

**ESTUDIO COMPUTARIZADO DE LOS PARÁMETROS
CINÉTICOS Y SU RELACIÓN CON LAS TASAS DE
GESTACIÓN EN INSEMINACIONES
INTRAUTERINAS CON SEMEN DE DONANTE Y DE
PACIENTE.**



Ángela Cantos García

Tutores: Iván Orozco y Joaquín Rueda

DEPARTAMENTO DE MEDICINA REPRODUCTIVA

Área de Andrología

Cuarto curso en Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso 2014-2015

Agradecimientos

Deseo, en primer lugar, expresar mi sincero agradecimiento a todo el equipo médico y técnico de la Clínica Tambre de Madrid, por haberme dado la oportunidad de desarrollar en sus instalaciones el presente proyecto. En especial a la doctora Rocío Núñez y al doctor Pedro Caballero, directores de la institución, por poner a mi disposición todos los recursos y facilidades necesarias para desarrollar este trabajo. A Patricia y Beatriz miembros del laboratorio de Andrología: a Clara, Susana, Leonor y Enrique del laboratorio de Embriología por su inestimable ayuda y excelente profesionalidad.

A mi tutor profesional, Iván Orozco, quien con su paciencia, tiempo y constante ayuda me ha permitido llevar este proyecto hasta el final.

Al doctor Andrés Guijarro, por su extensa e imprescindible ayuda en la elaboración estadística de este trabajo.

A mi tutor académico, profesor Joaquín Rueda, por su rápida disposición y ayuda cuando ha sido necesaria.

A mis padres, Maribel y Pepe, y a mi hermana Ana, por su constantes desvelos en conseguir para mí la mejor formación y educación.

A mis familiares y amigos, por el apoyo constante e incondicional que me han dado durante todo el período de mi formación universitaria.

Al doctor José Luís Palma, por su apoyo durante tantos años, tanto en lo profesional como en lo personal y afectivo, y por su tenaz empeño en marcarme siempre el camino.

A toda la gente que me quiere y que, de una manera o de otra, han contribuido en algún momento de mi vida a alcanzar lo que siempre deseé.

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract	5
2. Introducción.	7
3. Antecedentes y objetivos:	14
3.1 Antecedentes:.....	14
3.2 Objetivos:	14
4. Materiales y Métodos:	16
4.1 Diseño del estudio:	16
4.2 Datos clínicos y de laboratorio:.....	16
4.3 Parámetros estudiados:.....	16
4.4 Protocolo de capacitación del semen:.....	17
4.5 Parámetros cinéticos antes y después de capacitar.	20
4.6 Análisis estadístico utilizado:.....	23
5. Resultados y discusión:	25
5.1 Análisis de los resultados en función de la procedencia del semen.	25
5.2 Análisis de los resultados en función de la técnica de capacitación utilizada.	25
5.3 Análisis de los resultados en función de la edad de la mujer.....	27
5.4 Análisis de los resultados en función del grado de estimulación ovárica.	30
5.5 Análisis de los resultados en función del recuento de espermatozoides móviles (REM)	32
5.6 Análisis de los resultados en función de los parámetros cinéticos obtenidos.....	33
6. Conclusión y proyección futura:	40
Bibliografía:	42
ANEXO I.....	45
DEFINICIONES Y TERMINOLOGÍA.....	45

ÍNDICE DE IMÁGENES:

ILUSTRACIÓN 1.	9
ILUSTRACIÓN 2.	10
ILUSTRACIÓN 3.	18
ILUSTRACIÓN 4.	19
ILUSTRACIÓN 5.	20
ILUSTRACIÓN 6.....	21
ILUSTRACIÓN 7.	22

ÍNDICE DE GRÁFICOS:

GRÁFICO 1.	25
GRÁFICO 2..	26
GRÁFICO 3..	26
GRÁFICO 4..	27
GRÁFICO 5.	28
GRÁFICO 6..	29
GRÁFICO 7..	29
GRÁFICO 8..	30
GRÁFICO 9..	30
GRÁFICO 10.	31
GRÁFICO 11..	31
GRÁFICO 12..	32
GRÁFICO 13.	32
GRÁFICO 14.	36
GRÁFICO 15.	38

ÍNDICE DE TABLAS:

TABLA 1.....	12
TABLA 2.....	33
TABLA 3.....	34
TABLA 4.....	34
TABLA 5.....	37

1. Resumen/Abstract

La exploración biológica de la fertilidad masculina debutó hace más de 300 años con el descubrimiento de Leeuwenhoek que dividió las existentes teorías preformistas en dos grupos: ovistas y animalculistas o espermatistas. La introducción de los métodos epidemiológicos a mediados del pasado siglo XX, asociado con la explosión biológica de la reciente tecnología, han permitido un progreso sustancial en la exploración de la infertilidad masculina.

El presente estudio es de carácter observacional, retrospectivo y longitudinal. Para la realización del mismo se seleccionaron y analizaron un total de 953 inseminaciones, de las cuales 611 son ciclos de IAC (inseminación artificial conyugal) y 341 son ciclos de IAD (inseminación artificial con semen de donante), recogiendo de cada una de las parejas una serie de parámetros que pudieran tener o no una influencia en la consecución de embarazo. De nuestros datos observacionales podemos concluir que la procedencia del semen, la edad de la mujer, el grado de estimulación ovárica, el análisis de la técnica de procesamiento seminal empleada, el REM (número de espermatozoides móviles progresivos por mililitro) obtenido tras la capacitación o el análisis cinético de la muestra, son factores pronósticos independientes de la probabilidad de embarazo en dicho ciclo.

Aunque el análisis cinético de las muestras seminales puede presentar cierta utilidad en la investigación básica, dado el diferente comportamiento del semen de donante respecto al de los varones de parejas infértiles, los parámetros analizados habitualmente carecen de utilidad clínica tanto en los ciclos de IAC como en los de IAD.

Palabras clave: inseminación, espermatozoides, movilidad, embarazo, capacitación.

The biological examination of male fertility has a long history, starting more than 300 years ago when the Leeuwenhoek's discovery divided the existing preformists theories in two groups: oovists and animalculists or spermatists. The introduction of new epidemiological methods in the middle of the past 20th century associated with the biological explosion of the recent technology, has allowed significant progresses in the research of male infertility.

The present study is retrospective and longitudinal with an observational character. To carry out this research project a total of 953 inseminations were selected and analyzed, 611 of which were IAC's cycles (artificial insemination with conjugal's semen) and 341 were IAD's cycles (artificial insemination with donor's semen), gathering from each couple a number of specific parameters that could meet or not decisive influence in the attainment of pregnancy. From our observational data we can conclude that: the semen origin, the woman age, the moment of fertilization, the stress and degree of ovary stimulation, the technology of seminal processing analysis used, the REM (number of progressive and mobile sperm per mililitre) obtained after the training or the kinetic analysis of the sample are forecasts independent factors of pregnancy probability in the previously mentioned cycle.

Although the kinetic analysis of the seminal samples can present certain usefulness in the basic investigation, in view of the different behavior of the donor's semen with regard to that of the males of infertile couples, the parameters analyzed usually show a lack of clinical usefulness so much in IAC's cycles as in those of IAD.

Key words: insemination, sperms, movility, pregnancy, capacitation.



2. Introducción.

La exploración biológica de la fertilidad masculina debutó hace más de 300 años (1677), con el descubrimiento por Antonio Van Leeuwenhoek que, observando el semen de un hombre con gonorrea descubrió "una multitud de animalculos vivos, progresando con un movimiento serpentiforme de la cola, y nadando a modo de una anguila".

El descubrimiento de Leeuwenhoek dividió las existentes teorías preformistas en dos grupos: ovistas y animalculistas o espermátistas, según concedieran más importancia al huevo o a los espermatozoides. Esta última opinión, que es la que predominaba, significaba una vuelta a las teorías de Esquilo. No en vano, el vocablo que actualmente se mantiene "espermatozoide", proviene del griego "Esperien", que significa sembrar, demostrando la influencia de tales teorías.

Sin embargo, no es hasta el año 1779 en que Spallanzani muestra que el licor seminal es esencial para la fecundación, y en 1856 Pringstein observa la penetración del espermatozoide en la célula femenina, cuando comienza a avanzar el conocimiento en el estudio del semen humano.

La introducción de los métodos epidemiológicos a mediados de siglo, asociado con la explosión biológica de la reciente tecnología, permite un progreso sustancial en la exploración de la infertilidad masculina, convirtiéndose el estudio estructural y funcional del espermatozoide (la espermiología) en una verdadera disciplina.

En 1929, Macomber y Sanders (1) reconocen que la concentración espermática puede ser útil para diferenciar varones fértiles e infértiles. Desde entonces, los investigadores han intentado establecer valores de referencia que identifiquen las muestras de semen en fértiles e infértiles. Desafortunadamente, la selección de un valor óptimo, aún hoy en día, permanece en discusión. Por ejemplo, en 1951 MacLeod y Gold (2) propusieron que el valor de 20 millones de espermatozoides por ml de eyaculado separa a varones fértiles de infértiles, mientras que en 1977 Smith y Steinberger propusieron el de 10 millones.

Hoy en día, a pesar de establecerse la primera cifra como límite entre normalidad y bajo número de espermatozoides, sabemos que valores por debajo de 20 millones pueden generar embarazo sin dificultad.

En el estudio de la pareja estéril, el análisis de semen es una de las pruebas básicas para la elaboración de un diagnóstico en reproducción. El estudio elemental del eyaculado, esto es: número de espermatozoides, movilidad y morfología son los parámetros iniciales fundamentales para conocer si la esterilidad es de origen masculino. Sin embargo, este estudio básico, para ser completo tiene que realizarse en profundidad y por personal especializado que pueda interpretar los datos que se analizan.

El término infertilidad está definido por la Organización Mundial de la Salud 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 podría aproximar el número de afectados en España en unas 900.000 parejas y alrededor del

10-15% de la población reproductiva mundial (3).

Debido a este gran impacto, existen técnicas como la reproducción asistida que ayudan a la reproducción humana en los casos de parejas infértiles.

La inseminación artificial es una de las técnicas más utilizadas por las parejas infértiles a pesar de sus bajas tasas de éxito (15-20%) y posibilidad de embarazos múltiples o riesgo de hiperestimulación ovárica (4).

La inseminación artificial se define como el depósito de espermatozoides en el tracto reproductivo de la mujer con la finalidad de conseguir una gestación. Esta técnica está indicada para parejas con buen pronóstico, es decir, jóvenes, con poco tiempo de búsqueda, sin alteraciones seminales importantes y sin alteraciones en las trompas o endometriosis.

Distinguimos dos grandes grupos dentro de la inseminación artificial:

I.A.C. ; inseminación artificial conyugal, realizada con semen del marido.

I.A.D ; inseminación artificial con semen de donante.

Actualmente, se utiliza la inseminación artificial intrauterina o I.U.I con el fin de reducir el efecto de factores tales como la acidez vaginal y la dificultad de atravesar el 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.

Sin embargo, en casos en los que la pareja se encuentre en situaciones con un prolongado tiempo de esterilidad, factores masculinos moderados y mujeres con endometriosis o factor tubárico, la Fecundación *In Vitro* es el tratamiento con mayor posibilidad de éxito en reproducción asistida y constituye la primera elección en la mayoría de los casos. Además, también podemos recurrir a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides o ICSI en situaciones graves de esterilidad, sobretodo en casos de infertilidad masculina.

El presente estudio retrospectivo, se ha centrado en los pacientes que se han sometido a una inseminación artificial, ya sea un ciclo de IAD o un ciclo de IAC.

Aunque es posible realizar la inseminación en el ciclo natural de la mujer, para incrementar las posibilidades de éxito es habitual estimular los ovarios de manera suave para confirmar la maduración de al menos 1, 2 ó incluso 3 folículos. Es por ello, que todo el tratamiento se controla mediante ecografías, las cuales nos permitirán saber cuando programar la inseminación. Aún así, las posibilidades de éxito de esta técnica rondan el 15-20% en cada intento. Una vez conseguido el embarazo, la probabilidad de embarazo múltiple está en torno al 15%.

El día de la inseminación, el cónyuge entrega una muestra de semen en laboratorio unas 2 horas antes de la inseminación, la cual es procesada (capacitación) para recuperar la mayor cantidad de espermatozoides móviles y concentrarlos en un volumen pequeño de medio de cultivo enriquecido en azúcares (0.3-0.4ml). Posteriormente, este volumen de muestra es introducido a través de una cánula de inseminación en la cavidad uterina, evitándose

así el largo recorrido que de forma natural deberían realizar desde la vagina a la trompa, lugar donde se produce la fecundación óvulo-espermatozoide. El proceso es indoloro y se realiza en cuestión de minutos. La paciente es dada de alta con la indicación de tomar progesterona para mejorar las posibilidades de éxito, hasta la realización de la prueba de embarazo, que en caso de dar positivo, deberá seguir tomando (5).

Como mínimo, se debe de disponer de al menos 5 millones de espermatozoides por ml con movilidad progresiva para realizar la inseminación. No obstante, si tras 3-4 ciclos de inseminación no se consigue embarazo, la probabilidad de conseguir el embarazo mediante esta técnica desciende estadísticamente y por tanto se aconseja cambiar a Fecundación *In vitro* (5).

Una de las propiedades más importantes desarrolladas por los espermatozoides es su capacidad para moverse. Los espermatozoides son capaces de exhibir diferentes patrones de movimiento adaptados a sus necesidades funcionales. Así, los espermatozoides eyaculados, dentro del plasma seminal muestran unas trayectorias lineales que son las que fisiológicamente mostrarían al penetrar en el moco cervical. Una vez que el espermatozoide abandona el plasma seminal e inicia su ascenso por el tracto reproductivo femenino, sus características de movilidad cambian. Cuando se produce la capacitación, o a lo largo de este proceso, aumenta la amplitud de la onda flagelar, originándose trayectorias que se muestran con un mayor desplazamiento lateral de la cabeza. En estas condiciones, el espermatozoide se dice que se encuentra en un estado "transicional" (6). Cuando tiene lugar verdaderamente la capacitación, la amplitud de la onda flagelar comienza a hacerse asimétrica, dando lugar a un movimiento no progresivo y vigoroso conocido como hiperactivación (*imagen 1 y 2*). Así, esta forma de movilidad es típica de los espermatozoides totalmente capacitados, y se piensa que proporciona las fuerzas necesarias para que el espermatozoide pueda atravesar la zona pelúcida. En un trabajo publicado por Murray y Smith, en el que se estudiaba la influencia de las células apicales de la trompa en la movilidad y capacitación espermáticas, se comprobó que este contacto, similar al que ocurre "*in vivo*", mantiene durante más tiempo la movilidad espermática, aumentando la velocidad progresiva y retrasando la capacitación.

Fig. 1

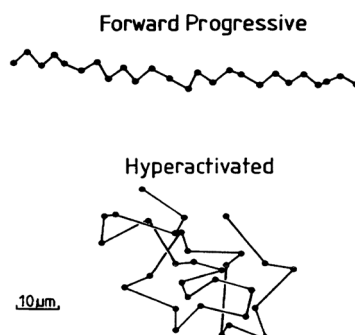


Ilustración 1. Muestra una representación esquemática de la motilidad normal o "avance progresivo" en relación con la motilidad hiperactivada. La imagen inferior muestra un típico movimiento de espermatozoides hiperactivados denominado *star-spin* (movimiento de estrella). (Modificado de Mortimer & Mortimer, 1990).

Journal of Andrology · July/August 1992

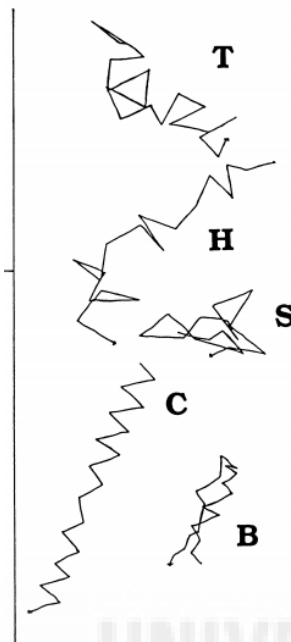


Ilustración 2. La imagen representa el análisis individual del movimiento de los espermatozoides hiperactivados; *T - thrashing*, *H-helical*, *S-starspin*, *C-cicling-highcurvature*, *B-biphasic*.

En vista de los cambios de movilidad espermática en los distintos hábitats necesarios para alcanzar la fertilización, se ha llegado a la conclusión de que este atributo de conducta debe ser de extrema importancia. Sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo, la movilidad espermática sólo se consideraba desde el punto de vista cuantitativo, analizándose el porcentaje global de espermatozoides móviles progresivos. Ya hemos visto como la movilidad en el plasma seminal solamente nos interesa hasta que los espermatozoides llegan al moco cervical. Aquí se comprueba la importancia del análisis espermático con espermatozoides seleccionados y no con el eyaculado completo. El estudio de la movilidad espermática, por lo tanto, para que tenga valor diagnóstico debe realizarse con espermatozoides seleccionados, esto es, tras un test de capacitación espermática (recuperación de espermatozoides móviles).

Clasificación de los espermatozoides móviles:

- Movilidad activa de grado 3 (+++) o categoría a:

El movimiento espermático de traslación es rápido, rectilíneo y cuantitativamente más importante que el desplazamiento lateral de la cabeza.

- Movilidad activa de grado 2 (++) o categoría b:

El movimiento espermático de traslación es progresivo, pero cuantitativamente menor que en la movilidad activa de grado 3 y con frecuencia no rectilíneo.

- Movilidad activa de grado 1 (+--) o categoría c:

El movimiento de traslación es mínimo o inexistente y de amplitud semejante al desplazamiento lateral de la cabeza y cola.

- Movilidad de grado 0 o categoría d:

Espermatozoides inmóviles.

La OMS aconseja aceptar una muestra de semen como normal en lo que se refiere a movilidad espermática, cuando al menos el 32% de los espermatozoides están dotados de movilidad progresiva (grado 3 + grado 2) o cuando haya un mínimo de un 40% de espermatozoides con movilidad total (7).

Se denomina astenozoospermico el semen cuyos espermatozoides tienen una movilidad inferior a la referida.

Estudio computarizado de la movilidad:

La utilización de la movilidad espermática como herramienta de diagnóstico ha hecho posible el desarrollo de sistemas computarizados de análisis de imagen (sistemas CASA), que puedan proporcionar una información veraz y rápida sobre las trayectorias espermática (8). Tales sistemas, tienen que usarse con cuidado para asegurar que las medidas recogidas son seguras y de verdad reflejan las características de movilidad reales en la población que se está analizando. Factores tales como la concentración espermática, deben estar dentro del rango del instrumento; las características de la cámara en la cual los espermatozoides están siendo analizados, no deberían impedir el movimiento con gran amplitud de la batida flagelar, para permitirnos analizar la hiperactivación; la temperatura debe mantenerse constante en todo momento para que todas las medidas que se realicen sean comparables. Teniendo tales consideraciones en mente, una revisión de la literatura más reciente demuestra que los sistemas CASA, como veremos más adelante, generan información relevante sobre la capacidad fertilizadora de los espermatozoides (9).

Los sistemas CASA pueden analizar el movimiento flagelar o el de la cabeza. En el primer caso se analiza: amplitud de la onda flagelar, velocidad de propagación de la misma y frecuencia de batida. Estos parámetros sólo se obtienen por los sistemas más sofisticados y son de utilidad investigadora, más que clínica, por lo que no mencionaremos más sobre ellos.

El análisis de movimiento referido a la cabeza espermática estudia los siguientes parámetros:

Velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y velocidad media (VAP). Cada una de estas tres velocidades describe un aspecto diferente de la progresión espermática. Además, la linealidad, rectitud, desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de batida (BCF) son parámetros analizados por el sistema CASA.

Estos parámetros, junto al porcentaje de espermatozoides móviles por mililitro (espermatozoides rápidos (VL>30 m/sg), moderados (VL<30 y >10 m/sg) y lentos (VL<10 m/sg) así como el total del eyaculado, definen perfectamente las características de la movilidad espermática.

Hasta el momento, los valores considerados normales por la OMS utilizando como autoanalizador el Hamilton Thorn, a 37°C, vienen representados en la siguiente Tabla:

Espermatozoides rápidos (VL>30 m/sg)	>30%
Espermatozoides moderados (VL<30 y >10 m/sg)	>20%
Movilidad (espermatozoides con VL>10 m/sg)	>50%
Velocidad lineal media (VL)	>35%
Velocidad rectilínea media (VR)	>30%
Media del índice de linealidad (IL)	>80%
Media del desplazamiento lateral de la cabeza	>2 m y >4 m

Tabla 1. Análisis objetivo de la movilidad espermática con el analizador de imágenes HTMA



3. Antecedentes y objetivos:

3.1 Antecedentes:

Existen escasos estudios acerca de la relación entre la cinética espermática y las tasas de gestación.

En un estudio realizado por el grupo de la Clínica Tambre (10), quisieron comprobar la relación entre tasa de embarazo y parámetros cinéticos en una población de varones en programa de Inseminación artificial intrauterina. Compararon los parámetros cinéticos (VCL, VSL, LIN y AHL) entre las muestras de semen de los varones que habían conseguido gestación y los que no, en el día de la inseminación. No encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros cinéticos excepto en el desplazamiento lateral de la cabeza ($p < 0,5$), que aumentaba en los casos de gestación. En base a estos resultados, realizaron un estudio en el que mantenían una alícuota del semen capacitado durante 6 horas, y compararon igualmente el AHL en los casos con y sin gestación. Comprobaron que existía un pico de hiperactivación medio a las 3 horas de incubación en los casos en los que se conseguía embarazo, con un mayor AHL.

Según otros autores, el único factor de movilidad relacionado con el éxito de fecundación in vitro es la hiperactivación (11), en consonancia con los resultados que el grupo de la Clínica Tambre obtuvo en inseminación artificial.

En un estudio realizado (12), se llegó a la conclusión de que únicamente el porcentaje y la concentración de espermatozoides móviles mostraban un valor predictivo para la fertilidad de los hombres en la población general.

Algunos de estos estudios (13) (14) relacionan parámetros cinéticos seminales con una probabilidad de embarazo mayor, sin establecer una relación significativa entre ambos.

3.2 Objetivos:

En vista de los controvertidos y poco concluyentes datos publicados, relativos a la relación existente entre los parámetros cinéticos seminales y su probabilidad de gestación, en el presente trabajo, se pretende evaluar si alguno de los parámetros estudiados tuviese o no alguna relación en la consecución o no de embarazo, teniendo en cuenta la baja y variable tasa de éxito que tiene esta técnica con respecto a otras. Los objetivos principales de este estudio son:

- ✓ A partir de un análisis estadístico de todos los datos obtenidos a través del sistema CASA, evaluar si hubiese alguna relación entre los parámetros cinéticos estudiados con la probabilidad de embarazo.
- ✓ Evaluar la posible relación de los demás parámetros considerados en este estudio (tales como edad de la paciente, técnica de capacitación utilizada, REM obtenido etc...) con la probabilidad de embarazo.



4. Materiales y Métodos:

4.1 Diseño del estudio:

Se trata de un estudio observacional, retrospectivo y longitudinal. Para la realización del mismo se recogieron datos durante el periodo de tiempo comprendido entre enero de 2011 y mayo de 2014, correspondientes a los ciclos de inseminación realizados en la Clínica Tambre de Madrid.

Se seleccionaron y analizaron un total de 953 inseminaciones, de las cuales 611 son ciclos de IAC (inseminación artificial conyugal) y 341 son ciclos de IAD (inseminación artificial de donante).

4.2 Datos clínicos y de laboratorio:

Los datos clínicos y analíticos de los pacientes de este estudio, fueron recogidos de las historias clínicas informatizadas y en papel a través del programa interno de historias clínicas y del servicio de registro de la Clínica Tambre.

4.3 Parámetros estudiados:

En este estudio retrospectivo, se han valorado y recogido para cada una de las parejas una serie de parámetros que pudieran tener o no una influencia en la consecución de embarazo:

- ✓ **Tipo de inseminación:** Se han clasificado los tratamientos en inseminaciones con semen conyugal (IAC) o con semen de donante (IAD).
- ✓ **Diagnóstico:** obtenido de la paciente y su pareja (si la tuviera) después del estudio previo al que se sometió antes de iniciar el tratamiento. (Terminología detallada en la introducción)
- ✓ **Edad** de la mujer.
- ✓ **Estimulación:** suma de las unidades internacionales (U.I) de medicación que la paciente tuvo que aplicarse para la estimulación hormonal.
- ✓ **Número de folículos:** Es el número de folículos ≥ 17 mm que se visualizan ecográficamente en el ovario antes de la aplicación de la h-CG para provocar la maduración ovocitaria.
- ✓ **Técnica de capacitación utilizada:** Técnica de Swim-up o técnica de Gradientes de Densidad.
- ✓ **R.E.M:** Número de espermatozoides móviles progresivos por mililitro que se obtienen tras la capacitación de las muestras previo a la inseminación de la paciente.
- ✓ **Parámetros cinéticos:** Estos valores se obtienen tras el cálculo que realiza el sistema computarizado denominado CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), tanto en la muestra de semen de inicio como en la muestra de semen capacitada.
- ✓ **Test de embarazo:** Es el resultado positivo o negativo del test de orina que se realizan las pacientes 17 días después del último día de inseminación.

4.4 Protocolo de capacitación del semen:

Con el fin de que los espermatozoides sean funcionales, deben separarse lo más pronto posible del plasma seminal. La exposición prolongada de los mismos con los fluidos seminales hace que descienda considerablemente la movilidad y viabilidad. Hay que tener en cuenta que nos referimos al comportamiento del espermatozoide "*in vitro*", de manera que la acción del plasma seminal difiere de la que se le confiere en el entorno fisiológico.

Con frecuencia se utiliza el término de "espermatozoides capacitados" al referirnos a espermatozoides lavados e incubados con medio de cultivo, esto es, imitando las condiciones de capacitación "*in vivo*". Sería más correcto referirnos a selección espermática o recuperación de espermatozoides móviles (R.E.M.), ya que la capacitación espermática es un complejo proceso en el cual tienen lugar una serie de modificaciones en el espermatozoide, no siempre discernibles. Las condiciones empleadas "*in vitro*" tratan de emular las fisiológicas con la retirada del plasma seminal y resuspensión de espermatozoides en medios que permitan la supervivencia y capacitación, pero, realmente, no podemos asegurar que la población de espermatozoides seleccionada se encuentre capacitada y sea capaz de fertilizar un ovocito (18).

Existen actualmente numerosas técnicas de recuperación espermática. El lavado de los espermatozoides por centrifugación-sedimentación y posterior suspensión-incubación en medio de cultivo, es probablemente el método más rápido y eficaz. Entre ellos, los más ampliamente utilizados son el "swim-up" y los gradientes de densidad (15).

Las muestras de semen se obtienen mediante masturbación después de 3-5 días de abstinencia del paciente. Estas muestras son recogidas en botes etiquetados con la identificación del paciente y son procesadas en el laboratorio de andrología de la clínica Tambre. Se esperan aproximadamente 15-20 minutos antes de realizar cualquier procedimiento con las muestras, para que estas se licuen. Si este procedimiento no surte efecto, se aspira el semen mecánicamente con pipetas Pasteur.

Una vez licuadas las muestras seminales, se mide el volumen de eyaculado y se toman 6 μ l para analizar la concentración y motilidad espermática inicial, con la cámara de Mackler, que se sitúa bajo el microscopio óptico. Esta cámara contiene un cuadrado de 1 mm subdividido en 10 cuadrados de ,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 Mackler (16).

Para capacitar la muestra seminal, existen dos técnicas distintas:

- ✓ **SWIM UP** : Es la técnica de elección en el caso de muestras en fresco , no excesivamente filante y/o que no presenten abundante celularidad (*Imagen 3*). (5).

-En un tubo Falcon (14 ml) se deposita el volumen de la muestra que se considere oportuno (todo el volumen en caso de inseminaciones o un volumen concreto en caso de seminogramas) a no ser que sea hiperespermica , en cuyo caso se divide en dos alícuotas.

-Se añade a la muestra de semen, el mismo volumen de medio de lavado (Sperm preparation médium ®) se homogeniza bien y se centrifuga durante 10 minutos a 1600 rpm o 5 minutos a 2000 rpm.

-Acabada la centrifugación, se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur evitando que toque el sedimento formado. Sobre el pellet se añade con cuidado un volumen entre 0,3-0,5 ml de medio de cultivo (Universal IVF Medium ®) previamente gaseado y se deja incubando en estufa de CO₂ a 37°C durante 1 hora. El volumen añadido de medio irá en función de la concentración inicial de la muestra.

-Transcurrida una hora, se recoge un volumen entre 0,3-0,5 ml de medio con jeringa de 1 ml sin tocar el sedimento y se deposita en un tubo estéril.

-Por último, analizamos la muestra con 6µl de muestra capacitada en la cámara Makler y valoramos concentración, movilidad y parámetros cinéticos (Sistema CASA).



Ilustración 3. Técnica de capacitación Swim up.

- ✓ **GRADIENTES DE DENSIDAD:** Es la técnica de elección en el caso de muestras congeladas, muy filantes o con abundancia de restos celulares (*Imagen 4*). (5).

-Los gradientes se forman a partir de Sperm-grad® y medio de cultivo Sperm-prep®, así el gradiente al 90% está formado por 9 ml de Sperm-grad® y 1 ml de medio de cultivo Sperm-prep® y el gradiente de 45 % está formado por 4,5ml de Sperm-grad® y 5 ml de Sperm-prep®.

-En un tubo cónico se añade 1,5 ml de gradiente al 90% y 1,5 ml de gradiente al 45% observándose claramente las 2 fracciones. Seguidamente se añade la muestra de semen (máximo 3 ml de muestra) observándose las tres fracciones bien definidas. Se centrifuga 30 minutos a 120 rpm.

-A continuación se retiran las dos primeras fracciones y las dos bandas con una pipeta bulbo por una pared del tubo; posteriormente y con rapidez se retira el pellet formado con una pipeta Pasteur.

-El sedimento recuperado se pasa a otro tubo Falcon , se añaden entre 0,5 y 1 ml de medio de lavado Sperm preparation médium ® y se centrifuga 10 minutos a 1600 rpm o 5 minutos a 2000 rpm.

-Por último se retira el sobrenadante formado y se añaden 0,3-0,4 ml de medio de cultivo (IVF®) en el que se resuspenderá el sedimento.

-Se mantiene en estufa de CO₂ a 37°C durante 5 minutos y a continuación se valorará la muestra, atendiendo a los mismos parámetros que con la técnica de Swim up.

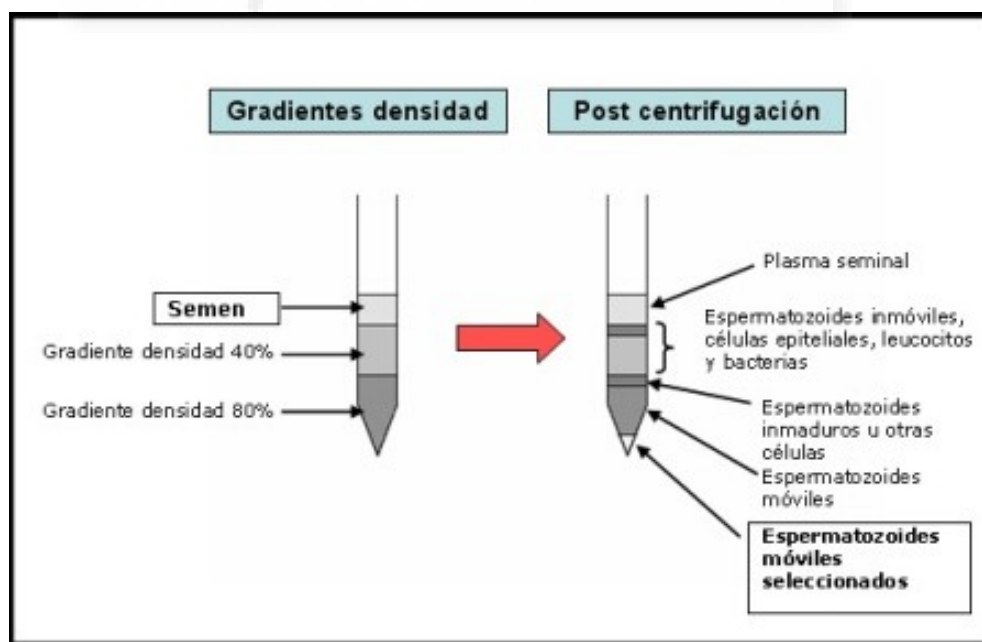


Ilustración 4. Esquema gráfico de un gradiente de densidad discontinuo

4.5 Parámetros cinéticos antes y después de capacitar.

La utilización de la movilidad espermática como herramienta de diagnóstico ha hecho posible el desarrollo de sistemas computarizados de análisis de imagen (Sistemas CASA) , que puedan proporcionar una información veraz y rápida sobre las trayectorias espermáticas (17). Estos sistemas son capaces de evaluar la concentración, movilidad y parámetros cinéticos de los espermatozoides. Sin embargo en la clínica Tambre, únicamente se hace uso de este sistema computarizado para obtener los valores cinéticos antes de después de capacitar la muestra de semen.

El equipo necesario para la captura y análisis de la cinética espermática consta de: microscopio de contraste de fases , cámara de video y equipo informático. En la clínica Tambre, disponemos en concreto del programa ISAS (Integrated Semen Analysis System).




Ilustración 5. *Integrated semen analysis system*

Las muestras de semen recogidas (en fresco o descongeladas), se valoraron a través del microscopio óptico, obteniendo los valores de volumen, concentración y movilidad espermática de cada una de las muestras (5).

A continuación se evaluaron los parámetros cinéticos con el sistema CASA (ISAS) , obteniendo los valores de inicio siguiendo los procedimientos de laboratorio de la Clínica Tambre de Madrid. Posteriormente, tras la capacitación de las muestras de semen (Swim up o Gradiente de Densidad) ,se volvieron a evaluar los parámetros cinéticos y se obtuvieron los valores de REM y de movilidad de las muestras capacitadas.

El procedimiento que se llevó a cabo para obtener los parámetros cinéticos antes y después de capacitar la muestra de semen, fue el siguiente:

- Se homogeneizó la muestra de semen. Se tomaron 6 μ l de muestra en un portaobjetos , atemperando el mismo previamente a la lectura de la imagen.
- Se capturaron y analizaron diferentes campos microscópicos .
- Una vez que se realizaron las capturas necesarias, se anotaron los valores obtenidos en la plantilla de trabajo.



DR. CABALLERO PEREGRÍN, S.L.
C/ Tambre, 8
28002 Madrid
Telf. 914116111
Fax. 914116297
http: www.clinicatambre.com

INSEMINACIÓN INTRAUTERINA

NOMBRE: _____
 EDAD: _____ Hª: _____ Nº ciclo: _____ Nº intento: _____
 Procedencia: _____ DIAGNOSTICO: _____
 TIPO DE CICLO: _____ Folículos ≥ 17mm: _____
 IAC Estimulación: _____ Nº ampollas: _____
 IAD Ciclo espontáneo Pico de LH: _____ hrs
 Ciclo inducido Estimulación: _____ Nº ampollas: _____
 Donante: _____ Fecha cong. 1º día: _____ Fecha cong. 2º día: _____
 1º DÍA FECHA: _____ 2º DÍA FECHA: _____

CONDICIONES INICIALES		CONDICIONES INICIALES	
Realizado	Volumen:.....	CINÉTICA	Volumen:.....
	Nº espermatozoides/ml	VCL _____	Nº espermatozoides/ml
	Movilidad total	VSL _____	Movilidad total
	Movilidad progresiva	VAP _____	Movilidad progresiva
	Observaciones:.....	LIN _____	Observaciones:.....
	Método capacitación: _____	STR _____	Método capacitación: _____
Realizado	POST-CAPACITACIÓN	CINÉTICA	POST CAPACITACIÓN
	Volumen:.....	VCL _____	Volumen:.....
	Nº espermatozoides/ml	VSL _____	Nº espermatozoides/ml
	Movilidad total	VAP _____	Movilidad total
	Movilidad progresiva	LIN _____	Movilidad progresiva
	Observaciones:.....	STR _____	Observaciones:.....
INSEMINACIÓN:		INSEMINACIÓN:	
Todo bien <input type="checkbox"/> Sangre <input type="checkbox"/> Rebosa semen <input type="checkbox"/> Frydman <input type="checkbox"/> Tracción <input type="checkbox"/> Difícil <input type="checkbox"/> Observaciones:.....		Todo bien <input type="checkbox"/> Sangre <input type="checkbox"/> Rebosa semen <input type="checkbox"/> Frydman <input type="checkbox"/> Tracción <input type="checkbox"/> Difícil <input type="checkbox"/> Observaciones:.....	
Firma Dr. _____		Firma Dr. _____	

Pag.1 - Inseminación artificial V.2. 09/02/2010




Ilustración 6. Plantilla de trabajo de la Clínica Tambre, donde se anotan los datos precisos para los estudios.

El análisis del movimiento referido a la cabeza espermática estudia los siguientes parámetros:

- ✓ **Velocidad:** se utilizan tres valores para la descripción de la movilidad (*Imagen 7*).
 1. Velocidad curvilínea (VCL): es la distancia que atraviesa el espermatozoide a lo largo de su trayectoria y se calcula como la suma de distancias a lo largo del tiempo.
 2. Velocidad rectilínea (VSL): se determina calculando la distancia en línea recta entre el primer y el último punto en el recorrido de un espermatozoide.
 3. Velocidad lineal (VAP): nos indica la longitud de una trayectoria espermática.

- ✓ **Índice de Linealidad (LIN):** es una expresión de la relación entre la proyección bidimensional de la trayectoria de un espermatozoide y el espacio ganado , calculado como $VSL / VCL \times 100$.

- ✓ **Índice de rectitud (STR):** da la indicación de la relación entre el espacio ganado y la trayectoria general del espermatozoide, calculado como $VSL/ VAP \times 100$.
- ✓ **Índice de oscilación (WOB):** Mide la oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio, calculado como el cociente $VAP/ VCL \times 100$.
- ✓ **Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH):** Es la magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza con respecto a su trayectoria promedio. Se expresa como desplazamiento promedio.
- ✓ **Frecuencia de batida (BCF):** Promedio de la frecuencia (en el tiempo) con que la trayectoria curvilínea cruza la trayectoria promedio.

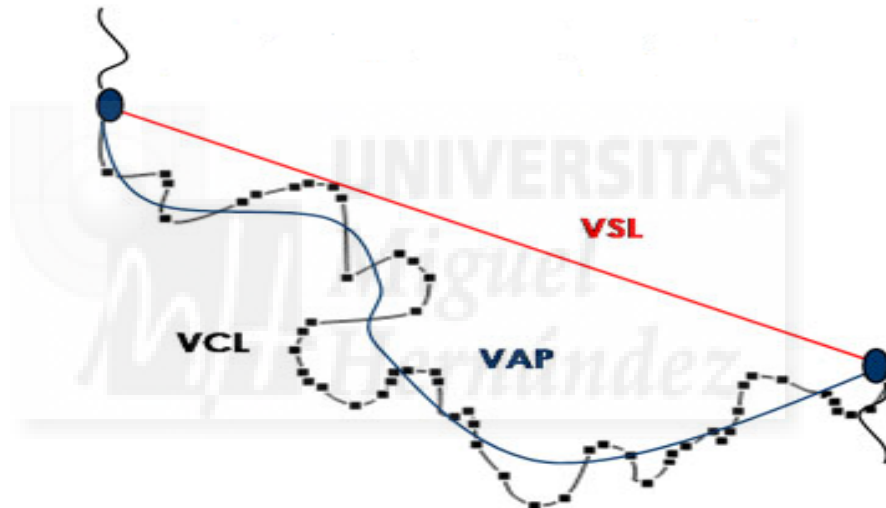


Ilustración 7. Esquema representativo de las diferentes trayectorias del espermatozoide.

4.6 Análisis estadístico utilizado:

El análisis estadístico se realizó con el programa informático IBM SPSS Statistics v20.0 para Mac sobre OSX. El diseño de gráficas se realizó con este mismo software y con Numbers v3.2.

La comparación de porcentaje de eventos en muestras binarias o nominales se realizó mediante el test Chi cuadrado, mientras que la comparación de medias de variables métricas se realizó mediante el test T de Student para muestras independientes.

En el caso de variables ordinales, se empleó tanto el test de linealidad de Chi cuadrado como el test T de Student para muestras independientes.

El test de regresión logística binaria multivariante se realizó con inclusión y eliminación manual de las variables y de la constante, en el modelo en función del valor del test de Wald y su significación estadística ($p < 0,05$). Para evaluar el porcentaje de varianza explicado por el modelo se empleó el test de Nagelkerke.

En la reducción de dimensiones mediante análisis factorial de componentes principales, exploramos varias opciones, optando finalmente por un modelo fijo de dos componentes principales con rotación Varimax, utilizando el método de regresión para el cálculo final del valor de los componentes principales.

En todos los casos se especificó el valor exacto de significación estadística, considerando como umbral de la significación una $p < 0,05$





5.Resultados y discusión:

Analizamos 946 ciclos completos consecutivos de inseminación artificial entre enero de 2011 y junio de 2014 sin criterios de exclusión, salvo la cancelación del ciclo por motivos clínicos antes de la inseminación.

5.1Análisis de los resultados en función de la procedencia del semen.

De los 946 ciclos analizados, 609 (64,3%) se realizaron con semen conyugal (IAC) y 338 ciclos (35,7%) con semen de donante (IAD).

Mediante un test de chi cuadrado, como se puede observar en el *gráfico 1*, confirmamos la diferencia de resultados entre ambos grupos, con un 14,9% de embarazos en la IAC y un 26,0% en las IAD ($p<0,001$).

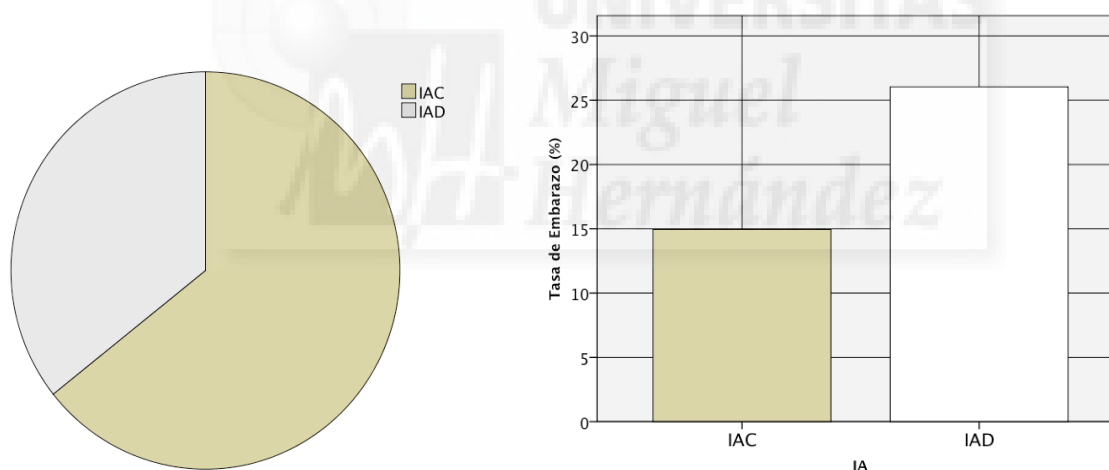


Gráfico 1. Resultados gráficos de la frecuencia de embarazo en función de la procedencia del semen.

5.2Análisis de los resultados en función de la técnica de capacitación utilizada.

En 348 ciclos (un 36,75% del total) el semen se procesó con SwimUp y en los otros 599 ciclos (63,25%) mediante Gradientes.

La tasa de gestación conseguida en los ciclos en los que se procesó la muestra seminal mediante Gradientes fue significativamente mayor que la de los procesados con SwimUp (21,4% vs 14,7%. Chi cuadrado, $p:0,011$)

Sin embargo el uso de una u otra técnica guarda una estrecha relación con la procedencia de la muestra seminal (Chi cuadrado, $p > 0,001$), de tal modo que mientras que en las IAC se usaron ambas técnicas casi con igual frecuencia (45,6% Gradientes vs 54,4% SwimUp), en los ciclos e IAD se usó casi exclusivamente Gradientes (95% de los ciclos).

Teniendo en cuenta este importante factor de confusión, observamos en el *gráfico 2* que en los ciclos de IAC las tasas de embarazo con cada una de las técnicas de procesamiento seminal son similares (15,5% con Gradientes vs 14,5% con SwimUp. Chi cuadrado, $p: 0,739$), mientras que en los ciclos de IAD, pese a la importante diferencia de las tasas de gestación con una y otra técnica (26,5% con Gradientes vs 14,9% con SwimUp), el escaso número de ciclos de IAD procesados con SwimUp hace que dicha diferencia no sea estadísticamente significativa y no podamos afirmar que se obtienen mejores resultados con una u otra técnica (Chi cuadrado, $p: 0,312$)

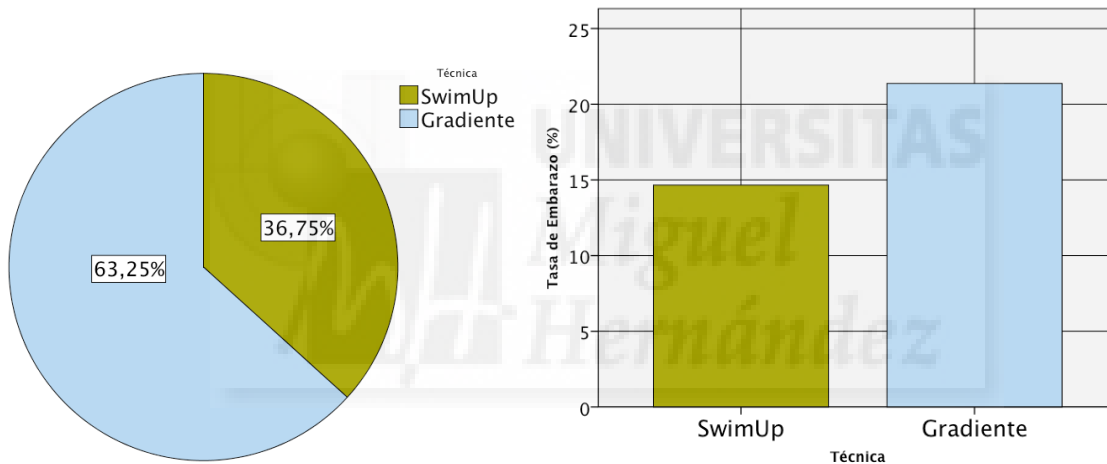


Gráfico 2. Probabilidad de embarazo en función de la técnica de capacitación utilizada.

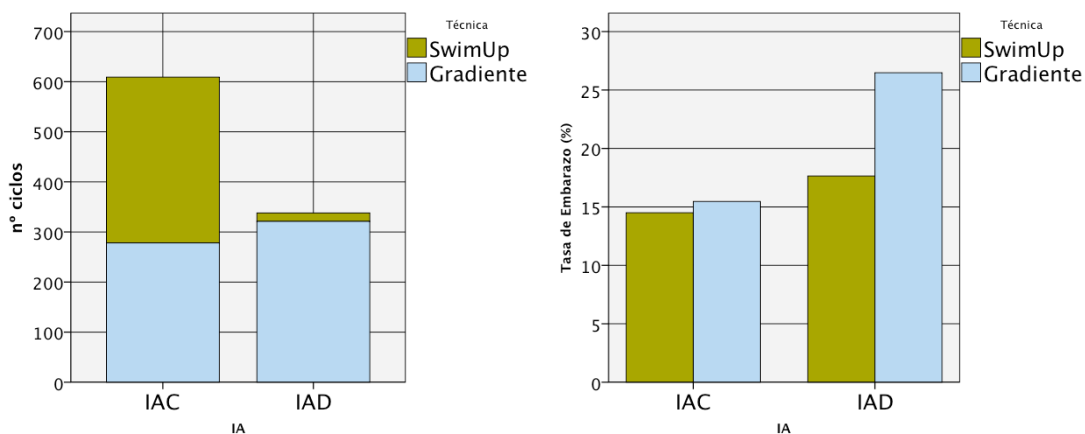


Gráfico 3. Técnica utilizada en función de la procedencia del semen y su consecuente probabilidad de embarazo.

El análisis anterior, representado en el *gráfico 3*, nos muestra que los ciclos de IAD con Gradientes ofrecen unas tasas de gestación significativamente superiores al resto. Aunque la experiencia nos permite afirmar que de los dos factores (procedencia y procesado del semen) es el primero el determinante en dicha mayor tasa de gestación, el simple análisis por clústers con Chi cuadrado no permite afirmarlo con tal rotundidad, siendo compatible con la hipótesis alternativa de que los ciclos de IAD tuviesen mejores resultados por el hecho de utilizar en ellos con mayor frecuencia la técnica de Gradientes y que fuese realmente ésta la que proporcionase unas mayores tasas de gestación. Para determinar de forma inequívoca el valor pronóstico específico de cada una de las dos variables teniendo en cuenta el sesgo de la otra, realizamos una regresión logística binaria multivariante con ambos factores (procedencia y procesado del semen) como variables independientes.

El resultado nos muestra claramente la importancia de la procedencia del semen con independencia de su técnica de procesado (test de Wald:10,419 p:0,001), mientras que el procesado no ofrece diferencias significativas si tenemos en cuenta el factor de confusión de la procedencia del semen (test de Wald: 0,373 p:0,541)

5.3 Análisis de los resultados en función de la edad de la mujer.

La edad de las pacientes estuvo en un rango comprendido entre 22 y 45 años con una media y mediana de 35 años.

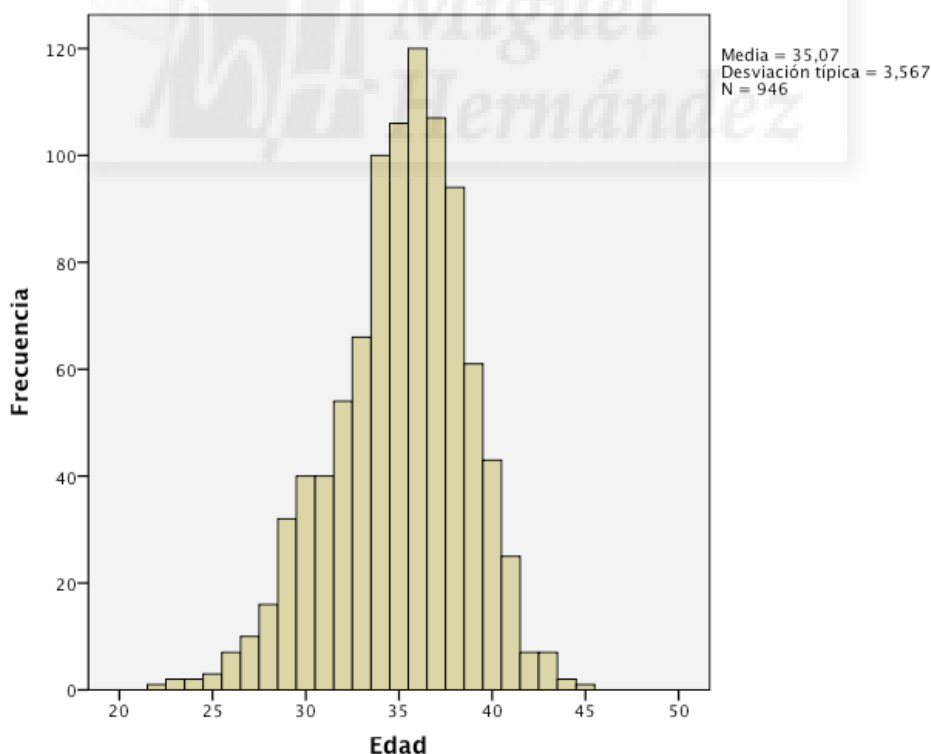


Gráfico 4. Gráfica que recoge las edades de las pacientes sometidas al estudio.

Mediante una comparación de medias de muestras independientes con el test T de Student (*gráfico 5*) no encontramos diferencias entre la media de edad de las pacientes que consiguieron embarazo y las que no lo hicieron. 34,87 vs 35,12 años. $p:0,391$

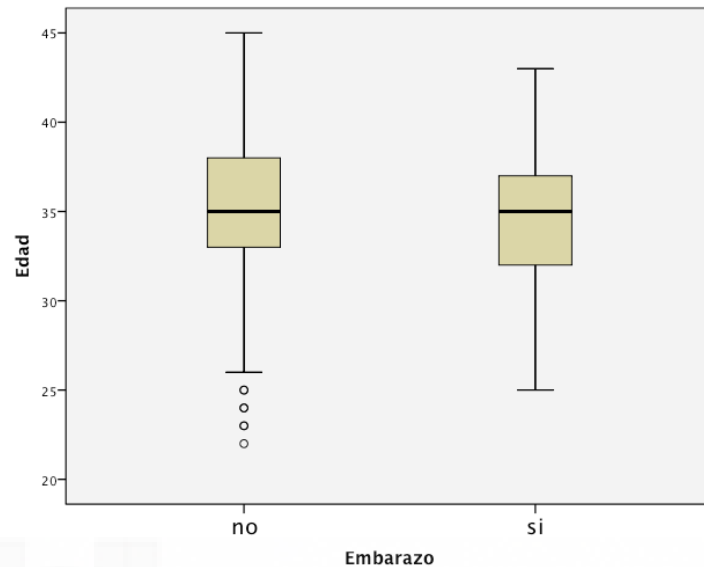
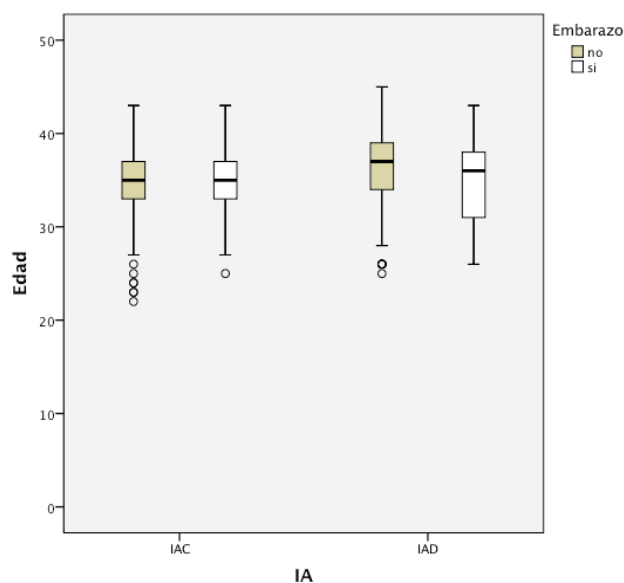


Gráfico 5. Comparación de medias de muestras independientes para observar las diferencias entre la media de edad de las pacientes que consiguieron embarazo y las que no lo hicieron.

La media de la edad de la paciente fue distinta en cada uno de los grupos (IAC e IAD), confirmada dicha diferencia de edades con el test de T de Student: 34,51 años en el grupo de IAC y 36,07 años en el de IAD ($p<0,001$)

El análisis por clústers (IAC e IAD) con el mismo test (T de Student) nos permite comprobar como la edad no supuso un factor pronóstico significativo en el grupo de IAC (34,77 años en el grupo con embarazo vs 34,47 años en el grupo sin embarazo. $p:0,405$), mientras que sí lo fue en el grupo de IAD (34,97 vs 36,46 años. $P:0.004$)



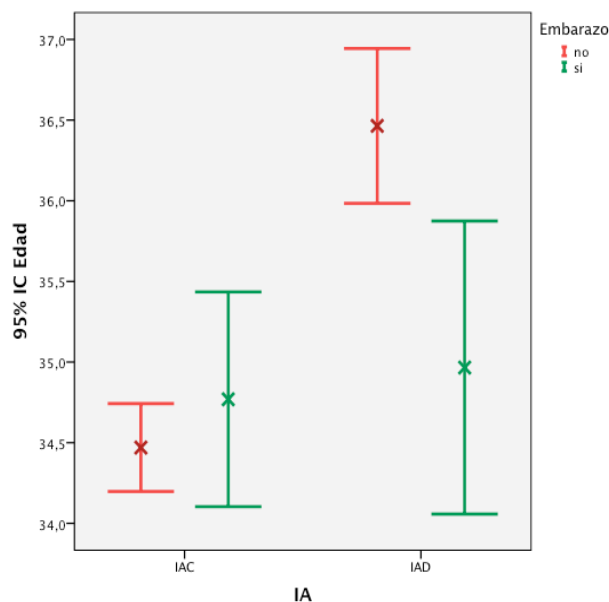


Gráfico 6. Análisis por Clusters para comprobar si la edad es o no un factor pronóstico significativo en la probabilidad de embarazo.

De modo similar a como determinamos la relación entre la procedencia y la técnica de procesado del semen sobre el pronóstico del ciclo, un test de regresión logística binaria multivariante nos permite determinar cual es la variable con influencia significativa sobre la tasa de gestación y cual simplemente un factor de confusión. Los ciclos de IAD ofrecen mayores tasas de gestación independientemente de la edad de la paciente (Test de Wald:19,875 $p < 0,001$), pero la edad es igualmente un factor determinante si tenemos en cuenta la procedencia del semen (Test de Wald:72,811 $p < 0,001$)

La siguiente gráfica (*gráfico 7*) representa la probabilidad de embarazo pronosticada por dicho modelo para las variables edad y procedencia del semen, siendo la variabilidad del resultado explicada por dicho modelo de un 47,2% de la variabilidad total (según R cuadrado de Nagelkerke $p < 0,001$).

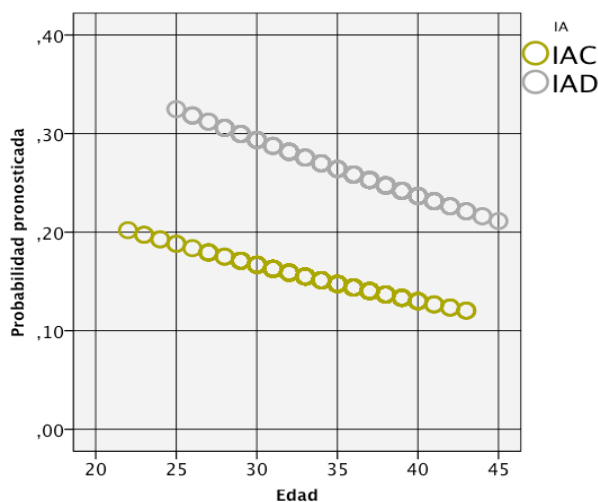


Gráfico 7. Gráfica que muestra la probabilidad de embarazo en función de la edad y procedencia del semen.

5.4 Análisis de los resultados en función el grado de estimulación ovárica.

Cuantificamos el grado de estimulación ovárica conseguido contabilizando ecográficamente el número total de folículos de más de 17 mm el día de la administración de hCG (*gráfico 8*).

La media fue de 1,46 folículos (mediana:1), obteniendo en un 88,3% de los ciclos 1 ó 2 folículos.

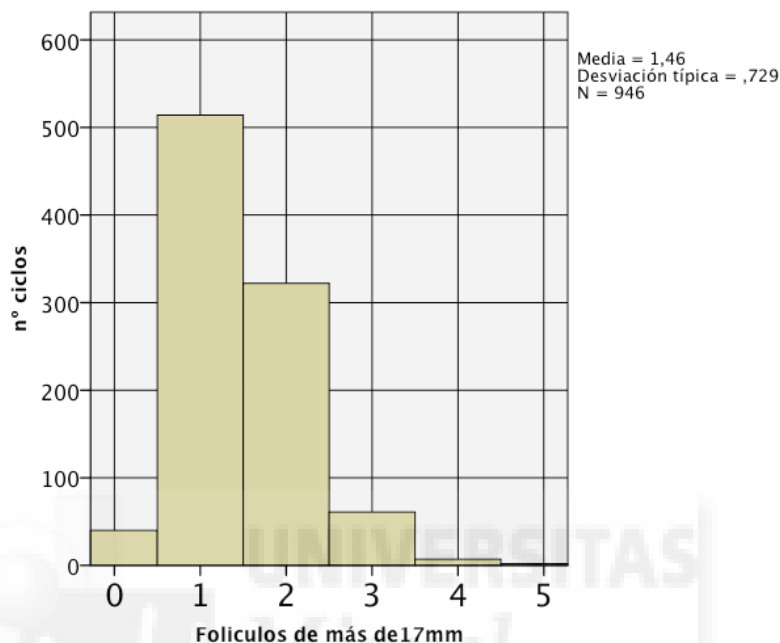


Gráfico 8. Frecuencia del número de folículos de más de 17 mm el día de la administración de hCG.

Encontramos una significativa correlación (*gráfico 9*) entre el grado de estimulación ovárica y la probabilidad de embarazo (T de Student de comparación de medias y Test de linealidad con Chi cuadrado en comparación de porcentajes, ambos $p:0,022$) con la obtención de una media de 1,57 folículos en el grupo con embarazo y 1,43 folículos en el grupo sin embarazo.

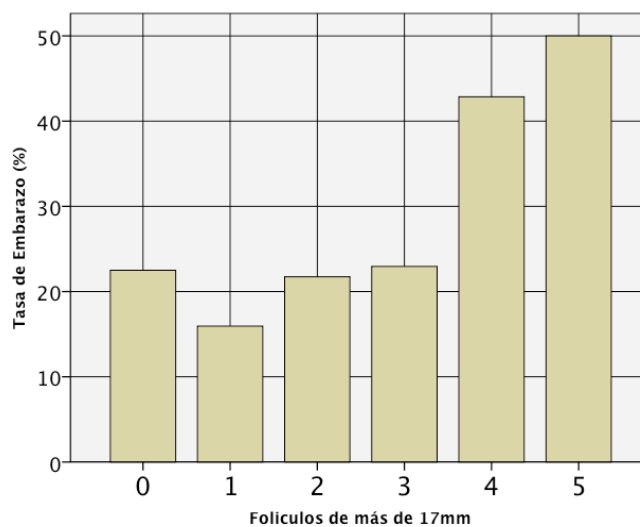


Gráfico 9. Correlación entre el grado de estimulación ovárica y la probabilidad de embarazo.

Aunque la diferencia en el grado de estimulación ovárica (*gráfico 10*) entre los ciclos de IAC (media:1,49 folículos) y los de IAD (media:1,40 folículos) no alcanza la significación estadística (T de Student, $p:0,059$), el test de chi cuadrado sí nos muestra que ambos grupos no son equiparables en la distribución de folículos obtenidos (Chi cuadrado, $p:0,012$)

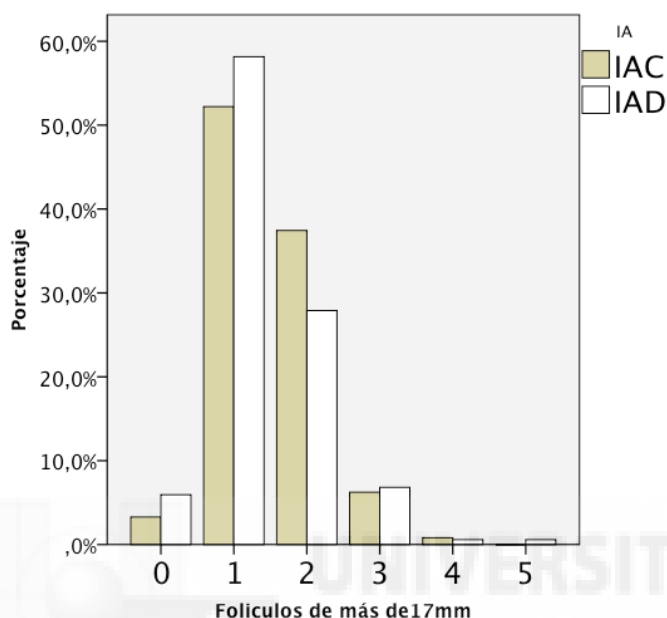


Gráfico 10. Diferencias de la distribución de folículos obtenidos entre los ciclos de IAC y los ciclos de IAD.

El test de regresión logística binaria multivariante (*gráfico 11*) nos confirma que procedencia seminal (Wald:22,602 $p<0,001$), edad de la mujer (Wald:52,187 $p<0,001$) y grado de estimulación ovárica (Wald:6,762 $p:0,009$) son factores pronósticos independientes entre sí de la probabilidad de éxito del ciclo de inseminación, explicando entre ellas tres el 47,8% de la probabilidad de embarazo (según R cuadrado de Nagelkerke, $p<0,001$), siendo ésta su representación gráfica:

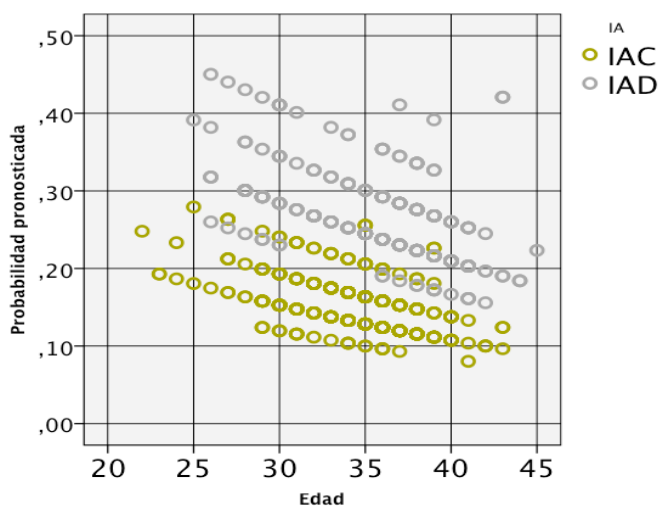


Gráfico 11. Representación gráfica donde se confirma que los parámetros estudiados hasta el momento son factores pronósticos independientes entre sí de la probabilidad de éxito del ciclo de inseminación.

5.5 Análisis de los resultados en función del recuento de espermatozoides móviles (REM)

El recuento de espermatozoides móviles (REM) en la muestra seminal tras la capacitación ofrece una distribución claramente asimétrica y alejada de la Normalidad, con una mediana (P50) de 29 millones y una media de 33,9 millones (DE:22,714), como podemos observar en el *gráfico 12*.

No encontramos diferencias en el REM (*gráfico 13*) en los ciclos con embarazo (REM:32,8 millones) y aquellos en los que no se consiguió (REM:34,16 millones). (T de Student, p:0,471)

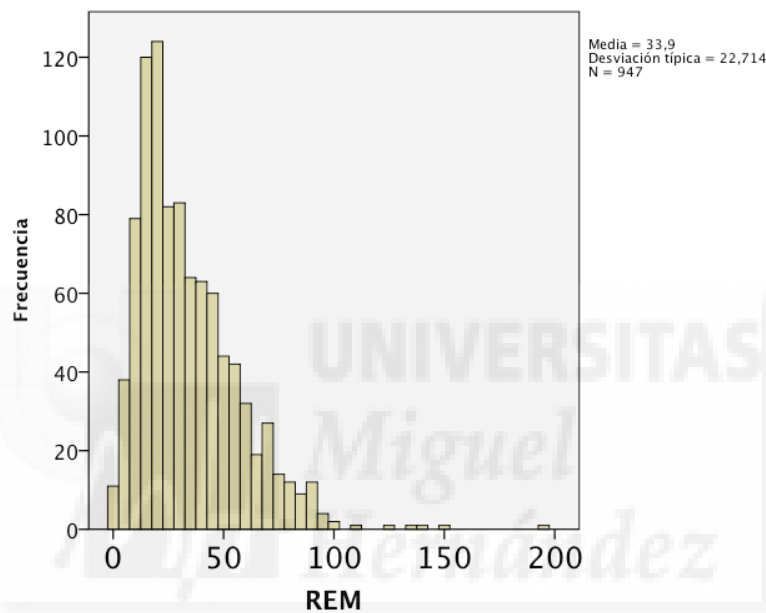


Gráfico 12. Distribución del recuento de espermatozoides móviles (REM) en las muestras seminales tras la capacitación.

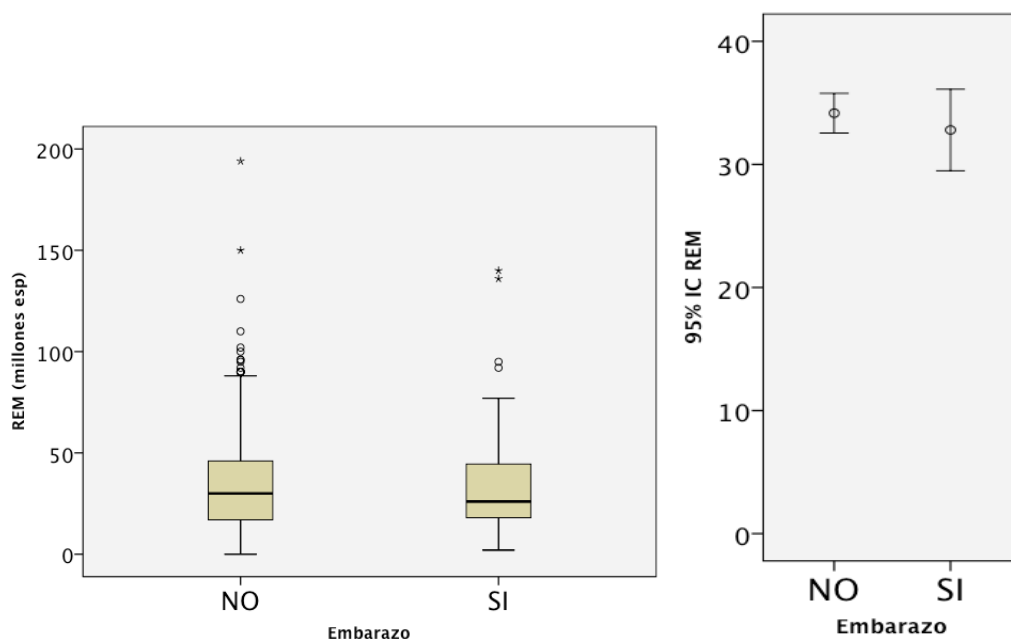


Gráfico 13. Diferencias en el REM en los ciclos con embarazo y aquellos que no se consiguió embarazo.

Sin embargo sí encontramos diferencias significativas en el REM obtenido en función de la técnica de procesamiento utilizada, con una mayor recuperación espermática al utilizar SwimUp (37,99 vs 31,53 millones. T Student, $p < 0,001$). dadas las interacciones existentes entre las distintas variables de confusión, encontramos también un distinto REM en función de la procedencia seminal (39,76 millones en IAC y 23,36 millones en IAD. T Student, $p < 0,001$) y una correlación significativa entre el REM y la edad de la paciente (Correlación de Pearson: -0,089 $p < 0,006$), no así respecto al grado de estimulación ovárica (Correlación de Pearson: 0,049 $p < 0,129$)

Dadas tales interacciones, para poder valorar el grado real de incidencia real del REM en la posibilidad de obtención de embarazo, recurrimos de nuevo al modelo de regresión logística binaria multivariante, encontrando que en presencia de los anteriormente descritos factores de confusión (procedencia seminal, edad de la mujer y grado de estimulación ovárica) el REM no guarda relación significativa con la probabilidad de embarazo ($p = 0,480$) ni aporta nada al modelo.

Podemos afirmar que a igualdad de edad y estimulación ovárica y teniendo en cuenta si se trata de una IAC o una IAD, la probabilidad de embarazo es independiente del REM obtenido tras la capacitación del semen.

5.6 Análisis de los resultados en función de los parámetros cinéticos obtenidos.

En el análisis cinético de la muestra en fresco (*tabla 2*), encontramos relación significativa ($p < 0,05$) con la probabilidad de embarazo únicamente en el caso de los valores de BCF (6,11 con embarazo vs 6,33 sin embarazo, $p < 0,034$)

En el análisis cinético de la muestra ya capacitada mediante T de Student encontramos una mayor probabilidad de embarazo en los casos con valores superiores de VSL (51,66 vs 49,62, $p < 0,040$), STR (0,83 vs 0,81, $p < 0,020$) o LIN (0,64 vs 0,61, $p < 0,022$) o con valores inferiores de ALH (1,96 vs 2,09, $p = 0,011$), sin que existan diferencias estadísticamente significativas en el resto de parámetros cinéticos analizados.

			VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	STR	LIN	WOB
total	fresco	embarazo	51,54	24,72	34,73	1,54	6,11	0,70	0,48	0,68
		no embarazo	52,62	25,44	35,48	1,59	6,33	0,72	0,49	0,68
		p	0,078	0,295	0,549	0,220	0,034	0,848	0,212	0,456
	capacitado	embarazo	82,29	51,66	61,98	1,96	8,83	0,83	0,64	0,76
		no embarazo	82,95	49,62	61,04	2,09	8,78	0,81	0,61	0,74
		p	0,572	0,040	0,299	0,011	0,569	0,020	0,022	0,075

Tabla 2. Parámetros cinéticos de las muestras en fresco y capacitadas y su relación con la probabilidad de embarazo

Sin embargo, como hemos visto en el caso de las variables analizadas anteriormente, la procedencia seminal es un importante factor de confusión dada su importante influencia en la posibilidad de embarazo, y, como vemos a continuación mediante T de Student (*tabla 3*), su estrecha relación con las características cinéticas del semen, tanto en fresco como tras su capacitación:

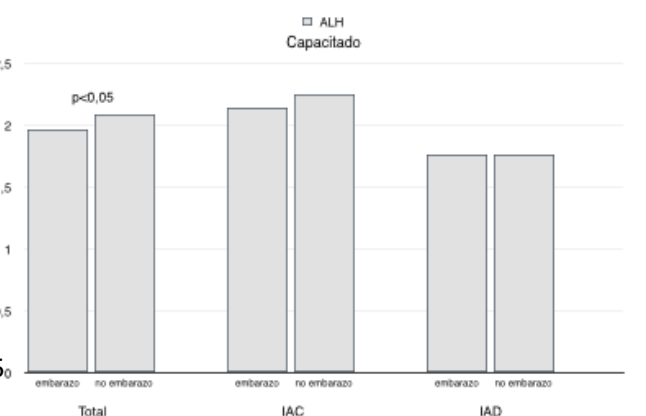
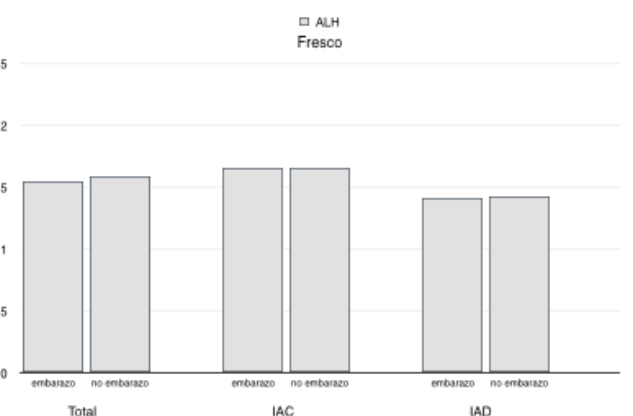
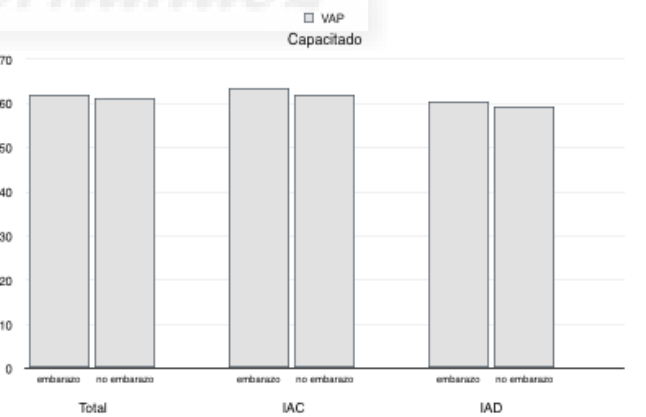
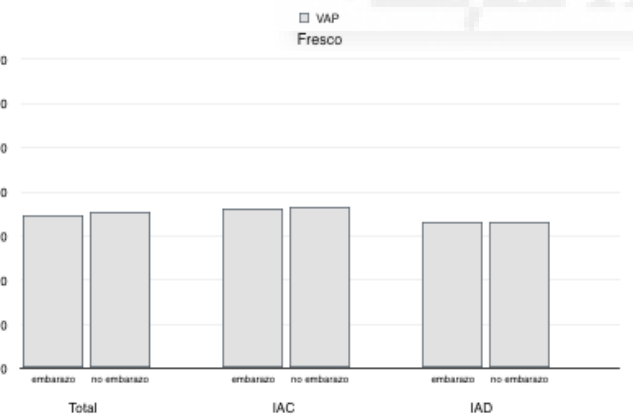
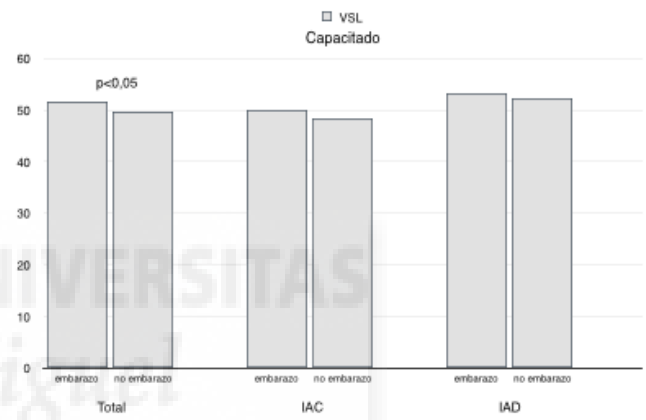
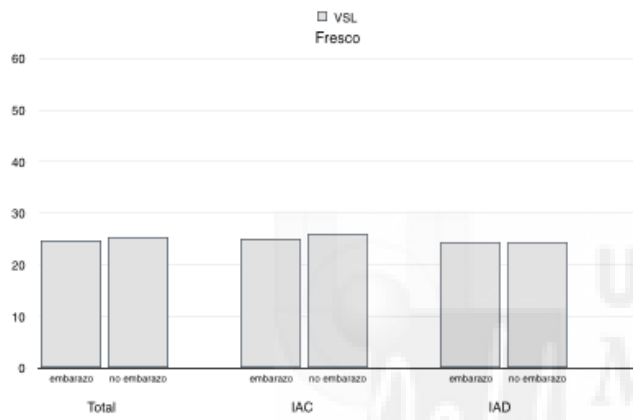
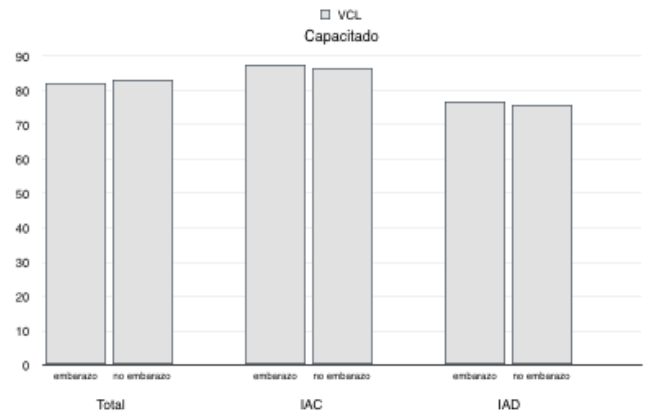
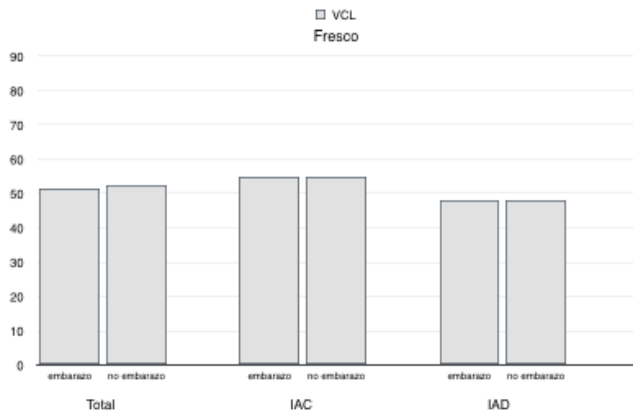
		VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	STR	LIN	WOB
fresco	IAC	54,69	25,77	36,54	1,66	6,42	0,71	0,47	0,67
	IAD	48,14	24,42	33,03	1,42	6,03	0,73	0,51	0,69
	p	<0,001	0,008	<0,001	<0,001	<0,001	0,205	<0,001	0,016
capacitado	IAC	86,24	48,72	61,95	2,22	8,72	0,78	0,57	0,72
	IAD	76,21	52,32	59,56	1,76	8,94	0,87	0,69	0,78
	p	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	<0,001

Tabla 3. Relación de la probabilidad de embarazo y su procedencia seminal, atendiendo los parámetros cinéticos.

Confirmada dicha estrecha relación con el tipo de semen utilizado, antes de poder afirmar la utilidad de cualquier parámetro cinético en la determinación de la probabilidad de embarazo de un ciclo de IA nos vemos obligados a contrastarla por separado para los ciclos de IAC e IAD (*tabla 4*). Al hacerlo vemos como desaparece cualquier significación estadística entre los valores de cualquiera de los parámetros cinéticos y la probabilidad de embarazo:

			VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	STR	LIN	WOB
IAC	fresco	embarazo	54,86	25,15	36,29	1,66	6,24	0,68	0,46	0,66
		no embarazo	54,68	25,91	36,63	1,66	6,46	0,71	0,48	0,67
		p	0,875	0,383	0,698	0,885	0,154	0,401	0,139	0,298
	capacitado	embarazo	87,25	50,10	63,41	2,14	8,78	0,79	0,58	0,73
		no embarazo	86,27	48,44	61,79	2,25	8,7	0,78	0,57	0,72
		p	0,524	0,205	0,181	0,096	0,546	0,482	0,434	0,467
IAD	fresco	embarazo	47,87	24,24	33,01	1,41	5,96	0,72	0,51	0,69
		no embarazo	48,23	24,45	33,03	1,43	6,04	0,73	0,51	0,69
		p	0,741	0,832	0,981	0,739	0,666	0,541	0,850	0,760
	capacitado	embarazo	76,82	53,38	60,41	1,76	8,89	0,88	0,70	0,79
		no embarazo	75,92	52,13	59,45	1,76	8,94	0,87	0,69	0,79
		p	0,556	0,411	0,488	0,970	0,716	0,575	0,701	0,807

Tabla 4. Análisis por separado de los ciclos de IAC y los ciclos de IAD.



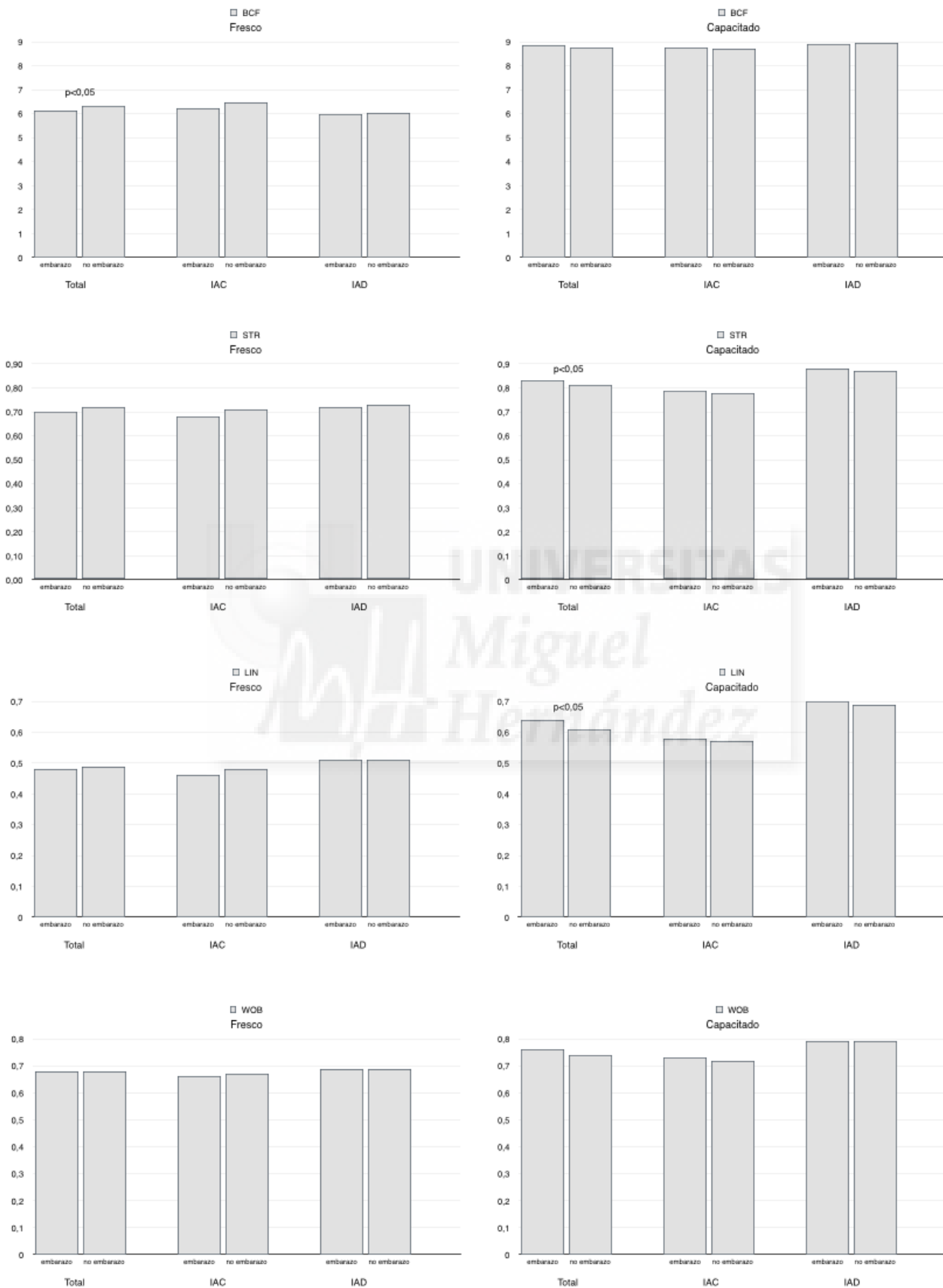


Gráfico 14. Análisis de cada una de las variables cinéticas tanto en ciclos de IAC como ciclos de IAD y en muestras en fresco y capacitadas en relación con la probabilidad de embarazo.

Dado que en el análisis previo de las variables de confusión hemos visto que además de la procedencia seminal, la edad de la mujer y el grado de estimulación ovárica son factores pronósticos independientes entre sí, es necesario testar la influencia de los parámetros seminales bajo la influencia conjunta de estos tres factores de confusión.

Para ello hemos realizado un modelo de regresión logística binaria multivariante para cada uno de los parámetros cinéticos con la inclusión en el modelo de estas tres variables (*Tabla 5*). En todos los casos el cambio del parámetro cinético evaluado en el modelo ha mantenido la validez de la inclusión de dichas variables de confusión ($p < 0,01$) y en ninguno de los casos ha aparecido como estadísticamente significativa la inclusión en el modelo de la variable cinética.

El caso que en mayor medida se aproximaba a dicha significación estadística ($p: 0,089$) fue VSL y en dicho caso su inclusión al modelo tan solo aumentaba la proporción de variabilidad explicada por el modelo (mediante R cuadrado de Nagelkerke) en un 0,2%, pasando del 47,8% al 48,0%

	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	STR	LIN	WOB
test Wald	0,714	2,887	2,475	0,841	6,684	0,770	1,138	0,624
p	0,398	0,089	0,116	0,359	0,884	0,380	0,286	0,430

Tabla 5. Valoración de la incorporación al modelo de regresión logística mediante test de Wald para cada parámetro cinético.

Dada la estrecha correlación de todos los parámetros cinéticos analizados entre sí, confirmada mediante el test de correlación de Spearman, resulta dificultoso su inclusión conjunta en el modelo de regresión logística binaria multivariante.

Pero dada la posibilidad teórica de que el análisis de un sólo parámetro cinético aislado no fuese suficiente para una correcta caracterización de la movilidad espermática y que resultase de mayor utilidad su valoración conjunta e integral, procedimos a explorar la posibilidad de reducir sus dimensiones mediante la creación de perfiles cinéticos globales más allá de los parámetros calculados clásicos de STR, LIN y WOB. Para ello analizamos varios modelos de análisis factorial de componentes principales y el comportamiento de sus factores finales en relación con la probabilidad de embarazo, tanto de forma univariante como integrados en el modelo anterior de regresión logística multivariante.

El modelo de análisis factorial que mejor comportamiento ofreció fue uno de dos componentes principales con rotación Varimax (*Gráfico 15*) en el que se incluyeron como componentes iniciales todos los parámetros originales del semen capacitado (VCL, VSL, VAP, ALH y BCF). Con la reducción de estos cinco variables iniciales a dos factores finales independientes y perpendiculares entre sí recuperamos el 78,28% de la varianza

inicial y una representación de más del 80% de los valores iniciales salvo en el caso de BCF (con una extracción del 37,7%).

Los valores finales de los dos componentes principales extraídos responden a la capacidad de avance del espermatozoide y al grado de dispersión de su movimiento:

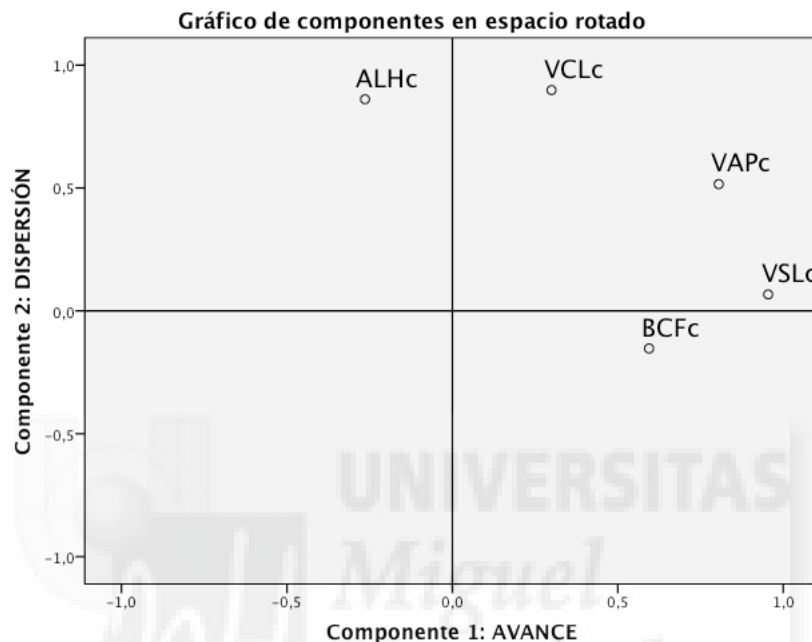


Gráfico 15. Análisis factorial para obtener una correcta caracterización de la movilidad espermática.

De los dos componentes principales obtenidos, el primero de ellos, relacionado con la capacidad de avance del espermatozoide, sí guarda una relación univariante significativa con la probabilidad de embarazo (0,148 vs -0,035, $p:0,027$). No así, el que determina su grado de dispersión (-0,095 vs 0,022, $p:0,157$).

Sin embargo en ambos casos existe una estrecha relación (T Student, $p<0,001$) con la procedencia del semen, encontrando un mayor avance y una menor dispersión en el semen de donante que en el de los pacientes, desapareciendo cualquier significación estadística en el análisis independiente para IAC e IAD.



6. Conclusión y proyección futura:

Podemos concluir que;

- ✓ Aunque el análisis cinético de las muestras seminales puede presentar cierta utilidad en la investigación básica, dado el diferente comportamiento del semen de donante respecto al de los varones de parejas infértiles, los parámetros analizados habitualmente carecen de utilidad clínica tanto en los ciclos de IAC como en los de IAD.
- ✓ La procedencia del semen (ya sea de donante o paciente), la edad de la mujer y el grado de estimulación ovárica (cuantificado como el número de folículos mayores de 17 mm obtenidos el día de la administración de hCG) son factores pronósticos independientes de la probabilidad de embarazo en dicho ciclo. Valoradas estas tres variables predictoras, el análisis de la técnica de procesamiento seminal empleada (SwimUp o Gradientes), el REM obtenido tras la capacitación o el análisis cinético de la muestra (en fresco o tras la capacitación) no aportan ninguna información relevante al pronóstico de la probabilidad de éxito de dicho ciclo.

Debido a los resultados obtenidos, los cuales concluyen la independencia de los factores estudiados con la probabilidad de embarazo y considerando el tamaño muestral utilizado suficiente para que sea un resultado válido, las proyecciones futuras con respecto a la relación de los parámetros cinéticos y la probabilidad de embarazo, son muy limitadas.

Sin embargo, es sorprendente la gran diferencia existente entre el comportamiento cinético que hay entre semen de donante y semen conyugal. A falta de estudios acerca de la posible causa de esta diferencia, podemos plantear la hipótesis de que se deba al distinto porcentaje entre muestras frescas o congeladas o a la diferencia de edad. Se podría plantear la posibilidad de iniciar nuevos estudios a cerca de la caracterización cinética de las muestras de semen de donante y conyugal, con el fin de que nos permita averiguar, por ejemplo, porqué el semen conyugal, morfológicamente normozoospermico según los estándares de la OMS, no alcanza las tasas de fecundación de IAD.

Se podrían mejorar los sistemas computarizados empleados con el fin de tener una mayor precisión en el conteo y el análisis cinético de los espermatozoides, así como las técnicas utilizadas para el procesamiento del semen. Además, sería conveniente continuar la investigación en busca de parámetros que tengan una estrecha relación con la probabilidad de embarazo en el tratamiento de IA, teniendo en cuenta su baja tasa de éxito (12% en ciclos de IAC) y (20% en ciclos de IAD).



Bibliografía:

1. Macomber, D. and Sanders M.B.: Spermatozoa count, its value in the diagnosis, prognosis and treatment of sterility. *New Engl. J. Med.* 200: 981, 1929.
2. MacLeod J, and Gold R.Z: The male factor in fertility and infertility: and analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril*, 2: 187, 1951.
3. B.Coroleu Lletget y J.M Bajo Arenas: Fundamentos de Reproducción. Panamericana 42-43 , 2009.
4. M^o Teresa Urbina y J.Lerner Biber. Fertilidad y Reproducción Asistida.Panamericana 343-348 , 2009.
5. Procedimientos del laboratorio de andrología de la Clínica Tambre, Madrid . Actualizado en Enero de 2014.
6. Robertson L, Eolf D and Tash JS. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod* 39, 797-805.1988
7. Burkman L.J., Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. In: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Claude Gagnon Eds., CRC Press, Boca Raton,. Fl., 1990.
8. Joshi N. The importance of computer assisted semen analysis and sperm function testing in an IVF program, *Int J Fertil Menopausal Stud.* 41:1, 46-52.1996
9. Núñez R, I. Vázquez, J. Alsina, S.Cortés, P.Caballero. Test de supervivencia espermática a las 24 horas de incubación, en muestras de IAC. XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Tenerife, 1996.
10. Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS and Aitken RJ. Prediction of the in vitro fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: the effect of the delay between testing and IVF. *Human Reproduc.*, 11, 1030-1034.1996.
11. L. Larsen. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population.,2000.
12. Shibahara H¹, Obara H, Ayustawati, Hirano Y, Suzuki T, Ohno A, Takamizawa S, Suzuki M. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility.*Int J Androl.* 2004 Apr;27(2):63-80.

13. Fréour T, Jean M, Mirallie S, Barriere P. Computer-assisted sperm analysis parameters in young fertile sperm donors and relationship with age. *Syst Biol Reprod Med.*, 2012.
14. Mortimer D, Courtot A.M. Giovangrandi Y, Jeulin C and David G. Human sperm motility after migration into and incubation in, synthetic media. *Gamete Res* 9, 131, 1984.
15. Mortimer S.T, Swan M.A, and Mortimer D. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. *Hum. Reprod*, 12, 1006-1012. 1994
16. Fréour T. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* ,2010.
17. Núñez R, I. Vázquez, A. Luengos, J. Alsina, P. Caballero. Comportamiento cinético espermático pre y post condiciones de capacitación. VI Congreso Nacional de Andrología, Vigo, 1993.





ANEXO I.

DEFINICIONES Y TERMINOLOGÍA

- **Reproducción médicamente asistida (RMA):** reproducción lograda a través de la inducción de ovulación, estimulación ovárica controlada, desencadenamiento de la ovulación, técnicas de reproducción asistida (TRA), inseminación intrauterina, intracervical o intravaginal, con semen del esposo/pareja o un donante.
- **Técnicas de Reproducción Asistida (TRA):** todos los tratamientos o procedimientos que incluyen la manipulación tanto de ovocitos como de espermatozoides o embriones humanos para el establecimiento de un embarazo. Esto incluye, pero no está limitado sólo a, la fecundación *in vitro* y la transferencia de embriones, la transferencia intratubárica de gametos, la transferencia intratubárica de cigotos, la transferencia intratubárica de embriones, la criopreservación de ovocitos y embriones, la donación de ovocitos y embriones y el útero surrogado.
- **Análisis del semen:**
 - ✓ **Examen macroscópico** donde se analiza: volumen, color, olor, aspecto, velocidad de licuación, viscosidad y pH.
 - ✓ **Examen microscópico:** donde se analiza: recuento espermático, movilidad espermática, test de vitalidad, morfología, test de permeabilidad de membrana, determinación de anticuerpos antiespermatozoides.
 - ✓ **Bioquímica del plasma seminal:** Determinación de fructosa y ácido cítrico, zinc y maltasa.
 - ✓ **Interpretación del seminograma:** Terminología y factores reproductivos que afectan a la fertilidad masculina.
 - ✓ **Recuperación de espermatozoides móviles(Capacitación) :**Swim up y gradientes de densidad.
 - ✓ **Test de supervivencia espermática:** Consiste en dejar la muestra de semen en fresco y capacitado a temperatura ambiente durante 18-24h y comprobar después, si existe movilidad espermática. Cualquier tipo de movilidad espermática con desplazamiento, se conoce como test de supervivencia positiva.
 - ✓ **Eyaculación retrógrada:** Consiste en el reflujo de los espermatozoides hacia la vejiga de la orina tras un estímulo sexual.

- **Astenozoospermia** : Movilidad espermática disminuida en el eyaculado (menos del 50% de espermatozoides totales móviles o menos del 25% con movilidad progresiva).
- **Azoospermia** : Ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
- **Blastocisto** : Embrión entre 5 y 9 días de la fecundación, que se implantará en el útero.
- **Capacitación espermática**: Cambios bioquímicos y fisiológicos que sufren los espermatozoides en su trayecto hasta el óvulo que los permiten ser capaces de poder fecundar.
- **R.E.M**: Número de espermatozoides móviles progresivos / ml.
- **Endometriosis** : Enfermedad crónica y benigna, que se caracteriza por la presencia de tejido endometrial en zonas ectópicas, produciendo menstruaciones internas y quistes de sangre menstrual en los ovarios.
- **Espermatozoide** : Célula germinal masculina.
- **Estradiol**: Hormona secretada por el trofoblasto del embrión, detectable en el plasma sanguíneo entre los días 8 y 10 después de la fecundación, que sirve como indicativo de embarazo.
- **Folículos**: Estructuras que contienen en su interior los óvulos u ovocitos
- **Gonadotropina coriónica (hCG)**: Hormona que secreta el ovario como consecuencia de la acción de las gonadotropinas.
- **Hiperactivación**: Movilidad que adquieren los espermatozoides cuando están en las cercanías del ovocito o capacitados, caracterizada por trayectorias erráticas, gran velocidad, y alto desplazamiento lateral de la cabeza.
- **EOD**: Esterilidad de origen desconocido.
- **Implantación**: Fijación del embrión en estado de blastocisto al endometrio materno.
- **Mórula**: Embrión de más de 10 células
- **Oligozoospermia**: Concentración de espermatozoides por debajo de 20 millones por ml en el eyaculado.
- **Ovocitos**: óvulos o células germinales femeninas
- **Ovogénesis**: Proceso de formación de los ovocitos o células germinales femeninas
- **Ovogonias**: Células germinales femeninas inmaduras.
- **Seminograma**: Análisis de semen. Prueba que se realiza en el estudio de esterilidad masculino, con el que se comprueba básicamente el número, movilidad y morfología de los espermatozoides.
- **Edad**: Se considera un factor negativo en mujeres >37 años.
- **SOP**: Síndrome de ovario poliquístico. Síntomas que acompañan a la enfermedad de ovario poliquístico.
- **Ovario poliquístico**: Enfermedad metabólica que se caracteriza por unos ovarios más lentos o “perezosos” en su funcionamiento, al tiempo que producen más hormonas masculinas.
- **Teratozoospermia**: Número de espermatozoides morfológicamente anormales en el eyaculado por encima del 70%.
- **Factor tubárico**: Trompas obstruidas.
- **BRO** : Baja respuesta ovárica.
- **FISH**: (Hibridación In Situ Fluorescente) : técnica citogenética que nos permite analizar parte de la dotación cromosómica de los gametos masculinos.