partir de poblaciones que fueron definidas libremente y fueron generados por diferentes laboratorios con técnicas variables y diversos sistemas de garantía de calidad (Cooper, T. y cols., 2010).

Como ejemplo, la probabilidad de embarazo presenta una correlación lineal con una concentración de espermatozoides de hasta 40-50 millones por ml. (Slama, R. y cols., 2002). Sin embargo, la concentración umbral recomendada por la OMS en 2010 se encuentra en 20 millones de espermatozoides por ml, dato que ha sido considerado por diversos autores e investigadores como demasiado bajo.

Por otra parte, las concentraciones de espermatozoides por encima de los valores de referencia se han observado repetidamente en pacientes infértiles, lo que prueba que una concentración elevada de espermatozoides también influye negativamente en el proceso de fecundación (Morshedi, M. y cols., 2003).

En un estudio realizado en 2001 se evaluaron multitud de muestras de semen, de 765 parejas infértiles y 696 parejas fértiles, cuyo semen fue utilizado para establecer los valores umbral de cada parámetro (Guzick, D. S. y cols., 2001). De esta forma se clasificó a los hombres en tres grupos: subfértiles, fértiles e indeterminado (con datos localizados entre ambos grupos). Se produjo una amplia coincidencia entre los resultados de los varones fértiles e infértiles y ninguno de los tres parámetros principales se declaró como un buen indicador de la fertilidad masculina. Y el único dato concluyente fue que el porcentaje de espermatozoides con características morfológicas normales tenían el mayor poder discriminatorio (Akanji Tijani, H. y Bhattacharya, S., 2010).

Respecto al análisis seminal, existen unos criterios de valoración de la motilidad de los espermatozoides, que van desde el grado A al D, siendo:

- A: motilidad progresiva rápida
- B: motilidad progresiva lenta
- C: motilidad no progresiva
- D: inmóviles

Cuando en función de estos parámetros, dependientes de la concentración de espermatozoides con motilidad progresiva (A+B), encontramos presentes más de 5 millones de espermatozoides A+B/ml se determina que está aconsejado realizar IUI.

Adicionalmente, en el “Manual de laboratorio para el examen y el procesamiento del semen” publicado por la OMS en el año 2010, se pueden encontrar los límites inferiores de referencia para evaluar la calidad seminal en los laboratorios de andrología.

A continuación se exponen en la **Tabla 1** los parámetros básicos a analizar:

PARÁMETRO	LÍMITE DE REFERENCIA INFERIOR
Volumen seminal (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Número de espermatozoides total ( $10^6$ por eyaculado)	39 (33-46)
Concentración espermática ( $10^6$ por ml)	15 (12-16)
Motilidad total (A+B+C, %)	40 (38-42)
Motilidad progresiva (A+B, %)	32 (31-34)
Vitalidad (espermatozoides vivos, %)	58 (55-63)
Morfología espermática (formas normales, %)	4 (3.0-4.0)

En la siguiente **Tabla 2** se observan otra serie de valores consensuados acerca de la calidad seminal:

PARÁMETRO	LÍMITE DE REFERENCIA INFERIOR
pH	$\geq 7,2$
Peroxidasa-Leucocitos ( $10^6$ por ml)	$< 1,0$
MAR test (espermatozoides motiles con partículas unidas, %)	$< 50$
Test inmunológico (espermatozoides móviles con partículas unidas, %)	$< 50$
Zinc seminal ( $\mu\text{mol}$ /eyaculado)	$\geq 2,4$
Fructosa seminal ( $\mu\text{mol}$ /eyaculado)	$\geq 13$
Glucosidasa neural seminal (mU/eyaculado)	$\geq 20$

Y del mismo modo, en este mismo manual, encontramos la nomenclatura básica relativa a la calidad seminal, **Tabla 3**:

<b>Aspermia</b>	Ausencia de semen (o eyaculación retrógrada).
<b>Astenozoospermia</b>	Porcentaje de motilidad progresiva por debajo del límite inferior de referencia.
<b>Astenoteratozoospermia</b>	Porcentajes de motilidad progresiva y morfología normal espermática por debajo de los límites inferiores de referencia.
<b>Azoospermia</b>	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
<b>Criptozoospermia</b>	Espermatozoides no observados en el eyaculado en fresco, pero sí en el <i>pellet</i> tras el centrifugado.
<b>Leucospermia</b>	Presencia de leucocitos en el eyaculado por encima del límite de referencia.
<b>Necrozoospermia</b>	Bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado.
<b>Normozoospermia</b>	Número total de espermatozoides y porcentajes de motilidad progresiva y morfología normal igual o por encima del límite inferior de referencia.
<b>Oligoastenozoospermia</b>	Número total de espermatozoides y porcentaje de motilidad progresiva por debajo de los límites inferiores de referencia.
<b>Oligoastenoteratozoospermia</b>	Número total de espermatozoides y porcentajes de motilidad progresiva y morfología normal por debajo de los límites inferiores de referencia.
<b>Oligoteratozoospermia</b>	Número total de espermatozoides y porcentaje de morfología normal por debajo de los límites de referencia.
<b>Oligozoospermia</b>	Número total de espermatozoides por debajo del límite de referencia.
<b>Teratozoospermia</b>	Porcentaje de morfología normal espermática por debajo del límite inferior de referencia.

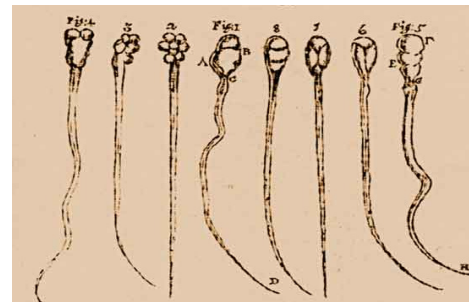
La cromatina espermática es una estructura altamente organizada y compacta formada por ADN y nucleoproteínas heterogéneas, y localizada en la cabeza del espermatozoide. Es por esto que, en los últimos años, ha aumentado el interés sobre la integridad del ADN de los espermatozoides en la infertilidad masculina (Aitken, RJ. y De Iuliis, GN., 2007); ya que, la integridad del ADN de espermatozoides es esencial para la transmisión correcta de material genético a la descendencia (Donnelly, ET. y cols., 2000). Por lo tanto, el método de preparación de esperma para las TRA debe reducir al mínimo el riesgo potencial causado por los espermatozoides anormales. Hoy en día, las técnicas establecidas para la preparación de los espermatozoides a utilizar de forma rutinaria en IUI presentan variaciones en su capacidad de separar espermatozoides portadores de anomalías en su ADN (Sakkas, D. y cols., 2000; Perrin, A. y cols., 2011).

### - *Capacitación espermática*

En 1677, el holandés Antoni van Leeuwenhoek fue el primero en observar espermatozoides humanos a través de un primitivo microscopio y escribió “un ser humano procede de uno de los numerosos *animáculos* presentes en el esperma”. En 1950 y 1951 Austin y Chang respectivamente, describieron de forma independiente los cambios que deben sufrir los espermatozoides de mamíferos, y que constituían un requisito previo ineludible para poder fecundar a los ovocitos *in vivo*. Este proceso de adquisición de la “capacidad fecundante” fue bautizado como “capacitación” por Austin, y se observó que sólo se producía después de que los espermatozoides hubieran pasado un periodo de tiempo en el tracto reproductivo femenino. Posteriormente, los primeros en reportar que el espermatozoide maduro puede ser capacitado *in vitro* fueron Yanagimachi y Chang en 1963.



**Figura 2.** Antoni van Leeuwenhoek.



**Figura 3.** Dibujos de los “animáculos del esperma” realizados por Leeuwenhoek.

Actualmente, el proceso de capacitación de los espermatozoides de animales eutéricos está definido como el proceso por el cual adquieren la capacidad de someterse a la reacción acrosómica para poder fertilizar ovocitos, tanto *in vivo*, como *in vitro*. Este mecanismo es bloqueado por los factores decapacitantes presentes en el plasma seminal (Mortimer, D. y Mortimer, ST., 2013).

Los cambios estructurales y funcionales que se tienen que dar en el espermatozoide fecundante son:

1. La eliminación de factores de estabilización adquiridos a lo largo del epidídimo por el espermatozoide, mientras reside en el plasma seminal.
2. Capacitación del espermatozoide a través de su tránsito por el tracto reproductivo femenino.
3. Adquisición por parte del espermatozoide de la capacidad de unirse a la zona pelúcida del ovocito y experimentar la posterior reacción acrosómica.



La eyaculación humana normal contiene entre decenas y cientos de millones de espermatozoides móviles. Es evidente que esta masiva salida supera con creces el número de espermatozoides necesarios para una fecundación exitosa. Sin embargo, a pesar de este número desorbitado de células móviles, no todas y, de hecho muy pocas llegan al punto final del viaje (De Jonge, C., 2005).

Aunque, principalmente por motivos éticos, el estudio de este proceso ha estado muy limitado a mamíferos no humanos, se sabe que *in vivo*, los espermatozoides “escapan” del plasma seminal nadando por el moco cervical pocos minutos después de la eyaculación en la vagina; pero *in vitro*, los espermatozoides deben ser lavados para quedar libres del plasma seminal y así comenzar el proceso de capacitación.

El plasma seminal tiene un efecto directo en la capacidad funcional de los espermatozoides. Se han descrito y caracterizado multitud de factores que lo forman, determinan y cómo influyen en la capacitación espermática y posterior reacción acrosómica. El principal factor regulador de la capacitación es el colesterol. Esta molécula es muy abundante en el plasma seminal y es el principal inhibidor de la capacitación (Cross, NL., 1998). Los prostasomas, son vesículas membranosas con un diámetro de entre 150 a 200 nm que se encargan del almacén de calcio y están enriquecidas en colesterol. Son secretadas por la glándula prostática y contribuyen en gran medida en el volumen del plasma seminal (Arienti, G. y cols., 2004). Aunque hoy en día no ha sido aún demostrado un papel regulador crucial en el proceso de capacitación, si se ha demostrado que la combinación del aporte de calcio, aumentando sus niveles en el citosol, y los mecanismos que realizan para transportar e introducir rápidamente este calcio en el interior de los espermatozoides son necesarios para llevar a cabo correctamente la reacción acrosómica (Palmerini, CA. y cols. 2003).

De especial importancia biológica, es que las condiciones para este proceso sean ligeramente ácidas (pH 5-6), ya que es necesario que para promover la fusión de los prostasomas con el esperma, el pH sea similar al vaginal en el periodo periovulatorio (pH 4,5-6), (Arienti, G. y cols., 1997).

Además, existe la posibilidad de que un cierto nivel de carga de colesterol en las membranas de dichas vesículas pudiera ser beneficioso para estabilizar la membrana plasmática y para proteger contra iones permeables que hicieran que la membrana adquiriese una capacitación prematura (De Jonge, C., 2005).

En el semen la población heterogénea espermática tan solo representa un 1% del volumen seminal total, el resto corresponde a secreciones de las glándulas accesorias, como los mencionados prostasomas. Los espermatozoides al ser depositados en la vagina migran por el fluido seminal acompañados de esteroides, como el colesterol, estabilizadores de membrana y el moco cervical ácido. Las membranas plasmáticas del espermatozoide se lavan del fluido seminal en el que están incluidos gracias a los elementos ultraestructurales presentes en el moco, lo que facilita la eliminación en la membrana plasmática de las moléculas adsorbidas y esteroides. Los leucocitos, coincidiendo con la entrada de los espermatozoides, se infiltran en el moco cervical, y son los encargados de producir moléculas reactivas de oxígeno (ROS) que poseen una misión anti-capacitante, ya que podrían estar relacionados con una capacitación prematura, lo que provoca que sean eliminados de la población óptima para fertilizar. Con la eliminación de los espermatozoides de mala calidad, no funcionales, la población que llega al ambiente uterino es mucho más homogénea que la que entró inicialmente en la vagina.

Pese a que el tiempo que pasan los espermatozoides alojados en el útero es breve, debido a las contracciones uterinas que impulsan el esperma hasta el fondo de la cavidad uterina, da tiempo a que se produzcan gran cantidad de cambios. De esta manera, la membrana plasmática del espermatozoide entra en un proceso dinámico en el que cambia la conformación de sus microdominios lipídicos y gracias a la sulfatasa esteroles uterina se eliminan los esteroides. Como consecuencia de esta regionalización y eliminación de los esteroides:

1. Aumenta la permeabilidad de la membrana a iones tales como el calcio.
2. Se expresan receptores de unión a ligandos estimulantes, tales como el ácido siálico. Así la población migratoria espermática aumenta su homogeneidad eliminando a aquellos espermatozoides que no poseen una normalidad morfológica, una motilidad progresiva y que no son capaces de adquirir una membrana plasmática funcional, y por tanto de capacitar.

A lo sumo, tan sólo unos pocos cientos de espermatozoides llegarán al oviducto ipsilateral del folículo ovulatorio, donde el esperma se introduce en un entorno diverso en composición celular y hormonal. Según progresa hacia la zona ampular del oviducto, el esperma detecta la presencia de los ovocitos gracias a moléculas quimiotácticas,

como por ejemplo el péptido natriurético articular, secretado por el complejo cúmulo-ovocito. La progesterona, adyacente y adsorbida por el cúmulo, permite la entrada transitoria de calcio al medio intracelular espermático, lo que permite que la concentración de calcio alcance el nivel umbral que desencadena la reacción acrosómica con las glicoproteínas de la zona pelúcida (Chalabi, S. y cols., 2002). La escasa docena de espermatozoides que llegan hasta este punto forman parte de una población muy homogénea con respecto a sus mecanismos de transducción de señales, que han de ser totalmente funcionales, y con respecto a las características de su motilidad necesaria para la fertilización (De Jonge, C., 2005).

Es importante dejar claro que la capacitación y la reacción acrosómica son procesos diferentes e independientes. Lo más notable es que la capacitación es un fenómeno reversible, mientras que la reacción acrosómica no lo es (Baldi, E. y cols., 2000).

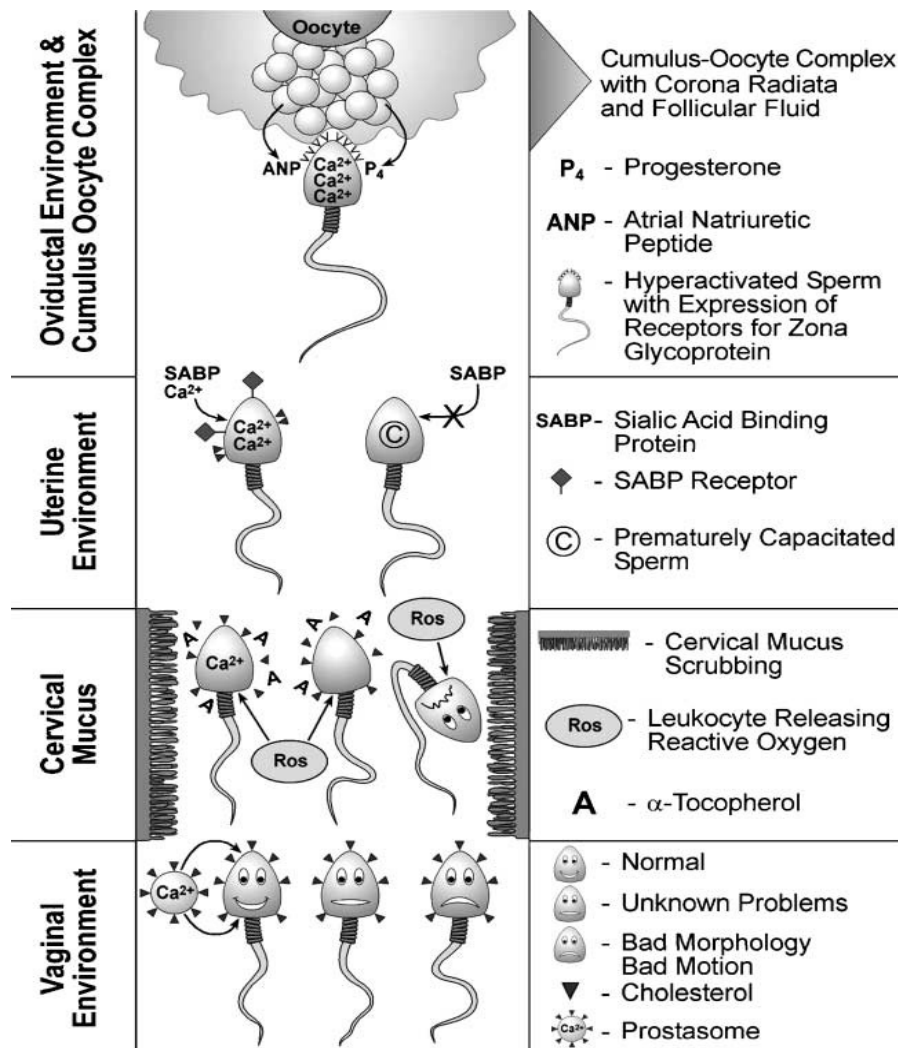


Figura 4. Esquema de la capacitación humana in vivo (De Jonge, C., 2005).

La exposición prolongada de los espermatozoides al plasma seminal puede provocar efectos adversos en la funcionalidad del esperma, en relación con su capacidad para penetrar la mucosa cervical, sufrir la reacción acrosómica y finalmente fertilizar los ovocitos. Incluso una exposición relativamente breve al plasma seminal (unos 30-90 minutos después de la eyaculación) puede influir y disminuir de forma permanente su capacidad de fertilización *in vitro*; del mismo modo, una contaminación de la población espermática con tan solo el 0,01% (v/v) de plasma seminal puede inferir en la correcta fertilización (Mortimer, D. y Mortimer, ST., 2013).

Durante todo el proceso, los espermatozoides deben ser protegidos contra el daño oxidativo potencial que causan ROS. Es por esto que, los espermatozoides utilizados para los diferentes procedimientos clínicos como IUI, IAD, FIV o ICSI o simplemente de los cuales se quiere estudiar su capacidad fertilizante, deben ser separados del plasma seminal en el que se encuentran, no sólo lo más rápido que se pueda tras el eyaculado, sino también de la manera más eficiente posible; y tras ello deben ser resuspendidos en un medio capacitante (Ricci, G. y cols., 2008).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el plasma seminal también contiene componentes que son considerados beneficiosos para la supervivencia de los espermatozoides. Las proteínas del plasma seminal tienen efectos diversos, como promover o inhibir diferentes funciones espermáticas, incluyendo la activación de su motilidad, el paso por el oviducto, la unión a la zona pelúcida, penetrando en el ovocito y, en última instancia, promoviendo la fertilización. Por ejemplo, las adhesinas espermáticas se unen a la superficie de los espermatozoides durante la eyaculación y previenen la capacitación prematura. Se especula que la eliminación o ausencia de dichas proteínas puede desestabilizar la membrana precapacitante del espermatozoide, lo que acortaría la vida funcional del mismo (De Jonge, C., 2005).

El hecho de que los espermatozoides una vez depositados en el útero se vean sometidos a una estricta selección para poder finalmente interactuar con el ovocito a través de su membrana, determina que sea esencial que la técnica utilizada para manipular el esperma previamente a su deposición no ponga en peligro a dicha membrana porque afectaría directamente a su motilidad y longevidad (Morrell, J.M. y Rodríguez-Martínez, H., 2011).

Han sido descritos numerosos métodos para el lavado seminal y la consiguiente capacitación de espermatozoides humanos, pero existen dos procedimientos más ampliamente extendidos.

El primero se basa en la centrifugación de los espermatozoides, que se colocan en un gradiente de densidad discontinuo (DGC). El sistema de DGC separa los espermatozoides en base a su densidad, obteniéndose una distribución diferencial de los mismos a lo largo de todo el gradiente. Los espermatozoides maduros en humanos, morfológicamente normales, se estima que tienen una densidad  $>1,12$  g/ml; mientras que los espermatozoides anormales o inmaduros poseen densidades comprendidas entre 1,06 y 1,09 g/ml. Gracias a la centrifugación a través de un gradiente de Percoll, formado por partículas coloidales de sílice cubiertas con polivinilpirrolidona, aquellos espermatozoides que presentan mejor motilidad y morfología, más densos, irán al fondo del tubo tras la centrifugación, aislándolos, además, de otros constituyentes, como las células germinales inmaduras, los leucocitos o las toxinas solubles entre las que se encuentran los ROS que se acumularán en las capas superiores (Rouen, A. y cols., 2013). Se prepara un *stock* de la suspensión de partículas coloidales de sílice y se hacen diluciones para obtener los diferentes gradientes, normalmente del 40% y 80%. En un tubo cónico se depositan consecutivamente e intentando mantener la interfase, la solución al 80%, al 40% y finalmente la muestra de semen. Tras centrifugarla se recupera el *pellet* del fondo del tubo que contiene los espermatozoides, que finalmente, tras ser resuspendidos en medio de cultivo estarán listos para su utilización. El principal beneficio de esta técnica es la recuperación de una alta concentración espermática y un elevado número de espermatozoides motiles (Mortimer, D. y Mortimer, ST., 2013).

El otro método más utilizado, y además recomendado por la OMS es el *swim-up*, el cual se basa en la migración de los espermatozoides en función de su motilidad (Bagis, T. y cols., 2010). En este caso, existen algunas variantes:

- *Swim-up* directo: La población de espermatozoides, previamente lavada, se deposita en la parte inferior del tubo con el medio de cultivo capacitante; aquellos espermatozoides óptimos se desplazarán en sentido vertical hacia la parte superior. Los restos del plasma seminal y los espermatozoides no móviles quedarán en la parte inferior del tubo.

- *Swim-up* simplificado: previamente al *swim-up* se elimina el lavado inicial. Una de las ventajas que aporta es que al eliminar uno de los pasos, además de ser más práctico y menos costoso para el operador que lo realiza, evita una etapa que podría potencialmente dañar la membrana citoplasmática de los espermatozoides (Siam, E M., 2012).

Estas dos alternativas de selección espermática dejan al margen parámetros como la morfología, la integridad de la cromatina, la viabilidad o la integridad acrosomal, en favor de la motilidad (She, H. y cols., 2008).

La principal desventaja del *swim-up* frente al sistema de gradientes es la baja tasa de recuperación de espermatozoides, lo que lo convierte en muchos casos en poco práctico para la preparación de los espermatozoides para la IUI. Sin embargo, trabajos previos demostraron que un recuento de espermatozoides móviles totales, tras el *swim-up*, de  $0,8 \times 10^6$  se asocia con buenas tasas de embarazo, que no aumentarían al introducir un mayor número de espermatozoides (Berg, U. y cols., 1997; Miller, D. C. y cols., 2002). Estos estudios indican que se puede obtener una buena tasa de embarazo en IUI bien programada con un REM relativamente bajo, incluso siendo más eficiente que con unos valores más altos, mostrando así la importancia de otros parámetros como una buena morfología espermática (Ombelet, W. y cols., 2003).

En relación con la integridad de la doble cadena de ADN, en el paso previo al gradiente o al *swim-up*, existe cierta controversia; hace unos años había autores que mantenían que la integridad de la cromatina mejoraba en aquellas preparaciones que las que se incluía una centrifugación previa al gradiente o *swim-up* (Hammadeh, ME. y cols., 2001). Pero hoy en día se ha visto cómo el hecho de evitar a los espermatozoides el paso de la centrifugación previa evita daños en la integridad de la doble hélice de ADN, ya que algunos autores afirman que esta centrifugación inicial provoca daños en la integridad de la doble hélice de ADN (Stevanato, J. y cols., 2008).

Aunque se han publicado numerosos estudios sobre la eficacia de los diferentes métodos de separación y capacitación del semen, no hay datos significativos suficientes como para recomendar inequívocamente una prueba por encima de otra. Diferentes estudios comparativos han investigado aspectos como las tasas de recuperación de la motilidad y los parámetros de normalidad seminal sin conseguir resultados concluyentes (Ghumman, S., y cols., 2011).

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

En vista de los controvertidos y poco concluyentes datos publicados, relativos a la calidad del semen obtenido mediante distintos métodos de selección para su posterior uso en inseminaciones artificiales, **en el presente trabajo se pretenden observar las diferencias de estas técnicas de selección espermática (*swim-up* vs. gradiente discontinuo de densidad), y su efectividad en las inseminaciones artificiales, por lo que nos hemos propuesto los siguientes objetivos:**

**A)** Analizar el efecto de la selección espermática sobre la tasa de embarazo en las inseminaciones artificiales (conyugal y de donante).

**B)** Estudiar el efecto de la selección espermática sobre la tasa de aborto en las inseminaciones artificiales (conyugal y de donante).

**C)** Determinar la concentración de espermatozoides mínima y máxima necesaria para conseguir un embarazo, en ambos tipos de inseminación artificial.



#### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente estudio se ha llevado a cabo en la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) con parejas que realizaron tratamientos de IA en el periodo de tiempo que transcurre desde el 1 de enero de 2011 hasta el 1 de marzo del 2013. Se ha consensado entre los Hospitales Públicos no realizar IUI más allá de los 37 años de edad de las pacientes, debido a que la eficacia de los resultados es mínima. En la población de nuestro estudio existe algún caso excepcional con 38 años debido a que estas pacientes tenían menos de 37 años en el momento de iniciar el tratamiento, pero a causa de la lista de espera cumplieron 38 al realizar una 2ª, 3ª o 4ª inseminación.

Previamente al tratamiento, a ambos miembros de la pareja se les realiza un perfil hormonal. Adicionalmente, a la mujer se le realiza una histerosalpingografía para confirmar que tiene las trompas permeables; y al hombre se le realiza un seminograma para determinar si su calidad seminal es óptima para poder realizar una IA.

#### **ESTIMULACIÓN OVÁRICA**

En primer lugar se confirma mediante ecografía que los ovarios se encuentran en situación basal, que no haya folículos mayores de 10 mm. Es entonces cuando comienza la estimulación ovárica y se procede a la administración de análogos de la GnRH con el fin de evitar el pico endógeno de LH inducido por el incremento de los niveles de estradiol, que provocaría una ovulación espontánea y la consecuente cancelación del ciclo. Estos análogos se obtienen mediante modificaciones del decapeptido de la GnRH y se dividen en agonistas o antagonistas de la GnRH según su mecanismo de acción.

Existen tres protocolos basados en la administración de agonistas de la GnRH:

- Protocolo de larga duración: el análogo se administra desde la mitad de la fase lútea y la supresión hipofisaria conseguida es más eficaz.
- Protocolo de corta duración: aprovecha el efecto de estimulación inicial que tiene el análogo sobre la hipófisis (*flare up*). Este efecto se mantiene durante dos días y puede ser beneficioso para el reclutamiento folicular. En este caso el análogo se comienza a administrar entre los días 1 y 3 del ciclo en el que

se realiza la hiperestimulación. El tratamiento con gonadotropinas se inicia el tercer día del ciclo y se mantiene hasta la inducción de la ovulación.

- Protocolo ultracorto: la paciente recibe el análogo solo durante los tres primeros días del ciclo. Las gonadotropinas se administran en el segundo o tercer día del ciclo.

Por otro lado, los antagonistas de la GnRH se han introducido recientemente en el campo de la reproducción humana, con el mismo objetivo de evitar un pico prematuro de LH durante la estimulación ovárica controlada. Actúan de forma competitiva, uniéndose al receptor, bloqueándolo y causando así una supresión hipofisaria que se caracteriza por ser profunda e inmediata. Las pautas y dosis de estimulación son personalizadas a cada paciente.

Una vez iniciado el tratamiento se realizan controles ecográficos sistemáticos para monitorizar el desarrollo folicular y su número, y también se mide el estradiol en sangre. Esta hormona es producida por las células de la granulosa de los folículos ováricos y da una idea de su desarrollo.

## **INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN**

Se realiza una ecografía para ver si el tamaño de los 2 ó 3 folículos ha llegado a las dimensiones deseadas (entre 16 y 20 mm de diámetro), si el endometrio se encuentra receptivo con más de 6 mm de grosor y es trilaminar. Si se dan estas tres condiciones se induce la ovulación mediante la HCG, que es responsable de los últimos estadios de maduración del óvulo y hace la función del pico espontáneo de LH. En el caso de que la paciente tuviera riesgo de síndrome de hiperestimulación y el protocolo de estímulo llevara antagonista, se utilizan agonistas de la GnRH para desencadenar la misma. Ésta se produce entre 36 y 40 horas después de la administración de la HCG.



## PROCESAMIENTO DEL SEMEN

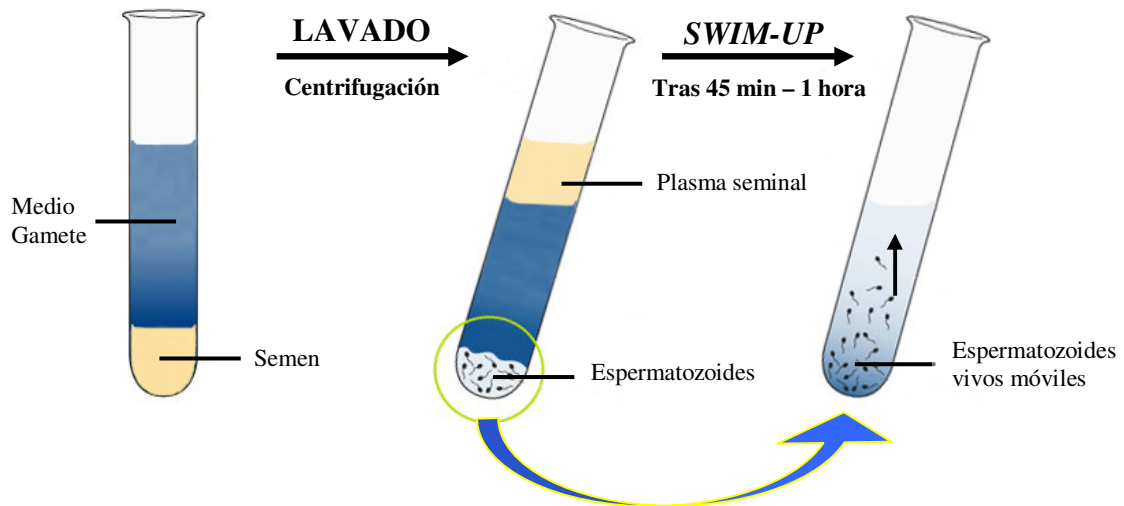
Las muestras de semen se obtienen mediante masturbación después de 2-3 días de abstinencia del paciente. Estas muestras son recogidas a primera hora de la mañana en botes etiquetados con la identificación del paciente y son procesadas en el laboratorio de andrología del HUCA. Se esperan aproximadamente unos 30 minutos antes de realizar cualquier procedimiento con las muestras, para que éstas licuen. Si este procedimiento no surte efecto, se aspira el semen mecánicamente con pipetas Pasteur. Es desaconsejable la aspiración con jeringa metálica para licuar la muestra, ya que se ha demostrado que este procedimiento provoca la activación de los espermatozoides.

Una vez licuadas las muestras seminales se mide el volumen de eyaculado y se toman 20  $\mu$ l para analizar la concentración y motilidad espermática inicial, con la cámara Makler que se sitúa bajo el microscopio óptico. Esta cámara contiene un cuadrado de 1 mm subdividido en 100 cuadrados de 0,1 mm de lado, y la profundidad es de 10 micras. De este modo, el número de espermatozoides contenidos en una línea de 10 cuadrados representa la concentración en millones por ml. Se realiza la media del número de espermatozoides con motilidad A, B, C y D de varias filas o columnas de la cámara Makler.

### - *Swim-up*

Tras el primer contaje seminal, se procede al lavado del eyaculado. Para ello la muestra se divide en dos tubos, identificados con los datos del paciente, y se le añade 1 ml de medio tamponado Gamete (COOK MEDICAL) atemperado a cada tubo; posteriormente se centrifugan a 1800 rpm durante 10 minutos. A continuación, se añade sobre el *pellet* de espermatozoides lavados 1 ml de Gamete sin que se disuelva el *pellet*, de modo que los espermatozoides con motilidad progresiva se desplazarán hacia la superficie, permaneciendo los espermatozoides inmóviles en el *pellet*.

Se inclinan los tubos para que la superficie de contacto sea mayor, y se dejan pasar entre 45 minutos y una hora antes de recoger el sobrenadante, que contendrá los espermatozoides con motilidad progresiva (que son la suma de los espermatozoides calificados como A y B).



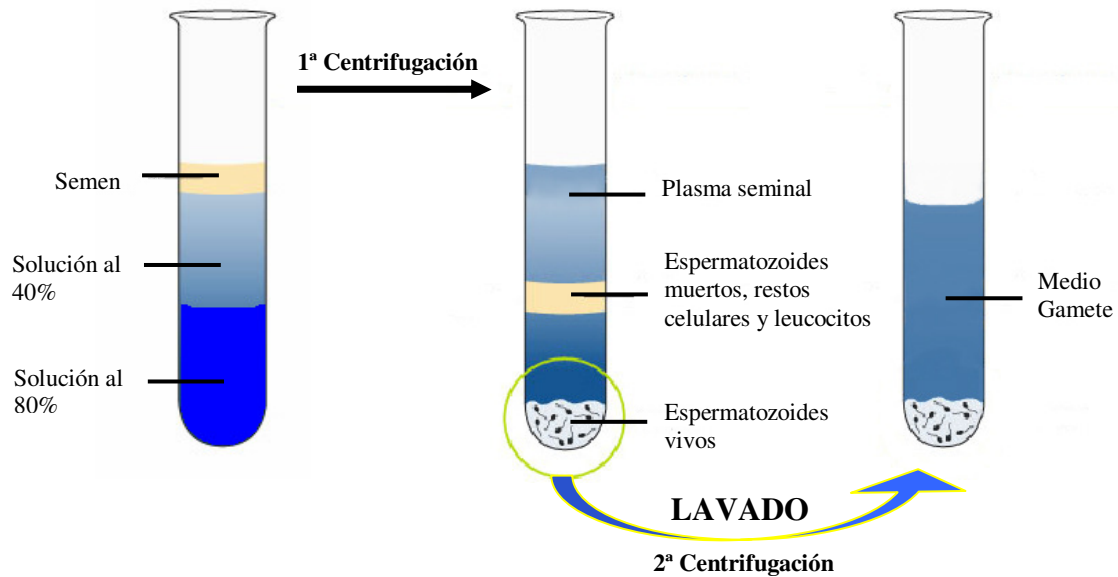
**Figura 5.** Esquema del lavado seminal y posterior swim-up.

Finalmente, con una pipeta se extrae el sobrenadante, que contiene los espermatozoides móviles y se vierten en otro tubo.

### - *Gradiente*

Se divide la muestra en dos tubos, rotulados con los datos del paciente, a los cuales se añaden 1,5 ml de solución PureSperm (Nidacon) al 80% y sobre ella 1,5 ml de la solución al 40%, en cada tubo. Después se le añade la muestra de semen previamente licuada sobre la pared del tubo, con cuidado de no mezclar las fases del gradiente y se centrifuga a 1200 rpm durante 15 minutos. De esta forma, los espermatozoides con mayor densidad atraviesan todas las capas, y se depositan en el fondo del tubo; mientras que los espermatozoides de menor densidad, que se corresponden con los inmóviles, el plasma seminal y los leucocitos quedan en la capa media y superior.

Tras la centrifugación, se aspiran 0,5 ml del *pellet*, de tal forma que con una pipeta se atraviesan la fase superior e intermedia, y para asegurarse de que la pipeta está limpia, antes de alcanzar el *pellet*, se expulsa una pequeña burbuja de aire, saliendo de este modo los restos que hayan podido entrar al atravesar las fases. Una vez recogido el *pellet*, se lava con medio tamponado Gamete, y se centrifuga a 1800 rpm unos 5 minutos. Se retira el sobrenadante hasta dejar 0,5 ml de la muestra para homogeneizar el *pellet*.



**Figura 6.** Esquema de un gradiente de densidad discontinua, con lavado posterior de la muestra.

Finalmente, en ambos procedimientos, se realiza una valoración final de la concentración y la motilidad seminal. Para ello se utilizan los parámetros estándar de la OMS. Con la cámara Makler se calcula la concentración y la motilidad progresiva de la muestra seminal.

### - Semen de donante

En los casos en los que se tiene que recurrir a semen de donante, como el HUCA no dispone de un banco de semen, las muestras se solicitan a los bancos CEIFER (Granada) y Androgén (Galicia). El procesamiento del semen antes de la congelación es distinto en ambos bancos, de modo que dependiendo de la procedencia, las muestras deben prepararse de diferente manera.

Las muestras provenientes del banco de semen Androgen ya vienen procesadas, son las denominadas muestra *IUI-ready*, es decir, ya se han lavado y realizado en este caso un *swim-up* antes de congelar; por ello sólo es necesario descongelar, al baño maría durante 5 minutos a 39°C, antes de ser utilizadas.

Sin embargo, las muestras del banco de semen de Granada sólo han sido sometidas a un primer lavado y congelado, de modo que después de descongelarlas se las realiza o bien un gradiente o bien un *swim-up*, dependiendo de la calidad de la muestra.

## MÉTODO DE INSEMINACIÓN

La inseminación intrauterina es la más utilizada y extendida por su sencillez y elevada tasa de gestación. El resto de los tipos de inseminación hoy en día se utilizan sólo en los casos en los que es imposible la canalización del cérvix.

Es importante que la muestra capacitada se mantenga hasta el momento de la inseminación a 37°C y que transcurra el menor tiempo posible desde la finalización de la capacitación hasta la inseminación. De la muestra de espermatozoides recuperados y capacitados mediante cualquiera de las dos técnicas, se toman entre 0,3 y 0,5 ml que se introducen en una cánula interna, que guiada por una cánula externa será introducida en el canal cervical de la paciente, para depositarlos finalmente en el fondo uterino de forma rápida y retirando la cánula lentamente.

Existen en el mercado diferentes cánulas para inseminación, la elección dependerá principalmente de la que mejor se adapte a las preferencias personales del ginecólogo y además a cada paciente en particular según la dificultad del procedimiento. De cualquier forma, la cánula ha de ser de poca rigidez para ejercer el menor traumatismo posible.

## DIAGNÓSTICO DE EMBARAZO Y ABORTO

A los 15 días de la transferencia embrionaria, se determina el diagnóstico del embarazo bioquímico, midiendo la concentración de  $\beta$ -HCG en la primera orina de la mañana (mediante un *kit* comercial). Este embarazo es posteriormente corroborado en el HUCA a las 7 semanas mediante la presencia en una ecografía de un saco embrionario con latido fetal positivo. La ausencia de este latido fetal tras la ecografía, constataría la presencia de un aborto.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo se realizó mediante el programa estadístico SPSS (Chicago, Illinois). Para comparaciones de datos con distribución no paramétrica se utilizó el test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ). Los valores de las variables continuas son expresados como medias. Los valores de las variables categóricas son expresados como porcentajes. Solo se habrían considerado como indicativos de significación estadística aquellos valores de p menores de 0,05.

## V. RESULTADOS

Para llevar a cabo este trabajo se ha realizado un estudio retrospectivo, con pacientes cuya edad media es de 33 años  $\pm$ 1 año, y que engloba desde 2011 hasta marzo de 2013, de tal forma que:

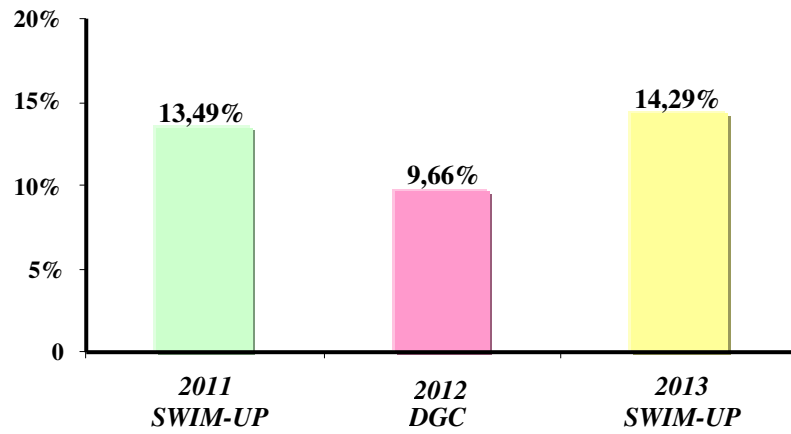
- Durante todo el año 2011 se realizaron un total de 430 IA, en las que las muestras seminales fueron procesadas mediante *swim-up*.
- Durante todo el año 2012 se realizaron un total de 238 IA, en las que se cambió la técnica de procesamiento seminal a gradientes de densidad discontinua.
- Durante el año 2013, hasta el 31 de marzo, fecha límite establecida en este estudio, para así poder valorar la presencia o no de embarazo, se han realizado 105 IA, en las que se ha vuelto a realizar la técnica *swim-up*.

En el primer abordaje del estudio no se obtuvieron diferencias significativas entre las tasas de embarazo global por IA ( $P=0,2943$ ) del año 2011, 2012 y 2013, resultando el número de embarazos en cada año en 58 (13,49%), 23 (9,66%) y 15 (14,29%) respectivamente (Tabla 4; Figura 6).

Del mismo modo, no se observaron diferencias en las tasas de aborto, teniendo en cuenta los 8 casos del año 2011 (1,86%), los 4 casos de 2012 (1,68%) y ninguno en el 2013 (0%), (Figura 7).

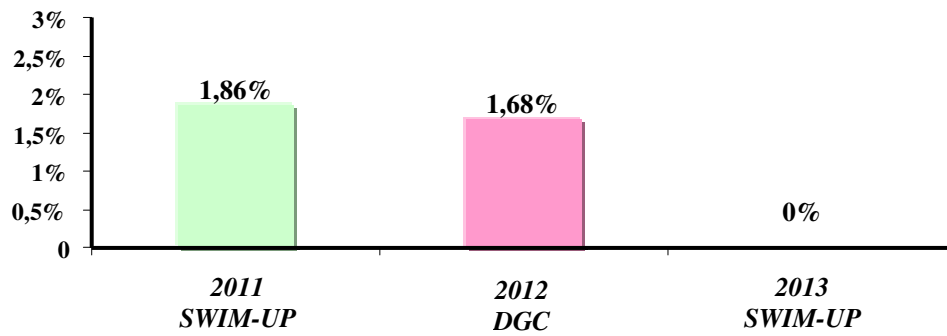
**Tabla 4.** Tasa de embarazo global y tasa de aborto global según la técnica empleada cada año.

AÑO/TÉCNICA	EDAD MEDIA PACIENTES	N	TASA DE EMBARAZO POR IA	TASA DE ABORTO POR IA
2011 SWIM-UP	32	430	58 (13,49%)	8 (1,86%)
2012 DGC	33	238	23 (9,66%)	4 (1,68%)
2013 SWIM-UP	33	105	15 (14,29%)	0 (0,00%)



**Figura 6.** Representación gráfica de la tasa de embarazo global entre ambas técnicas.

$P=0,2943$ .



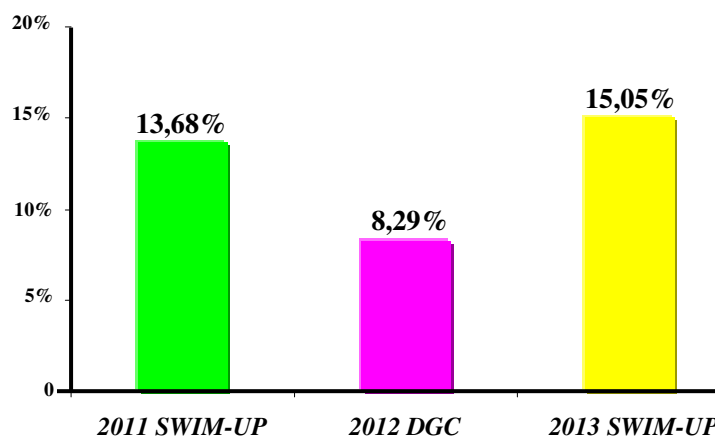
**Figura 7.** Representación gráfica de la tasa anual de aborto global entre ambas técnicas.



En un segundo abordaje del estudio, se dividió el total de las IA de cada año en dos grupos independientes, por un lado las IAC y por otro las IAD. De esta forma, se analizaron las tasas de embarazo por IAC de los años 2011, 2012 y 2013, resultando el número de embarazos en cada año en 49 (13,68%), 17 (8,29%) y 14 (15,05%) respectivamente (Tabla 5). En este caso tampoco se han observado diferencias significativas ( $P=0,1129$ ), (Figura 8).

**Tabla 5.** Tasa de embarazo por IAC, según la técnica empleada cada año.

AÑO/TÉCNICA	EDAD MEDIA PACIENTES	N	TASA DE EMBARAZO POR IAC
2011 SWIM-UP	32	358	49 (13,68%)
2012 DGC	34	205	17 (8,29%)
2013 SWIM-UP	33	93	14 (15,05%)

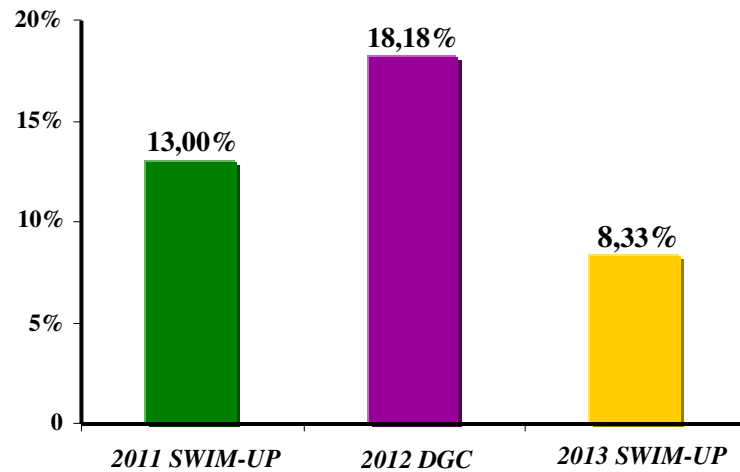


**Figura 8.** Representación gráfica de la tasa anual de embarazo por IAC entre ambas técnicas.  $P=0,1129$ .

Y por otra parte, se analizaron el número de embarazos por IAD en los años 2011, 2012 y 2013, resultando en 9 (13,00%), 6 (18,18%), y 1 (8,33%) respectivamente (Tabla 6). En este caso tampoco se han observado diferencias significativas entre las tasas de embarazo por IAD de los 3 años ( $P=0,6269$ ), (Figura 9).

**Tabla 6.** Tasa de embarazo por IAD, según la técnica empleada cada año.

AÑO/TÉCNICA	EDAD MEDIA PACIENTES	N	TASA DE EMBARAZO POR IAD
2011 SWIM-UP	33	72	9 (13,00%)
2012 DGC	32	33	6 (18,18%)
2013 SWIM-UP	32	12	1 (8,33%)

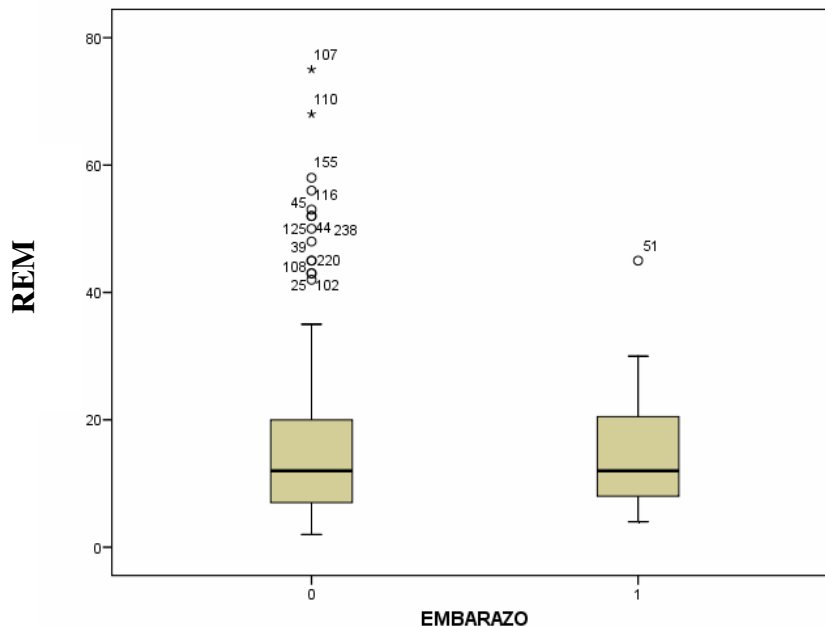


**Figura 9.** Representación gráfica de la tasa anual de embarazo por IAD entre ambas técnicas.  $P=0,6269$ .

Por último, se realizó un tercer abordaje en el que valorar la posible influencia del REM en la tasa de embarazo, para establecer la concentración óptima por encima de la cual se consigue el embarazo y si fuera posible establecer también una concentración máxima por encima de la cual el embarazo nunca se consigue; en definitiva acotar el intervalo de concentración óptima para la consecución de la gestación. Para ello se tomaron los valores de REM del año 2012, con un total de 238 casos, de los cuales 23 corresponden a embarazos positivos. Dentro de este grupo el valor REM mínimo fue 2 millones y el valor REM máximo fue 45 millones, siendo este último un dato atípico, ya que el tercer cuartil se sitúa aproximadamente en 20 millones de espermatozoides por ml.

**Tabla 7.** Valores de REM máximos y mínimos para la consecución del embarazo, año 2012.

AÑO 2012	N	MEDIA REM	DESV. TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO
EMBARAZOS NEGATIVOS	215	15,63	12,481	2	75
EMBARAZOS POSITIVOS	23	15,35	10,421	4	45
<b>TOTAL</b>	<b>238</b>	<b>15,61</b>	<b>12,278</b>	<b>2</b>	<b>75</b>



**Figura 10.** Box-plot representativo de valores mínimo y máximo, de la distribución del REM en el año 2012 de los grupos de embarazo negativo (0 en la gráfica y embarazo positivo (1 en la gráfica).

## **VI. DISCUSIÓN**

Hoy en día, la inseminación artificial ya sea con semen de la pareja o con semen de donante, sigue siendo una práctica muy frecuente y una de las primeras opciones de tratamiento para muchas parejas infértiles, aunque sus tasas de éxito no sean muy elevadas comparadas con la fecundación *in vitro*. Está indicada en pacientes con infertilidad idiopática, endometriosis mínima y leve, y subfertilidad por factor cervical o por factor masculino leve. La realización de un estudio de fertilidad a la pareja, previo a la inseminación, permitirá conocer si debe realizarse la IAD o ha de plantearse otra TRA. Los factores ovulatorios y cervicales se pueden resolver con estimulación de la ovulación e inseminación intrauterina, no así la obstrucción tubárica, ya que no existe controversia en indicar FIV en la obstrucción tubárica bilateral (Verhulst, SM. y cols., 2006). Es decir, quienes más se benefician son las mujeres con edades inferiores a los 37 años, trompas permeables, infertilidad menor a tres años, sin trastorno ovulatorio, sin endometriosis moderada o severa y sin un factor masculino severo; por lo tanto, la selección adecuada de las pacientes es importante para obtener mejores resultados (Celis, A., 2012). Sea por la causa que sea, la razón final para el uso de la IUI es incrementar la cantidad de espermatozoides de buena calidad en el lugar de la fertilización.

La tasa de gestaciones con IUI disminuye a partir de los 35-37 años, y sobre todo a partir de los 40 años. Como ejemplos, según la Sociedad Española de Fertilidad la tasa de gestaciones por ciclo en mujeres de menos de 40 años fue del 15% frente al 13% en mujeres de más de 40 años (SEF, 2010). Este es el principal motivo por el cual hemos valorado la edad de todas las mujeres del estudio, ya que una edad avanzada es un indicador de una menor probabilidad de embarazo tras un tratamiento de fertilidad por IA. Hemos querido analizar que en todos los grupos del estudio, tanto por años o técnica utilizada, como por IAC o IAD las pacientes tuvieran una media de edad similar, de tal forma que no influyera de forma significativa en los resultados obtenidos para el análisis de la infertilidad masculina.

La principal ventaja de la IUI sobre la FIV es su simplicidad y su bajo coste, pero no está exenta de riesgos, como el embarazo múltiple. Cuando la IUI está indicada, siempre es conveniente optar primero por ésta antes que FIV, ya que el proceso es poco costoso y un grupo de pacientes logrará un embarazo. El éxito de las IUI siempre es

mayor en ciclos estimulados artificialmente, cuando se previene el pico prematuro de LH y cuando se realiza un soporte de la fase lútea, que en ciclos naturales.

Estudios anteriores establecieron que el pronóstico de embarazo después de una IUI viene determinado por la selección de la población de pacientes, la duración, el tipo y grado de infertilidad. En relación a la infertilidad masculina, los métodos de laboratorio para procesar el semen difieren en su eficacia en cuanto a la recuperación de espermatozoides móviles, y por lo tanto también son determinantes en el resultado (Rives, N. y cols., 2002). Diversos artículos demuestran una considerable discordancia entre los estudios realizados y las tasas de embarazo, difíciles de comparar por las variaciones en la definición de infertilidad de factor masculino (Cooper, T. y cols., 2010; Youn, JS. y cols., 2011), que ha ido variando con los años; y como prueba de ello son los nuevos valores establecidos por la OMS en el 2010, que han dejado en desuso los establecidos en el 1999, con puntos o cortes de normalidad mucho más bajos que los anteriores.

La aparición de los métodos de preparación espermática desarrollados para FIV, tales como el *swim-up* y los DGC, hizo resurgir el interés en la IUI. El uso de espermatozoides móviles lavados para la IUI, libres del fluido seminal, además dio como resultado la disminución de efectos colaterales asociados al uso del semen completo, tales como dolor pélvico o infección (Pacheco Romero, J., 2012).

Es importante mencionar que la calidad del semen en el conteo inicial de espermatozoides móviles es un importante factor de pronóstico para el éxito en la IUI (Asada, H. y cols., 2000), puesto que permite obtener una mejor recuperación de formas móviles y probablemente morfológicamente óptimas, mediante las técnicas de capacitación que se realizan *in vitro* en el laboratorio. Sin embargo, hoy en día no está claro cuál de las técnicas existentes es el mejor método terapéutico para la infertilidad masculina a la hora de realizar una IUI. He ahí el interés de este estudio, dilucidar la eficacia del procedimiento a la hora de procesar el semen, lo que permitirá conocer el pronóstico de éxito o fracaso de la IUI. Es decir, si conseguimos clarificar qué técnica, el *swim-up* o el gradiente, permite una mejor recuperación de espermatozoides con movilidad progresiva y correcta morfología, podremos definir la recuperación

espermática como un buen factor pronóstico, en aquellos casos de infertilidad definidos únicamente por factor masculino.

En los resultados obtenidos del primer abordaje se analiza la tasa de embarazo y aborto obtenida por ambos métodos. Pese a no obtenerse diferencias estadísticamente significativas, sí se observa una tendencia en la que con el *swim-up*, tanto en el año 2011 (13,49%) como en el 2013 (14,29%), se obtiene una tasa de embarazo por IUI superior a la del año 2012 (9,66%), en el que se empleó la técnica de DGC, para procesar las muestras seminales. Esto podría indicar que la técnica del *swim-up* proporcionaría una cierta mejora en el proceso de capacitación, posiblemente porque aunque conlleve una considerable pérdida en el número de espermatozoides recuperados, no implica la realización de dos centrifugaciones, como lo hace el sistema DGC, y por lo tanto recuperamos un sobrenadante rico en espermatozoides con menos daño por ROS o menor fragmentación del DNA.

En relación a la tasa de aborto, pese a que en el año 2011 sea ligeramente más alta (1,86%) que en el año 2012 (1,68%), hay que tener en cuenta que el número de IA realizadas en 2011 (430) fue mucho mayor que en 2012 (238), lo que sumado al porcentaje nulo de 2013, hacen que esa ligera tasa superior no sea estadísticamente significativa. Esto podría, por tanto, apoyar la teoría de que el *swim-up* es una técnica mejor para la capacitación espermática, ya que o no presenta diferencias con la tasa de aborto en IUI al capacitar el semen mediante DGC, o incluso es menor, probablemente por obtenerse espermatozoides con menor daño en el DNA, que como se sabe está correlacionado con aumento en las tasas de aborto (Stevanato, J. y cols., 2008).

Partiendo de estos resultados, procedimos a analizar de nuevo las tasas de embarazo, pero en este segundo abordaje diferenciamos el grupo de pacientes a las que se les realizó una IAC y, por otro lado, a las que se les realizó una IAD. De esta forma, podríamos comprobar si el *swim-up* mejoraba cualitativamente tanto las muestras de los cónyuges que tuvieran un problema de subfertilidad, con alteraciones en la muestra de tipo asteno, oligo o teratozoospermia, como las de los donantes, que en principio deberían ser muestras óptimas normozoospermicas tanto en concentración, como en motilidad y morfología.

Se observa cómo, efectivamente, en el análisis de los pacientes a los que se les realizó IAC, los resultados son muy similares a los obtenidos en el grupo general de IA. Siendo en este caso, incluso más clara la tendencia a la mejora en la tasa de embarazo mediante la capacitación por *swim-up* en el año 2013 (15,05% frente al 14,29% que hay en el mismo año, sin diferenciar IAC de IAD).

Lo sorprendente del estudio aparece a la hora de analizar los datos obtenidos en las tasas de embarazo por IAD. Los porcentajes se invierten por completo, observándose una tendencia clara en la que la tasa de embarazo en el año 2012, en el que se procesaron las muestras mediante DGC, es superior (18,18%) a la de los años 2011 (13,00%) y 2013 (8,33%) en los que se ha realizado *swim-up*.

Una explicación podría ser que, dado que los datos obtenidos no son significativos, la tendencia observada puede deberse simplemente a la diferencia en el tamaño muestral, ya que en el año 2011 (72) se realizaron más del doble de IAD que en el año 2012 (33), y seis veces más que en 2013 (12).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que, el proceso de congelación en las muestras de semen de donante se hace en presencia de criopreservadores no penetrantes tales como el glicerol, y penetrantes, como el dimetilsulfóxido o propanodiol, y se ha demostrado que la técnica de gradientes es el mejor método para eliminar estas sustancias de la fracción de espermatozoides con motilidad progresiva, hecho que tiene menor eficacia si se usa el sistema *swim-up*. Además en el proceso de descongelación de la muestra de donante, se produce un porcentaje elevado de espermatozoides con pérdida de movilidad y vitalidad espermática, que son eliminados eficazmente con el método de gradiente, impidiendo el contacto de estas células no viables con los espermatozoides móviles progresivos, y por tanto separándolas de un posible daño por eliminación de radicales libres y otras sustancias tóxicas.

El porcentaje de reducción de la motilidad espermática es variable y depende del medio crioprotector utilizado, la técnica de congelación, la calidad inicial del semen y la resistencia a la congelación-descongelación de ese semen en concreto. Lo más habitual en sémenes de donantes válidos es que la pérdida de movilidad espermática sea alrededor del 20%, y por tanto si se empleara la técnica de *swim-up* de forma rutinaria, la recuperación de espermatozoides móviles para la inseminación podría verse

comprometida. De ahí la importancia de elegir un buen banco de semen de donantes donde los procesos de congelación y descongelación sean de máxima calidad, y testar una alícuota de la muestra del donante para valorar la calidad del proceso de congelación-descongelación, antes de proceder a una técnica de selección u otra.

A igualdad de número de espermatozoides móviles inseminados no hay evidencia de que la eficacia de espermatozoides sin congelar sea mayor que la de espermatozoides que han estado congelados. Sin embargo, las muestras en fresco tienen, generalmente, un número superior de espermatozoides móviles. La recuperación de espermatozoides móviles a partir de un semen congelado-descongelado que contiene medio crioprotector viscoso, suele ser menor que la que se obtiene de un semen fresco (Zuzuarregui, JL., y cols., 2004).

Todo esto nos lleva a pensar que a la hora de inseminar con semen de donante, las muestras se presuponen de una alta calidad, hecho que no ocurre con muchos sémenes de varones que acuden a TRA, ya que los donantes han tenido que pasar una selectiva criba. A esto se suma que gracias a las partículas coloidales de sílice presentes en el DGC, así como a sustancias que se añaden a estos medios para adsorber las posibles moléculas tóxicas, se recupera una gran cantidad de espermatozoides, lo que permite que de una muestra ya de por sí cualitativamente buena, se recupere una elevada cantidad de espermatozoides (Mortimer, D. y Mortimer, ST., 2013), lo que podría encajar con una mayor tasa de embarazo, en este caso en las IAD.

En relación con ésta última teoría, para poder demostrar si realmente el número de espermatozoides móviles recuperados es determinante para conseguir un embarazo, se analizó retrospectivamente el REM de las muestras seminales procesadas mediante DGC con respecto a la tasa de embarazo por IA, en el año 2012.

Partiendo de que la cantidad mínima recomendada por diferentes sociedades médicas es muy dispar (por ejemplo, la American Fertility Society recomienda inseminar con más de 30 millones de espermatozoides (Moghissi, KS., 1990), mientras que la Federación CECOS francesa considera válido un mínimo de dos millones de espermatozoides móviles (Le Lannou, D. y cols., 1995), no está claro realmente cuál es el número óptimo de espermatozoides a recuperar e inseminar.



Generalmente se ha aceptado que la cifra adecuada de espermatozoides móviles para un ciclo de IA sea al menos de 5 millones por ml. Pero incluso cifras de espermatozoides móviles inseminados inferiores a un millón se han asociado con buenas tasas de embarazo, que no aumentarían al introducir un mayor número de espermatozoides (Berg, U. y cols., 1997; Miller, D. C. y cols., 2002). Por otro lado, concentraciones de espermatozoides excesivamente elevadas se han observado en parejas infértiles, lo que no hace incrementar la tasa de gestación (Morshedi, M. y cols., 2003).

Todos estos datos se corresponden con el *box-plot* obtenido, en el que se observa como los embarazos positivos, a excepción de un caso de los 23, han sido a partir de muestras con un REM entre 2 y 25 millones de espermatozoides por ml, situándose entre 10 y 20 millones, aproximadamente, la máxima probabilidad. Es decir, concentraciones por debajo del establecido mínimo de 5 millones por ml son aceptables para conseguir un embarazo, ya que hay casos en los que con tan solo 2 millones de espermatozoides por ml la paciente se ha quedado embarazada. Sin embargo, altas concentraciones, por encima de 25 millones deberían diluirse para ajustar la concentración a entre aproximadamente 10 y 20 millones, que es la concentración óptima, ya que es sabido que concentraciones elevadas de espermatozoides en el momento de inseminación podrían generar polispermia y por tanto fertilización anómala, con el subsecuente fallo en la implantación, y por tanto en la tasa de embarazo.

Para finalizar, añadir que en relación con las posibles líneas futuras de trabajo e investigación al realizar este estudio, hemos observado el gran número de referencias relativas al tema de capacitación seminal, tanto en IA, como en otras técnicas de reproducción asistida. Pero al igual que nos ha ocurrido con los datos recogidos en este trabajo, no existe ningún dato concluyente que pueda llevarnos a confirmar que una técnica es mejor que otra a la hora de procesar el semen. Es por esto que una de las opciones interesantes sería hacer un análisis más exhaustivo de lo que ocurre *in vivo*, para así poder ver qué moléculas y procesos concretos están involucrados en la capacitación espermática (De Jonge, C., 2005). De esta forma se podría extrapolar al trabajo en el laboratorio, en el que se capacita *in vitro* la muestra, obteniéndose mejores resultados mediante la técnica más adecuada.

Aplicado a la clínica, viendo que cada método posee ventajas e inconvenientes, ya que lo que para un grupo puede ser beneficioso para otro puede suponer un aspecto negativo, y viceversa; tal vez lo más importante a la hora de plantearnos qué método utilizar para la capacitación seminal en un laboratorio de reproducción asistida sea valorar nuestras muestras, analizar el caso concreto de cada paciente, tener en cuenta el historial clínico de la pareja y en función de todo esto, elegir entre las técnicas existentes aquella que nos permita una mejor recuperación de los espermatozoides disponibles.

## **VII. CONCLUSIONES**

Del presente trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- No hay diferencias significativas en las tasas de embarazo globales por IUI, en función de si la muestra seminal es capacitada mediante DGC o *swim-up*; la tendencia en la tasa de embarazo en pacientes a las que se les ha realizado una IAC es mejor al capacitar las muestras mediante *swim-up*; y la tendencia en la tasa de embarazo en pacientes a las que se les ha realizado una IAD es mejor al capacitar las muestras mediante DGC.

- No se han encontrado diferencias significativas en las tasas de aborto globales por IUI, dependiendo de si la muestra seminal es capacitada mediante DGC o *swim-up*.

- El valor del recuento total de espermatozoides móviles óptimo para conseguir un embarazo en pacientes a las que se les ha realizado una inseminación artificial se sitúa entre 10 y 20 millones de espermatozoides por ml.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

- Allegra, A., Marino, A., Coffaro, F., Scaglione, P., Sammartano, F., Rizza, G. y Volpes, A. (2007). GnRH antagonist-induced inhibition of the premature LH surge increases pregnancy rates in IUI-stimulated cycles. A prospective randomised trial. *Human Reproduction*, 22: 101-108.
- Aitken, RJ. y De Iuliis, GN. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive Biomedical Online*, 14: 727-33.
- Akanji Tijani, H. y Bhattacharya, S. (2010). The role of intrauterine insemination in male infertility. *Human Fertility*, 13 (4), 226-232.
- Alisch, A., Roiha, K., Finas, D. y Felberbaum, R. (2004). Extreme suppression of LH within 3 h after GnRH-antagonist administration in COH: results of pulsatility pattern analysis. *Human Reproduction*, 19: 61.
- Arienti, G., Carlini, E. y Palmerini, CA. (1997). Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. *Journal of Membrane Biology*, 155: 89-94.
- Arienti, G., Carlini, E., Saccardi, C. y Palmerini, CA. (2004). Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8: 77-84.
- Asada, H., Sueoka, K., Hashiba, T., Kuroshima, M., Kobayashi, N. y Yoshimura, Y. (2000). The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *Journal of Assistant Reproduction and Genetics*, 17: 51-59.
- Bagis, T., Haydardedeoglu, B., Kilicdag, EB., Cok, T., Simsek, E. y Parlakgumus, AH. (2010). Single versus double intrauterine insemination in multi-follicular ovarian hyperstimulation cycles: a randomized trial. *Human Reproduction*, 25: 1684-1690.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Muratori, M. y Forti, G. (2000) Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience* 5, E110-E123.
- Bendsorp, AJ., Cohlen, BJ., Heineman, MJ. y Vandekerckhove, P. (2007). Intra-uterine insemination for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Berg, U. Brucker, C. y Berg, F. D. (1997). Effect of motile sperm count alter swim-up on outcome of intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*, 67: 747-750.

- 
- Cantineau, AE. y Cohlen, BJ. (2007). Dutch IUI study group. The prevalence and influence of luteinizing hormone surges in stimulated cycles combined with intrauterine insemination during a prospective cohort study. *Fertility and Sterility*, 88: 107-112.
  - Cantineau, AE., Cohlen, BJ., Klip, H., Heineman, M.J. y The Dutch IUI Study Group Collaborators. (2011). The addition of GnRH antagonists in intrauterine insemination cycles with mild ovarian hyperstimulation does not increase live birth rates - a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Human Reproduction*, 26(5): 1104-1111.
  - Chalabi, S., Easton, RL., Patankar, MS., Lattanzio, FA., Morrison, JC., Panico, M., Morris, HR., Dell, A. y Clark, GF. (2002) The expression of free oligosaccharides in human seminal plasma. *Journal of Biological Chemistry* 277, 32562-32570.
  - Celis, A. (2012). Inseminación intrauterina en el momento actual. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 58: 107-114.
  - Cohlen, B.J. (2005). Should we continue performing intrauterine inseminations in the year 2004? *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 59: 3-13.
  - Cooper, T., Noonan, E., von Eckardstein, S. Auger, J., Baker, H. W. G., Benhre, H. y cols. (2010). World health organization referente values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16: 231-245.
  - Cross, NL. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology Reproduction*, 59: 7-11.
  - Cunha-Filho, JS., Kadoch, J., Righini, C., Fanchin, R., Frydman, R. y Olivennes, F. (2003). Premature LH and progesterone rise in intrauterine insemination cycles: analysis of related factors. *Reproductive Biomedicine Online*, 7: 194-199.
  - De Jonge, C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction*, 11(3), 205-214.
  - Donnelly, ET., O'Connell, M., McClure, N. y Lewis, SE. (2000). Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15: 1552-61.
  - Dorjpurev, U., Kuwahara, A., Yano, Y., Taniguchi, T., Yamamoto, Y., Suto, A., Tanaka, Y., Matsuzaki, T., Yasui, T. e Irahara, M. (2011). Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intrauterine insemination. *The Journal of Medical Investigation*, 58(1-2): 127-133.

- 
- Fauser, B.C., Devroey, P. y Macklon, N.S. (2005). Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet*, 365: 1807-1816.
- Ghumman, S., Kumar, S., Upadhya, D., Kalthur, G., Jayaraman, V., Bola Rao, S. y Kumar, P. (2011). Combination of swim-up and density gradient separation methods effectively eliminate DNA damaged sperm. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 12: 148-152.
- Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C. y cols. National Cooperative Reproductive Medicine Network. (2001). Sperm morphology, motility and concentration in fértiles and infértiles men. *New England Journal of Medicine*, 345: 1388-1393.
- Hammadeh, ME., Kühnen, A., Amer, AS., Rosenbaum, P., y Schmidt, W. (2001). 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. *International Journal of Andrology*, 24: 360-368.
- Kyrou, D., Kolibianakis, M K., Fatemi, H M., Grimbizis, G F., Theodoridis, T D., Camus, M., Tournaye, H., Tarlatzis, B C. y Devroey, P. (2012). Spontaneous triggering of ovulation versus HCG administration in patients undergoing IUI: a prospective randomized study. *Reproductive Biomedicine Online*, 25(3): 278-283.
- Lee, TH., Lin, YH., Seow, KM., Hwang, JL., Tzeng, CR. y Yang, YS. (2008). Effectiveness of cetorelix for the prevention of premature luteinizing hormone surge during controlled ovarian stimulation using letrozole and gonadotropins: a randomised trial. *Fertility and Sterility*, 90: 113-120.
- Le Lannou, D., Gastard, E., Guivarch, A., Laurent, MC. y Poulain, P. (1995). Strategies in frozen donor semen procreation. *Human Reproduction*, 10: 1765-74.
- Licht, P., Fluhr, H., Neuwinger, J., Wallwiener, D. y Wildt, L. (2007). Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 269: 85-92.
- Lucchini, C., Volpe, E. y Tocci, A., (2012). Comparison of intrafollicular sperm injection and intrauterine insemination in the treatment of subfertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(10): 1103-1109.

- 
- Miller, D. C., Hollenbeck, B. K., Smith, G. D. Randolph, J. F., Christman, G. M., Smith, Y. R., y cols. (2002). Processed total motile count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology*, 60: 497-501.
  - Moghissi, KS. (1990). Reflections on the new guidelines for the use of semen donor insemination. *Fertility and Sterility*, 53: 399-400.
  - Morrell, J.M. y Rodríguez-Martínez, H. (2011). Practical Applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Veterinary medicine International*.
  - Mortimer, D. y Mortimer, ST. (2013). Density gradient separation of sperm for artificial insemination. Spermatogenesis: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 927(19): 217-226.
  - Morshedi, M., Duran, H-E-. Taylor, S. y Oehninger, S. (2003). Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 79(3): 1625-1632.
  - Olivennes, F., Diedrich, K., Frydman, R., Felberbaum, RE. y Howles, CM. (2003). Safety and efficacy of a 3 mg dose of the GnRH antagonist cetrorelix in preventing premature LH surges: report of two large multicentre, multinational, phase IIIb clinical experiences. *Reproductive Biomedical Online*, 6: 432-438.
  - Ombelet, W., Deblaere, K., Bosmans, E., Cox, A., Jacobs, P., Janssen, M. y Nijs, M. (2003). Semen quality and intrauterine insemination. *Reproductive Biomedicine Online*, 7: 485-492.
  - OMS (2010). Laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5th edition. *World Health Organization*, Department of Reproductive Health and Research.
  - Pacheco Romero, J. (2012). Editorial. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 58 (2): 73-75.
  - Palmerini, CA., Saccardi, C., Carlini, E., Fabiani, R. y Arienti, G. (2003). Fusion of prostasomes to human spermatozoa stimulates the acrosome reaction. *Fertility and Sterility*, 80: 1181-1184.
  - Perrin, A., Basinko, A., Douet-Guilbert, N., Gueganic, N., Le Bris, MJ., Amice, V., De Braekeleer, M. y Morel, F. (2011). Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenetic and Genome Research*, 133: 100-106.

- 
- Ricci, G., Perticarari, S., Boscolo, R., Montico, M., Guaschino, S. y Presani, G. (2008). Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertility and Sterility*, 91(2): 632-638.
  - Rives, N., Langlois, G., Bordes, A., Simeon, N. y Mace, B. Cytogenetic analysis of spermatozoa from males aged between 47 and 71 years. (2002). *Journal of Medical Genetics*, 39: E63.
  - Rouen, A., Balet, R., Dornal, M., Hyon<sup>1</sup>, C., Pollet-Villard<sup>1</sup>, X., Chantot-Bastaraud<sup>1</sup>, S., Joyé, N., Portnoï, MF., Cassuto, NG., y Siffroi, JP. (2013). Discontinuous gradient centrifugation (DGC) decreases the proportion of chromosomally unbalanced spermatozoa in chromosomal rearrangement carriers. *Human Reproduction*, 0 (0): 1-7.
  - Sakkas, D., Manicardi, GC., Tomlinson, M., Mandrioli, M., Bizzaro, D., Bianchi, PG., y cols. (2000). The use of two density gradient centrifugation techniques and the *swim-up* method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Human Reproduction*, 15: 1112-1116.
  - SEF (Comité de Registro de Técnicas de Reproducción Asistida, Sociedad Española de Fertilidad) - Prados, F., de los Santos, MJ., Cabello, Y, Buxaderas, R., Segura, A., Hernández, J, Vidal, E., Herrero, J., Luceño, F., Marqueta, J., Pérez Milán, F. Y Castilla, JA. (2010). *Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI)*.
  - She, H., Dong, NJ., y Yuan, YY. (2008). Comparison of the methods of separating high-quality sperm for intrauterine insemination. *National Journal of Andrology*, 14(11): 1007-1010.
  - Siam, E M. (2012). Pregnancy outcome alter IUI for male and idiopathic infertility using a new simplified method for sperm preparation. *Middle East Fertility Society Journal*, 17: 30-36.
  - Slama, R., Eustache, F., Ducot, B., Jensen, T. K., Jorgensen, N., Horte, A. y cols. (2002). Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Human Reproduction*, 17: 503-515.
  - Stevanato, J., Bertolla, RP., Barradas, V., Spaine, DM., Cedenho, AP. y Ortiz, V. (2008). Semen processing by density gradient centrifugation does not improve sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation rates. *Fertility and Sterility*, 90: 889-890.
  - The ESHRE Capri Workshop Group. (2009). Intrauterine Insemination. *Human Reproduction Update*, 15(3): 265-277.



- 
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2006). Optimal evaluation of the infertile female. *Fertility and Sterility*, 86(4): S264-S267.
  
  - Van Voorhis, BJ., Barnett, M., Sparks, AE., Syrop, CH., Rosenthal, G. y Dawson, J. (2001). Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 75(4): 661-8.
  
  - Verhulst, SM., Cohlen, BJ., Hughes, E., te Velde, E. y Heineman, MJ. (2006). Intra-uterine insemination for unexplained subfertility. *Cochrane Database Systematic Reviews*, CD001838.
  
  - Youn, JS., Cha, SH., Park, CW., Yang, KM., Kim, JY., Koong, MK., Kang, IS., Song, IO. y Han, SC. (2011). Predictive value of sperm motility characteristics assessed by computer-assisted sperm analysis in intrauterine insemination with superovulation in couples with unexplained infertility. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 38(1): 47-52.
  
  - Zegers-Hochschild, F., Adamson, GD., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., y Vanderpoel, S. (2009). International Committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*, 92(5): 1520-1524.
  
  - Zuzuarregui, JL., Meseguer, M., Garrido, N., Simon, C., Pellicer, A. y Remohi, J. (2004). Parameters affecting the results in a program of artificial insemination with donor sperm. A 12-year retrospective review of more than 1800 cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 21: 109-18.