



Lígia Fernanda Previato de Araújo

**EFICÁCIA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA
PÓS-CAPACITAÇÃO E INCUBAÇÃO NA
PREDIÇÃO DE GRAVIDEZ APÓS
INSEMINAÇÃO INTRAUTERINA EM
INDIVÍDUOS NORMOSPÉRMICOS**

Botucatu

2012

Lígia Fernanda Previato de Araújo

**EFICÁCIA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA
PÓS-CAPACITAÇÃO E INCUBAÇÃO NA
PREDIÇÃO DE GRAVIDEZ APÓS
INSEMINAÇÃO INTRAUTERINA EM
INDIVÍDUOS NORMOSPÉRMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Adjunta Anaglória Pontes

Coorientador: Prof. Livre Docente Mário Cavagna

Botucatu
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Araújo, Lígia Fernanda Previato.

Eficácia da motilidade espermática pós-capacitação e incubação na predição de gravidez após inseminação intrauterina em indivíduos normospérmicos / Lígia Fernanda Previato de Araújo. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Anaglória Pontes

Coorientador: Mário Cavagna

Capes: 40101150

1. Espermatozóides. 2. Fertilização humana in vitro. 3. Sêmen. 4. Reprodução humana.

Palavras-chave: Análise seminal avançada; Inseminação intrauterina; Motilidade espermática; Sobrevivência espermática; Sucesso da inseminação intrauterina.

DEDICATÓRIA

Dedico esse mestrado a você, Edinho... meu amigo, pai, companheiro, parceiro de trabalho, meu namorado, meu marido... O homem da minha vida!

Obrigada por me apoiar e me incentivar; obrigada por me dar a mão e caminhar ao meu lado nessa estrada... Seu amor me deu forças... Você fez toda diferença!

Te amo muito.

Aos amores da minha vida... A melhor parte de mim... Léo e Bibi.

Vocês são minha inspiração para crescer; tornaram-me um ser humano melhor.

Depois de vocês, tudo fez sentido.

Amo, amo, amo...Infinitamente!!

Às minhas mães...

Sônia... por permitir que eu fizesse parte desse mundo e por acreditar, em algum momento, que um dia tudo daria certo.

Obrigada, mãe!

Vó... minha outra mãe.

Sem seus cuidados, eu não poderia estar hoje aqui.

Amo Muito vocês.

Ao meu vô, meu pai...

Sei que o senhor sempre se orgulhou de mim. Ao me ensinar a resolver problemas de matemática, com sua bondade e simplicidade, mostrou o quanto me amava.

Ao me levar para casa na garupa de sua bicicleta, mostrou o quanto cuidava...

Com isso, construí meu caráter.

Te amo muito, vô.

À Mariá... minha analista.

Para mim, é um privilégio tê-la em meu caminho; agradeço à vida por me permitir conhecer e aprender contigo.

Você é muito, muito especial pra mim!

À Márcia Talhari... mãe e amiga. Sempre acreditou em mim. Graças a seu acolhimento em momentos extremamente difíceis e dolorosos da minha vida, pude suportar e chegar até aqui.

Às crianças da minha vida:

Meu moranguinho... Ana Eloísa, minha doce Maria Elis, minha bonequinha Alissa, minha florzinha Amanda, meu relâmpago Luquinha, minhas princesas Bruna, Brenda, Giovana, Gaby e Bibí.

Meus adolescentes Pedro Lucca, Lucas, Vitor, João Marcelo, Matheus, Léo Gomes, Christian e Léo...

Obrigada por alegrarem meus finais de semana, deixando minha vida mais doce e...bagunçada!

À família que pude escolher:

Márcia Bossoni, minha irmã, amiga e parceira de trabalho.

A você devo em grande parte o que sou hoje... Você acreditou e acredita em mim! Meu trabalho só é completo se houver o seu. Obrigada por seus conselhos repletos de sabedoria e regados a muito amor.

Alessandra e Marcelo Silveira...irmãos e companheiros de tantos anos.

Obrigada pela presença em todos os momentos...tristes e alegres!

Elaine, muito obrigada pelo seu amor, obrigada pelos momentos presentes...

Obrigada por cuidar tão bem da minha família.

Iza., minha irmãzinha mais nova, cheia de sensibilidade e sabedoria.

Obrigada por revisar a tese no seu momento de descanso. Obrigada por caminhar junto comigo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus, pelo privilégio de trabalhar com o que amo e ajudar a trazer bebês a esse mundo.

À Dra. Anaglória Pontes, obrigada pela oportunidade que me deu de poder vivenciar uma Pós - Graduação em um lugar tão especial como a UNESP de Botucatu.

*Obrigada por disponibilizar uma parte de seu tempo tão escasso a mim.
Obrigada por tudo que me ensinou.*

*Paulo Matheus, a você devo tudo que sei em minha profissão.
Graças ao bom mestre que é, hoje posso caminhar sozinha!
Muito obrigada.*

Ao Cássio, meu companheiro no laboratório. Com sua chegada, meu trabalho ficou melhor. Obrigada por sua dedicação e respeito.

Ligiane, acredito que Deus cruzou nossos caminhos... Obrigada por dividir comigo seus conhecimentos e experiências. Obrigada pela sua grande colaboração nesse trabalho; ele também é seu.

*À D. Nara, que sempre me socorreu quando precisei ao longo desse mestrado.
Em muitos momentos, foi meu Anjo da Guarda! Obrigada pelo amor e atenção dados ao Léo e à Bibí.*

AGRADECIMENTOS

À minha tia Elza, Júlio, Nathy (minha “Pina”) e Bruna... Obrigada por estarem sempre presentes.

À Simone e, principalmente, à Teresa e à Andréa, muito obrigada pela prestatividade e respeito.

Sei que torceram muito para que esse trabalho desse certo. Obrigada por toda atenção e presença quando solicitei. Esse trabalho só foi possível ser iniciado com a ajuda de vocês.

Muito, muito obrigada.

Ao Juninho, agradeço o carinho e a atenção ao formatar todas minhas tabelas ao longo desse estudo.

Ao Dr. Velani, pela elaboração do Termo de Consentimento Livre Esclarecido e por fazer parte da nossa equipe.

Aos professores de estatística José Antonio Cordeiro e José Eduardo Corrente, pelo trabalho, atenção e paciência. Muito obrigada.

Às doutoras Regina Moura e Lígia Rugolo, meu muito obrigada pelas considerações feitas nesse trabalho durante a qualificação. Vocês fizeram toda a diferença. Obrigada pelo carinho.

Agradeço à Célia, do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, pelo respeito e atenção com que sempre me tratou.

À Janete, Supervisora da Seção Técnica da Pós-Graduação. Profissional de extrema competência. Agradeço o respeito com que me tratou e por todas as

vezes que esclareceu minhas dúvidas, sempre com muito profissionalismo e paciência.

Agradeço à Dra. Ana Gabriela, pela doçura e pela ajuda nos poucos encontros que tivemos... mas, para mim, sua participação foi muito significativa.

Agradeço aos casais que confiaram em nossa equipe e participaram desse estudo, contribuindo com a ciência para a obtenção de respostas, ajudando a tornar mais curto o caminho que leva ao tão sonhado filho.

EPÍGRAFE

“Mas na profissão, além de amar tem de saber. E o saber leva tempo pra crescer.”

Rubem Alves

Lista de abreviaturas e siglas

μ l	Microlitro(s)
BCE	Batimento cardíaco embrionário
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH-r	<i>Follicle stimulating hormone recombinant</i> / Hormônio Folículo Estimulante recombinante
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i> / Gonadotrofina coriônica humana
EOC	Estimulação ovariana controlada
IC	Intervalo de confiança
IUI	Inseminação Intrauterina
IM	Intramuscular
ISCA	Infertilidade sem causa aparente
mg	Miligrama(s)
MHz	<i>Megahertz</i>
M/ml	Milhão por mililitro
ml	Mililitro(s)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> / Curvas de Características de Operação do Receptor
rpm	Rotações por minuto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UI	Unidade Internacional
vpp	Valor preditivo positivo
vpn	Valor preditivo negativo
χ^2	Qui-quadrado

Resumo

Para saber quais casais de fato poderiam se beneficiar com a IIU, desenhamos esse estudo com o objetivo de avaliar se a motilidade espermática pós-capacitação em gradiente descontínuo de diferentes densidades e incubação em CO₂ em indivíduos normospérmicos é capaz de prever gravidez. Participaram do estudo 175 casais que foram submetidos à IIU. Os critérios de inclusão foram mulheres com idade inferior ou igual a 35 anos; com trompas sem alterações; endometriose Grau I e II; infertilidade sem causa aparente ou inexplicada; disfunção ovulatória não hiperandrogênica, e homens que apresentaram parâmetros seminais normais. Todas as pacientes foram submetidas à estimulação ovariana com Citrato de Clomifeno na dose de 50mg/dia, do 3º ao 7º dia do ciclo menstrual, associado à Gonadotrofina menopausal humana ou Hormônio Folículo Estimulante recombinante (FSH-r) no 3º, 5º e 7º dias do ciclo. O desenvolvimento folicular foi acompanhado pela ultrassonografia transvaginal e, quando um ou até três folículos medindo entre 18 e 20mm foram observados, foi administrado hCG ou hCG-r 250mg, e a IIU foi realizada 36-40h após hCG. Os parâmetros seminais foram analisados e classificados segundo os critérios da OMS de 2010. A capacitação espermática foi realizada utilizando a técnica de gradiente descontínuo de diferentes densidades. Uma alíquota de 20µl foi incubada por 24h a 37°C em 5% de CO₂. Após 24h de incubação, foi feita análise da motilidade total (progressão A+B) dos espermatozóides. Dos 175 casais, 52 obtiveram gravidez clínica e 123 não obtiveram êxito. A taxa de gravidez clínica foi de 29,7%. Houve também 4 abortos espontâneos (7,6%) e 1 gravidez múltipla (3,8%). Análises realizadas quanto a idade, duração e etiologia da infertilidade não mostraram diferenças estatísticas significantes entre os dois grupos (grávidas e não grávidas), assim como os resultados analisados quanto ao volume, concentração total de espermatozóides, total de espermatozóides móveis e morfologia, exceto a motilidade espermática, que mostrou diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p < 0,00001$). Na análise que compara a motilidade A+B logo após o preparo e 24h pós-incubação nos dois grupos (grávidas e não grávidas), os resultados mostraram que a motilidade A+B 24h pós-incubação foi maior no grupo das grávidas. A análise de motilidade espermática nas grávidas pós-preparo e 24h pós-incubação praticamente não mostrou alteração da motilidade com 24h pós-incubação, e, nos casais que não engravidaram, ocorreu diminuição significativa da motilidade espermática 24h pós-incubação ($p < 0,0001$). A curva ROC gerou valor de corte de 56,5% para motilidade progressiva A+B pós-incubação de 24h; esse valor produziu alta sensibilidade 96,1% (90,9-1,0%) e especificidade 92,7% (88,1-97,3%), valor preditivo positivo 84,7% (75,5-93,9%) e valor preditivo negativo 98,3% (95,9-1,0%). Concluiu-se que a determinação da motilidade dos espermatozóides de indivíduos normospérmicos após a capacitação e incubação em CO₂ a 37°C por 24 horas com valor de corte de 56,5% é capaz de prever o sucesso da IIU.

Palavras-chave: motilidade espermática; sucesso da inseminação intrauterina; inseminação intrauterina; sobrevivência espermática; análise seminal avançada.

Abstract

To assess what couples actually could benefit from IUI, we designed this study to evaluate the sperm motility through discontinuous gradient of different densities and incubation in CO₂ in normospermic individuals is able to predict pregnancy. A total of 175 couples underwent IUI and inclusion criteria were women with age 35 years or younger, with normal tube; endometriosis grades I-II; unexplained infertility; ovulatory dysfunction not hyperandrogenic and men with normal seminal parameters. All patients underwent ovarian stimulation used 50mg/day clomiphene citrate on days 3-7 of menstrual cycle, associated to human menopausal gonadotropin (hMG) or follicle stimulating hormone recombinant (FSH-r). The follicular development was monitored by transvaginal ultrasound. When one or two follicles measuring 18 and 20mm were observed, hCG or hCG-r 250mg was administered and IUI was performed 36-40h after hCG. Seminal parameters were analyzed and classified according to 2010 WHO criteria. Spermatic capacitation was performed using discontinuous concentration gradient. A 20µl aliquote was incubated for 24 hours at 37°C in 5% CO₂. The sperm concentration was adjusted to a total of 10x10⁶ motile sperm per milliliter of medium. After 24h incubation, it was performed total motility analysis (A+B). Of the 175 couples, 52 achieved clinical pregnancies and 123 did not have success. Pregnancy rate per cycle was 29.7%, there were 4 spontaneous abortions (7.6%) and multiple pregnancies (3.8%). Analysis of age, infertility duration and causes of infertility did not show statistic significance between pregnant and nonpregnant groups, as to results of seminal volume, total sperm concentration, total motile sperm and morphology, except sperm motility (p<0.00001). The comparison of motility A+B after processed and 24h after incubation between pregnant and nonpregnant group, motility A+B 24h after incubation was increased in the pregnant group. Analysis of sperm motility of pregnant group after processed and 24h after incubation have not shown motility difference with 24 after incubation, and couples who did not obtain pregnancy, there was statistically significant decreased of sperm motility 24h after incubation (p<0.0001). The ROC curve analysis generated cutoff value of 56.5% for motility with progression A+B, 24h after incubation and this cutoff value produced 96.1% sensitivity (90.9-1.0%), 92.7% specificity (88.1-97.3%), 84.7% positive predictive value (75.5-93.9%) and 98.3% negative predictive value (95.9-1.0%). We concluded that sperm motility of normospermic individuals 24h after incubation in CO₂ at 37°C with cutoff value of 56.5% is predictive of IUI success

Keywords: sperm motility; insemination successful; intrauterine insemination; sperm survival; advanced semen analysis

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	4
3. Material e Métodos.....	5
3.1- Casuística.....	5
3.2- Métodos.....	5
3.3- Análise Estatística.....	7
4. Resultados.....	9
5. Discussão.....	14
6. Conclusão.....	19
Referências Bibliográficas.....	20
Anexo A.....	27
Anexo B.....	29

1. INTRODUÇÃO

A inseminação intrauterina (IIU) é considerada um tratamento menos invasivo, com custo mais acessível e maior aceitabilidade, quando comparada a outros procedimentos com tecnologia reprodutiva mais avançada, como a Fertilização *in vitro* (FIV) (1). No entanto, tem suas indicações e deve ser aplicada somente se as chances de gravidez forem significativamente maiores do que o coito natural (2).

Existe uma variedade de indicações para a realização da IIU, tais como: infertilidade sem causa aparente (ISCA), anomalias congênitas do trato genital, disfunções eréteis, ejaculação retrógrada, anticorpos antisêmen, infertilidade inexplicada, disfunções sexuais femininas (vaginismo), fator cervical e infertilidade relacionada à endometriose (3-16).

As taxas de sucesso da IIU dependem de uma série de fatores, incluindo a causa e a duração da infertilidade, idade materna, realização ou não da estimulação ovariana controlada (EOC), tipo de medicação utilizada e número de tentativas realizadas anteriormente (17-18).

Por ser um tratamento muito utilizado, a adequada indicação da IIU é fundamental para uma boa taxa de gravidez. Para que este procedimento tenha sucesso, deve-se excluir causas como fator masculino severo, fator tubário, fator peritônio e endometriose severa (19).

Quanto ao número de tentativas de IIU, a literatura mostra que não existe consenso. Nos últimos 20 anos, várias recomendações têm sido feitas sobre o número máximo de ciclos de IIU que deveria ser realizado nas pacientes, tendo em vista que há falta de evidências de possível limite (20). De modo geral, o número de tentativas varia de duas a seis, já que a taxa de gravidez cumulativa ocorre até no máximo em seis ciclos de IIU. No entanto, a maioria dos casais obtém sucesso nas três primeiras tentativas (1, 21-28). Segundo Zhao et al. (29), o número de tentativas por paciente deveria ser individualizado, levando em consideração as necessidades de cada casal, com base tanto nos fatores masculinos como nos femininos.

A análise seminal é o primeiro fator a ser investigado em casos de infertilidade, por isso o sêmen é considerado um importante parâmetro na avaliação do casal infértil no tratamento da IIU. Com o espermograma, pode-se averiguar o potencial de fertilidade. O manual da Organização Mundial da Saúde (OMS), utilizado para análise do sêmen humano e

interação sêmen-muco cervical, é amplamente consultado como fonte de metodologia padrão para laboratórios que realizam análises de sêmen (30), porém apresenta limitações, pois as normas disponíveis para a análise de concentração, motilidade e morfologia do sêmen não preveem padrões clínicos técnicos e estatísticos rigorosos (31).

Por este motivo, devido às limitações existentes, a nomenclatura utilizada no Manual da OMS (32) para avaliação do sêmen foi alterada de valores “normais” para valores de “referência” (31). Esses valores de referência para os parâmetros seminais são: volume (ml) $\geq 1,5$; concentração (M/ml) ≥ 15 ; concentração total (M) ≥ 39 ; motilidade total (%) ≥ 40 ; motilidade (A+B) (%) ≥ 32 ; vitalidade (%) ≥ 58 e morfologia (%) ≥ 4 (31).

Os parâmetros seminais têm forte influência no resultado da IIU, no entanto, mesmo com a realização de vários estudos (18, 24, 28, 33-42), não há consenso sobre os limites ideais desses parâmetros para a indicação da técnica. Nem a análise básica do sêmen nem a análise avançada do sêmen são suficientes para prever o sucesso da IIU, a menos que problemas mais graves estejam presentes (24, 43-49). Desta forma, como não existem parâmetros para avaliar quais casais poderiam se beneficiar com a IIU, a maioria dos médicos especialistas em reprodução humana frequentemente indica de três a seis ou mais ciclos de IIU antes de indicar técnicas de maior complexidade (21-23). Estudos sobre o impacto da morfologia do espermatozóide, antes e após capacitação, têm levado a resultados divergentes (8, 23, 47, 50-53), bem como ao número mínimo recomendado de espermatozoides móveis inseminados, variando de 0,8 a 10×10^6 , dependendo do estudo (1, 12, 36, 43, 47, 54-56). Khalil et al. (55) recomendam o tratamento com FIV se a contagem de espermatozoides móveis for inferior a cinco milhões.

Dentre os fatores biológicos, a motilidade espermática é um dos pontos mais importantes na avaliação da habilidade de fertilização do espermatozóide ejaculado (57-59). Suas características obtidas por meio de análises por programas específicos computacionais podem prever parâmetros da fertilidade (60-61). Duas importantes propriedades fisiológicas do sêmen necessárias para o sucesso da inseminação são o número elevado de espermatozoides e sua sobrevivência (48). Estudos têm mostrado que, assim como na ocorrência da gestação de forma natural, a motilidade é considerada um fator importante de sucesso para a IIU (24, 62-63). Segundo Brasch et al. (24), a contagem da motilidade total em amostras de sêmen usadas para a IIU pode prever o potencial para a gravidez. Os autores avaliaram 546 casais com etiologia variada de infertilidade e mostraram, como resultado,

aumento da porcentagem de concepção relacionada à elevada concentração de espermatozóides móveis.

Branigan et al. (48), por meio de um teste denominado “Análise Seminal Avançada”, determinaram a fração de espermatozóides móveis processados e avaliaram a sobrevivência dos espermatozóides após 24 horas de incubação. Os resultados confirmaram que este teste de motilidade e sobrevivência dos espermatozóides é preditivo de sucesso da IIU.

Com a necessidade de obtermos respostas sobre quais casais de fato poderiam se beneficiar com a IIU e sobre o número de tentativas a ser feito com a técnica, desenhamos este estudo, utilizando a técnica desenvolvida por Branigan et al. (48), com o objetivo de avaliar se a motilidade espermática 24 horas após o preparo com gradiente descontínuo de diferentes densidades e incubação em CO₂ em indivíduos normospermicos é capaz de prever gravidez, uma vez que a literatura é limitada e não apresenta quais parâmetros seminais podem responder a essa importante questão.

2. OBJETIVO

Determinar o valor prognóstico da motilidade dos espermatozóides de indivíduos normospérmicos, incubados em 5% de CO₂ a 37 graus Celsius por 24 horas, em relação à gravidez clínica após inseminação intrauterina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Casuística

A casuística do presente estudo foi de 175 casais submetidos à IUI no período de janeiro de 2009 a março de 2011, no Centro de Reprodução Humana de São José do Rio Preto (CRH) – SP, por meio de estudo prospectivo longitudinal.

Os critérios de seleção e inclusão para o estudo foram: - mulheres com idade inferior ou igual a 35 anos, com histerossalpingografia normal e/ou vídeolaparoscopia com trompas sem alterações; endometriose Grau I e II (conforme *American Fertility Society*); ISCA (64); disfunção ovulatória não hiperandrogênica, e homens que apresentaram parâmetros seminais normais de acordo com os critérios da OMS (31). Os critérios de exclusão foram mulheres com fator tubário e peritoneal; endometriose Grau III e IV (65); número de folículos após a estimulação ovariana superior ou igual a quatro (com diâmetro médio entre 18 e 20 milímetros) no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) não resposta à estimulação ovariana.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), protocolo nº 0274/2010 (Anexo A).

Os casais selecionados, após esclarecimentos sobre a pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme resolução nº 196/Outubro/1996, do Conselho Nacional de Saúde, e segundo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo B).

3.2- Métodos

Todas as pacientes eram nuligestas e foram submetidas a um primeiro ciclo de estimulação ovariana com Citrato de Clomifeno, por via oral, na dose de 50mg/dia, do 3º ao 7º dia do ciclo, associado à Gonadotrofina Menopausal Humana ou Hormônio Folículo Estimulante recombinante (FSH-r), por via sub-cutânea, no 3º, 5º e 7º dias do ciclo. O desenvolvimento folicular foi acompanhado pela ultrassonografia transvaginal (Midray-Expert modelo 3C5A transdutor ultrassônico-transvaginal convexo de 6,5 MHz - China) no 2º (basal) e 8º dias do ciclo menstrual. Posteriormente, foi realizada a monitorização diária até que os

folículos atingissem o diâmetro médio de 18 e 20 milímetros e espessura endometrial maior que 7 milímetros.

Quando um ou até três folículos atingissem o diâmetro médio desejado, administrava-se o hCG na dosagem de 5000 UI (IM) ou hCG-r 250mg (SC). A inseminação intrauterina foi realizada entre 36 e 40 horas após a administração do hCG ou hCG-r e confirmação da ruptura folicular, utilizando-se o catéter de Frydman 5.5 (*Frydman Classic Catheter 1306055, CCD Laboratoire Paris-France*).

A coleta de sêmen foi obtida por masturbação após dois ou até quatro dias de abstinência sexual. A manipulação deste foi feita dentro do fluxo laminar com pressão positiva (HLFS-12M série-7011). Os parâmetros seminais foram analisados por um único observador e classificados de acordo com os critérios de normalidade da OMS (31). A quantidade de 10µl de sêmen liquefeito foi depositada diretamente na Câmara de Makler, com o auxílio de uma micropipeta, sendo realizada a análise em microscopia de fase (Eclipse E 200 – Nikon) e platina aquecida sob a Makler para calcular a concentração de espermatozóides por ml, o número total de espermatozóides móveis e progressivos (Progressão A= movimento rápido e direcional; B= movimento rápido e direcional mais movimento lento; C= móvel sem locomoção; D= imóvel) e morfologia. Para análise dos resultados, consideraram-se móveis apenas os espermatozóides com progressão A e B.

Ao término da análise seminal, foi realizada a capacitação espermática utilizando-se a técnica de Gradiente descontínuo de diferentes densidades – *Isolate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA-USA)*, em temperatura ambiente.

Com o auxílio de uma pipeta estéril e graduada, colocou-se em um tubo cônico de 15ml (Falcon 352097): 1ml do gradiente de 90% de sílica (*lower*), 1ml da camada 50% de sílica (*upper*) e por último 1ml de sêmen.

O volume total do sêmen foi fracionado de maneira que um tubo Falcon contivesse 1ml de cada gradiente e 1ml de sêmen (1/1/1), o qual foi centrifugado a 1250 rpm por 15 minutos (Excelsa Baby I - Modelo 206, FANEN, São Paulo, Brasil).

Ao final da centrifugação, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* estéril, foram retirados os espermatozóides depositados na parte côncava do tubo (*pellet*), o qual foi transportado para outro tubo Falcon de 15ml, acrescido de 5ml de HEPES (*Irvine Scientific*) suplementado com 15% de SSS (soro substituto sintético – *Irvine Scientific*) e novamente centrifugado a 1250 rpm, por 15 minutos. Este processo foi realizado por duas vezes.

Ao final, o *pellet* foi ressuspensionado com a mesma solução de meio de cultura, obtendo-se um volume final de 1ml. Uma alíquota de 10 μ l foi utilizada para realizar a análise dos parâmetros seminais pós-capacitação, e 20 μ l foram colocados em microtubo tipo *Eppendorf* e incubados por 24h em incubadora (*Forma Scientific, INC. Modelo 3110*) calibrada em 5% de CO₂ e 37°C. A concentração do espécime foi ajustada de modo que ficasse em um total de 10 milhões de espermatozoides por ml de meio de cultura para a amostra incubada por 24h. Do volume total de 1ml, restaram, portanto, 970 μ l que foram imediatamente inseminados no útero da paciente com catéter de Frydman 5.5 (*Frydman Classic Catheter 1306055, CCD Laboratoire Paris-France*), pelo mesmo médico. A paciente ficava em repouso por 20 minutos e a suplementação da fase lútea foi feita com progesterona natural (*Utrogestan*) na dose de 200mg de 12/12h por via oral, a partir do dia seguinte da IIU, seguindo até a confirmação da presença do batimento cardíaco embrionário (BCE) no ultrassom.

Após as 24h de incubação, foi analisada a motilidade total (A mais B) dos espermatozoides. O sucesso da inseminação intrauterina (gravidez clínica) foi confirmado pela presença de saco gestacional com BCE, 14 dias após o Beta hCG positivo.

De acordo com o resultado da IIU, os casais foram divididos em dois grupos: grávidas e não grávidas.

3.3- Análise Estatística

O cálculo amostral foi feito baseado no trabalho de Branigan et al. (48), em que se considerou a sobrevivência $\geq 70\%$ dos espermatozoides incubados por 24h como preditor de sucesso da IIU, com confiabilidade de 95% e margem de erro de 7%, obtendo-se o tamanho mínimo da amostra de 164 casais.

O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparar a idade das mulheres e dos parâmetros da infertilidade, assim como a análise inicial da concentração, morfologia e motilidade entre grávidas e não grávidas.

O teste de diferenças de proporções (χ^2) foi usado quando o resultado foi expresso em percentual.

A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi construída para determinar qual o valor de corte da motilidade espermática pós-capacitação e incubação em CO₂ por 24h em prever gravidez após IIU em indivíduos normospérmicos.

Os resultados foram representados em medianas, quartis e percentuais. Ressalte-se que a distribuição dos dados do presente estudo é assimétrica.

Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (vpp), valor preditivo negativo (vpn) para as duas variáveis: pós-preparo e incubação por 24 horas com os respectivos IC – 95%.

A sensibilidade foi definida pela presença de gestação quando esta realmente ocorreu, e a especificidade foi a ausência de gravidez quando esta de fato não ocorreu.

O valor vpp é a probabilidade de gravidez com motilidade pós-incubação de 56,5%, e o vpn é a probabilidade de não gestação após incubação com este mesmo valor de corte.

Em todas as análises, feitas utilizando o programa *SAS 9.2 for Windows* e o *SPSS for Windows V.19*, o valor de significância foi de 5% (0,05).

4. RESULTADOS

Dos casais submetidos à IUI, 52 obtiveram gravidez clínica (29,7%) e 123 não obtiveram êxito (70,3%), com percentual de recém-nascidos (RN) com alta hospitalar de 27,5%.

No decorrer do estudo, ocorreram quatro abortos clínicos (7,6%), sendo três no primeiro trimestre e um tardio, com 20 semanas. Ocorreu gravidez gemelar em um dos casos (3,8%).

As características clínicas dos casais submetidos à IUI podem ser observadas na Tabela 1. A idade mediana das mulheres com gravidez e sem gravidez após IUI foram respectivamente de 28 e 31 anos.

A comparação das características clínicas como idade, duração e etiologia da infertilidade dos casais que engravidaram e que não engravidaram submetidos à IUI não mostrou diferença estatística significativa, com exceção da motilidade espermática, que já na análise inicial mostrou diferença estatisticamente significativa ($<0,00001$) entre os dois grupos.

Na Tabela 2, é apresentada a comparação da motilidade espermática A+B, pós-capacitação (dia da IUI) e incubação com 5% de CO₂ a 37°C por 24h nos casais que engravidaram e nos que não engravidaram. Observamos que, nos casais submetidos à IUI, não houve diferença significativa da motilidade espermática pós-capacitação nos dois grupos ($p=0,4807$). Entretanto, a motilidade 24h pós-incubação foi significativamente maior no grupo das grávidas do que no das não grávidas. A diferença em termos de mediana e quartis ficaram bem evidentes. Ao ser realizada a análise da motilidade dos espermatozóides nas grávidas pós-preparo no dia da IUI e 24h pós-incubação, verificou-se que não houve diferença pós-capacitação (70,5 (67,5-77)) e pós-incubação (70 (67-73) $p=1$), ou seja, praticamente não houve alteração da motilidade espermática com 24h pós-incubação, enquanto nos casais em que a IUI não resultou em gestação ocorreu uma diminuição significativa da motilidade dos espermatozóides 24h após incubação, sendo de 65 (44-77) para 24 (12-41) $p<0,0001$.

Utilizando-se a curva ROC para determinar o ponto de corte de maior sensibilidade e especificidade para gravidez, e em relação à motilidade progressiva A+B pós-incubação de 24h, obteve-se como ponto de corte um valor de 56,5%, com alta sensibilidade - 96,1% (90,9 - 1,0%) - e especificidade - 92,7% (88,1 - 97,3%). Na Figura 1, visualiza-se a curva ROC, que determinou o ponto de corte da motilidade pós-capacitação e pós-incubação

por 24h como fator preditivo de gravidez em indivíduos normospérmicos. A área sob a curva foi de 0,965 para o valor de corte de 56,5%, e de 0,759 para o valor de corte de 69%.

Na Tabela 3, pode-se observar que a sensibilidade e a especificidade, vpp e vpn, foram mais altas pós-incubação 24h do que pós-capacitação, levando-se em consideração os valores de corte da curva ROC de 56,5% e 69%, respectivamente.

Tabela 1- Características clínicas e parâmetros seminais dos casais submetidos à IUI, de acordo com a presença ou ausência de gravidez

VARIÁVEIS	Gravidez (n=52)	Não Gravidez (n=123)	p-value *
Idade mulher (anos)	28 (28-32)	31 (30-32)	0,06
Idade homens (anos)	33 (31-36)	34 (32-37)	0,10
Duração da infertilidade (anos)	2 (1,6-3,5)	3 (2-4)	0,21
Etiologia (%)			
ISCA (falha coito)	25,0	29	
Endometriose	25,2	23,6	0,56 **
Fator cervical	23,1	16,3	
Disfunção ovulatória	30,8	24,4	
Concentração total de espermatozóides ($\times 10^6$)	200 (72-310)	150 (80-300)	0,72
Morfologia (%)	31 (25-36)	30 (22-35)	0,37
Motilidade A+B (%)	52 (38-60)	35 (32-34)	0,0001

Valores expressos em mediana e quartis

* = Teste *Mann-Whitney*

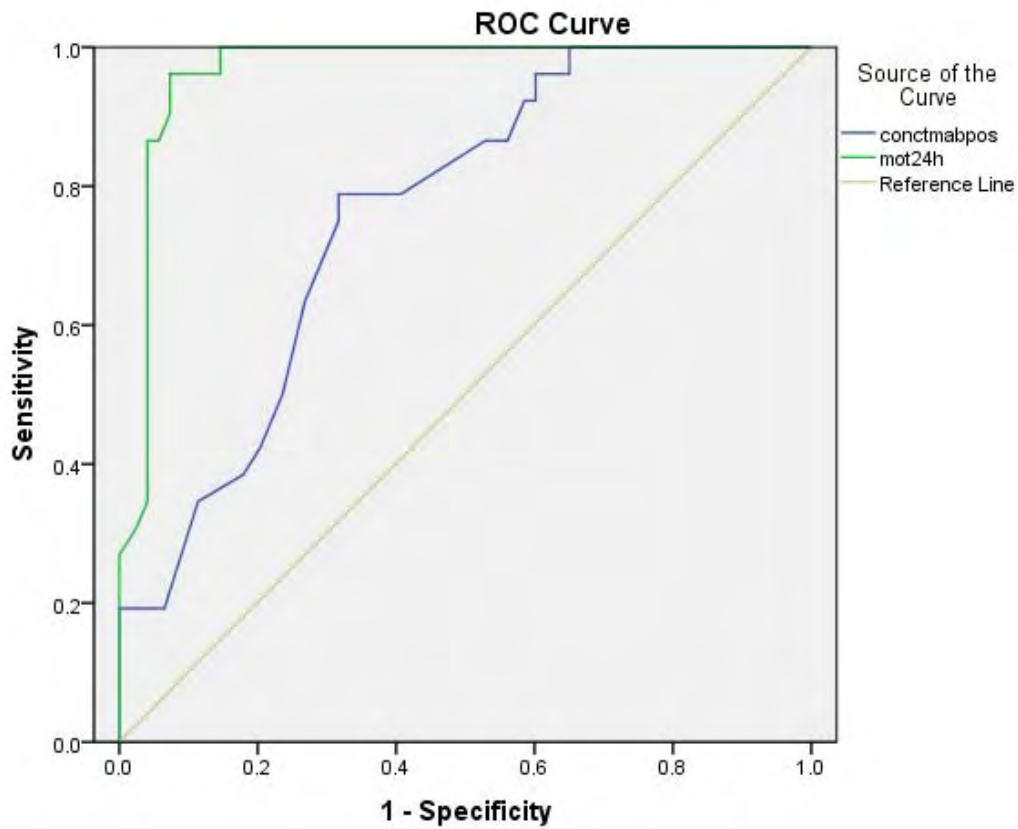
** = Teste Qui-quadrado (χ^2) para avaliação da etiologia da infertilidade

ISCA = Infertilidade sem causa aparente

Tabela 2- Comparação da motilidade espermática A+B pós-capacitação e incubação com 5% de CO₂ a 37°C em casais submetidos à IUI que resultou ou não em gravidez

MOTILIDADE (%)	Gravidez (n=52)	Não Gravidez (n=123)	p-value *
Pós-capacitação imediata	70,5 (67,5-77)	65 (44-70)	0,4807
Pós 24h de incubação	70,0 (67-73)	24 (12-41)	<0,0001
p-value	1,000	<0,0001	

* = Teste de diferenças de proporções (χ^2) com nível de significância de 0,05



Diagonal segments are produced by ties.

Figura 1- Curva ROC para motilidade pós-capacitação (Área sob a curva – 0,759) e incubação em 5% de CO₂ a 37°C por 24h (Área sob a curva – 0,965) como fator preditivo para gravidez clínica após IIU em indivíduos normospérmicos

Tabela 3- Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, utilizando-se o valor de corte da curva ROC de 69% pós-capacitação e 56,5% pós-incubação

	Pós-capacitação (valor de corte: 69%)	Pós-incubação 24h (valor de corte: 56,5%)
Sensibilidade	63,5% (50,4 - 76,5%)	96,1% (90,9 - 1,0%)
Especificidade	73,1% (65,0 - 81,0%)	92,7% (88,1 - 97,3%)
Valor preditivo positivo	50% (37,9 - 62,1%)	84,7% (75,5 - 93,9%)
Valor preditivo negativo	82,6% (75,5 - 89,7%)	98,3% (95,9 - 1,0%)

5. DISCUSSÃO

A IUI é um recurso muito utilizado para tratamento de casais inférteis, apresentando grandes chances de sucesso, quando bem indicada. A qualidade do sêmen é um fator determinante que corrobora o sucesso da técnica (66-67).

Dentro dos parâmetros seminais, a motilidade espermática é um fator de grande impacto na obtenção de altas taxas de gravidez em casais destinados a programas de IUI (26).

Os resultados do presente estudo mostraram um percentual de 27,9% de gravidez clínica. A taxa de sucesso obtida se deve à indicação adequada da IUI e à exclusão de fatores masculinos e femininos severos.

Outro fator importante é o número de espermatozoides móveis inseminados. No presente estudo, o número de espermatozoides móveis considerados para IUI estava de acordo com os valores de referência da OMS (31), que considera motilidade total $\geq 40\%$ e motilidade (A+B) $\geq 32\%$.

Segundo Horvath et al. (43), as melhores taxas de gravidez ocorreram nos casos em que valores acima de 10 milhões de espermatozoides móveis estavam presentes. Dickey et al. (8) acreditam que a concentração de $\geq 5 \times 10^6$ /ml, com motilidade $\geq 30\%$, representa valores limítrofes de fertilidade em amostras seminais que poderão ser utilizadas na IUI. Francavilla et al. (23) não relataram ocorrência de gravidez quando o número total de espermatozoides móveis foi $< 5 \times 10^6$ após *swin-up*.

Merviel et al. (18) apresentaram taxa de gravidez por casal de 44,3% para número superior a 5 milhões de espermatozoides móveis, em contraste com 28,5% para números inferiores a 5 milhões. Van Voorhis et al. (12) e Miller et al. (36) demonstraram que a contagem total dos espermatozoides móveis processados, independentemente, prevê o sucesso da IUI, e que valores abaixo de 10 milhões apresentam probabilidade significativamente menor de resultar em gravidez; a estimulação ovariana, a idade feminina, a ausência de gravidez anterior e o total de espermatozoides móveis também foram considerados fatores preditivos, independentemente de gravidez clínica após o tratamento com IUI.

A idade mediana dos nossos pacientes foi de 28 (28-32) e 31 (30-32) nas grávidas e não grávidas respectivamente, e, embora a idade feminina seja um fator prognóstico para a IUI, no nosso estudo não foi considerado. Badawy et al. (41) observaram que, em pacientes com idade abaixo de 25 anos, com número de espermatozoides móveis acima de 5 milhões, a taxa de gravidez por ciclo foi de 28,2%, o que é significativamente maior quando comparada

a outras faixas etárias. No entanto, para mulheres com idade acima de 35 anos, não houve registro de gravidez quando o número de espermatozóides móveis foi menor que 5 milhões, sendo que a taxa de gravidez foi muito baixa (0,84%) com número de espermatozóides móveis acima de 5 milhões. Os autores, utilizando os critérios da OMS de 1993 (68), concluíram que a IIU para o tratamento de fator masculino de infertilidade apresenta poucas chances de sucesso para mulheres com mais de 35 anos de idade, quando o número de espermatozóides móveis inseminados está abaixo de 5 milhões ou a morfologia é menor que 30%.

Alguns autores concordam com o limite mínimo de 1×10^6 para o número de espermatozóides móveis inseminados, e recomendam a FIV quando esse valor é $\leq 1 \times 10^6$ /ml (1, 24, 34, 43, 45, 47, 54, 63, 69). Por outro lado, Khalil et al. (55) recomendam referência direta para o tratamento com FIV se a contagem de espermatozóides móveis for inferior a 5 milhões.

Demir et al. (70) avaliaram o efeito dos diferentes parâmetros seminais sobre a taxa de gravidez nos ciclos de IIU em mulheres com características de fertilidade favorável tratadas para infertilidade. Duzentos e doze casais foram avaliados e a taxa de gravidez foi de 15,8% por ciclo. A idade feminina e número total de espermatozóides móveis foram preditivos para gravidez. A taxa de gravidez foi maior nos ciclos de IIU em mulheres com idade inferior a 25 anos, número total de espermatozóides móveis superior a 10 milhões e morfologia superior a 4%. Idade masculina também foi fator determinante para o sucesso da IIU, mesmo apresentando espermograma normal. No nosso estudo não houve diferença de idade (tanto dos homens quanto das mulheres) nos dois grupos (grávidas e não grávidas).

Sabe-se que o sêmen varia muito com relação ao número e sua recuperação em determinados tipos de preparo, como pode ser visto no trabalho realizado por Moohan & Lindsay (71). Os autores avaliaram 18 pacientes com sêmen normal, com o objetivo de comparar as técnicas de gradiente descontínuo de densidade (*Percoll*) e *swim-up*, usando análise espermática computadorizada (CASA). As amostras foram analisadas após o tempo de 30 minutos, 3 horas, 6 horas e 24 horas. Esse estudo permitiu concluir que o gradiente descontínuo de densidade selecionou espermatozóides com as melhores características de mobilidade, maior hiperativação e melhor longevidade, se comparado à técnica de *swim up*. Sendo assim, como há uma relação entre a mobilidade espermática e o sucesso de fertilização do ovócito, a técnica de *Percoll* seria o melhor método a ser utilizado em reprodução assistida. Estudos sugerem que a motilidade é um fator importante para a fertilização (72-73).

A motilidade progressiva é fator preditivo de sucesso da IIU. Outros pesquisadores também encontraram motilidade progressiva (12, 24, 26, 33, 36, 54, 63,74) e/ou número total de espermatozóides móveis (24, 33-34, 43) como sendo os melhores preditores de gravidez após o processamento do sêmen.

Pasqualotto et al. (75) avaliaram 504 casais submetidos a IIU para investigar possível relação entre o número total de espermatozóides móveis e porcentagem de motilidade e o valor mínimo após preparo como fatores preditivos de sucesso da IIU. Este estudo mostrou que, independentemente do número total de espermatozóides móveis, a motilidade após preparo foi preditiva de sucesso para a IIU, apresentando valor de corte de 40%. Assim como se verificou no presente trabalho, a motilidade pode auxiliar pacientes no que diz respeito as suas chances de sucesso com a IIU.

Dorjpurev et al. (28) avaliaram os efeitos das características do sucesso da IIU em um estudo retrospectivo em 1.177 IIU realizadas em 283 casais. Os autores obtiveram um total de 82 gestações (7% de taxa de gravidez por ciclo e 28,9% por caso). A taxa de gravidez por ciclo foi significativamente maior nos casos em que a taxa de motilidade dos espermatozóides foi >30% (taxa de gravidez de 9,3%) e a contagem de espermatozóides móveis foi >10x10⁶/ml (taxa de gravidez de 8,2%).

Atualmente, apesar da grande quantidade de pesquisas que se referem à investigação de parâmetros seminais e a sua importância na obtenção de bons resultados de gravidez em casais submetidos à IIU, há muitas controvérsias, não permitindo saber quais casais realmente poderiam se beneficiar com esse tipo de tratamento, uma vez que apenas a análise seminal básica não seria um bom parâmetro para esse sucesso. Além disso, não temos respostas sobre a viabilidade de se insistir ou não na técnica de IIU. Na literatura consta apenas um trabalho realizado por Branigan et al. (48), que analisaram a motilidade espermática 24h após capacitação e incubação, como teste preditivo de sucesso no tratamento da IIU. De acordo com o resultado do estudo, concluiu-se que o teste de motilidade é realmente preditivo de sucesso na IIU. Os autores avaliaram 414 casais submetidos à IIU que apresentavam fator masculino e infertilidade inexplicada. Seus resultados mostraram que nenhum dos parâmetros seminais (sêmen bruto) básicos de concentração, motilidade ou morfologia foi preditivo de sucesso da IIU. Com a análise avançada, quando o número total de espermatozóides móveis disponíveis para a IIU foi $\geq 10 \times 10^6$ e a sobrevivência após 24 horas de incubação foi $\geq 70\%$, 89% dos casais obtiveram gravidez com taxa de 21,4% por ciclo de

IIU. Com os valores de corte $>70\%$ para a análise avançada de sêmen, o teste apresentou sensibilidade de 94% e especificidade de 86%.

Um outro ponto interessante é que os autores compararam homens com análise seminal normal (grupo de infertilidade inexplicada) com aqueles apresentando fator masculino. Os resultados mostraram que 23% dos homens com sêmen normal não atingiram os valores de corte para motilidade 24h ou número total de espermatozóides móveis processados. Portanto, o teste avançado foi preditivo, independentemente de os parâmetros da análise básica seminal serem normais ou anormais.

Esse mesmo tipo de teste foi realizado no presente trabalho, porém apenas em indivíduos normospérmicos, o que permitiu uma boa taxa de sucesso nos resultados da IIU. Alguns estudos confirmam que as taxas de gravidez são realmente maiores em indivíduos normospérmicos, como mostrado no trabalho de revisão realizado por Allen et al. (22), que apontou taxa de gravidez de 25% por ciclo em 104 casais quando o fator masculino era predominante, e taxa de 60% por ciclo em 58 casais quando havia fator cervical presente. No estudo realizado por Grigoriou et al. (40), as taxas de gravidez clínica e nascidos vivos por ciclo foram significativamente diminuídas no grupos de teratozospérmicos, comparados ao grupo dos normospérmicos, ao passo que a taxa cumulativa de nascidos vivos após 4 ciclos de IIU foi significativamente menor no grupo que apresentava fator masculino de infertilidade.

Em estudo recente, Sun et al. (67) avaliaram pacientes com concentração espermática e motilidade normais para investigar a correlação da morfologia espermática com o resultado da IIU. Concluíram que, para esses tipos de pacientes, a IIU é recomendada como o primeiro tipo de tratamento a ser considerado quando a mulher tem idade inferior a 35 anos ou quando os espermatozóides morfologicamente normais estão acima ou igual a 5%.

Esses dados corroboram os resultados aqui apresentados, indicando que altas taxas de gravidez são obtidas em pacientes normospérmicos em que a motilidade espermática após incubação permanece inalterada. Portanto, o teste 24h de incubação a 37°C e 5% de CO_2 pós-capacitação permitiu concluir que a motilidade está relacionada à taxa de sucesso da IIU. Sendo assim, casais que procuram tratamento para infertilidade poderiam ser submetidos a esse teste e, a partir do resultado, teríamos condições de selecionar aqueles que poderiam se beneficiar com a IIU. Desta forma, evitaríamos submetê-los a vários ciclos de IIU desnecessários.

Ainda hoje, não foi possível chegar a um consenso com relação ao máximo de tentativa de IIU a que um casal deve submeter-se. Alguns estudos mostram que esse número pode variar de duas a seis tentativas (1, 21-28, 44, 76). Shulman et al. (26) recomendam três ciclos de tratamento de IIU com EOC, em parceira feminina normal, quando há uma boa motilidade progressiva do sêmen após uma preparação conveniente. Entretanto, Custers et al. (20) acreditam que é possível atingir o potencial máximo de gravidez na IIU com até nove ciclos realizados. Para Zhao et al. (29), o número de tentativas deve ser avaliado para cada paciente de forma individual, considerando o histórico de infertilidade de cada casal. Atualmente, admite-se que a IIU deveria ser limitada a quatro ou seis ciclos e que a FIV deveria ser realizada em caso de não haver sucesso com a IIU (18).

Essa variação em relação ao número limite de ciclos a serem realizados poderia conduzir a um consenso, caso algum teste preditivo de sucesso da IIU indicasse quais casais poderiam se beneficiar com a técnica. O presente estudo objetiva isso através de um valor de corte, utilizando o parâmetro que parece ser o mais relevante, a motilidade, em consonância com os estudos de Shulman et al. (26), que concluíram que o grau de motilidade espermática é o único parâmetro que pode ser correlacionado com o resultado da IIU, considerando mulheres normais e parceiro com boa motilidade progressiva seminal após preparo adequado.

Já é bem postulado que sucessivas falhas nas tentativas de IIU podem fazer que esta seja uma experiência frustrante para o casal, não só pelo desgaste entre um ciclo e outro, como também pelo medo de não obter sucesso (34).

A IIU é um tratamento de menor complexidade e o teste da motilidade espermática 24h pós-incubação com 5% de CO₂ e 37°C pode ser utilizado para prever gravidez clínica antes da realização da IIU, ou como indicador para verificar se deve-se realizar uma nova tentativa de IIU ou iniciar um procedimento de maior complexidade.

6. CONCLUSÃO

A determinação de motilidade dos espermatozoides de indivíduos normospérmicos após capacitação e incubação em 5% de CO₂ a 37°C por 24h, valor de corte de 56,5%, é capaz de prever o sucesso de IIU.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dodson WC, Haney AF. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. *Fertil Steril*. 1991;55(3):457-67.
2. Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Grefenstette I, Chouraqui A, Serkine AM, Abirached F, Plachot M, Kulski O. Intra-uterine insemination: ovarian stimulation or not? *Gynecol Obstet Fertil*. 2007;35(9):871-6. Epub 2007 Aug 17.
3. Confino E, Friberg J, Dudkiewicz AB, Gleicher N. Intrauterine inseminations with washed human spermatozoa. *Fertil Steril*. 1986;46(1):55-60.
4. Dodson WC, Whitesides DB, Hughes CL Jr, Easley HA 3rd, Haney AF. Superovulation with intrauterine insemination in the treatment of infertility: a possible alternative to gamete intrafallopian transfer and in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1987;48(3):441-5.
5. Sunde A, Kahn JA, Molne K. Intrauterine insemination: a European collaborative report. *Hum Reprod*. 1988;Suppl 2:69-73.
6. Yovich JL, Matson PL. The treatment of infertility by the high intrauterine insemination of husband's washed spermatozoa. *Hum Reprod*. 1988;3(8):939-43.
7. te Velde ER, van Kooy RJ, Waterreus JJ. Intrauterine insemination of washed husband's spermatozoa: a controlled study. *Fertil Steril*. 1989;51(1):182-5.
8. Dickey RP, Pyrzak R, Lu PY, Taylor SN, Rye PH. Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with WHO threshold values for normal sperm. *Fertil Steril*. 1999;71(4):684-9.
9. Bhattacharya S, Hall M. Cost-effective treatment of couples with subfertility. *Lancet*. 2000;355(9197):2.
10. Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet*. 2000;355(9197):13-8.
11. Hughes E, Collins J, Vandekerckhove P. Clomiphene citrate for unexplained subfertility in women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(1):CD000057.
12. Van Voorhis BJ, Barnett M, Sparks AE, Syrop CH, Rosenthal G, Dawson J. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2001;75(4):661-8.

13. Dickey RP, Taylor SN, Lu PY, Sartor BM, Rye PH, Pyrzak R. Effect of diagnosis, age, sperm quality, and number of preovulatory follicles on the outcome of multiple cycles of clomiphene citrate-intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2002;78(5):1088-95.
14. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Optimal evaluation of the infertile female. *Fertil Steril*. 2004;82(suppl 1):S169-72.
15. Marchetti C, Dewailly D. Intrauterine insemination: indications and methods. *Rev Prat*. 2006;56(5):500-6.
16. Zafar M, Jameel T, Abdullah KN. Impact of intrauterine insemination as first line treatment of subfertility. *J Pak Med Assoc*. 2007;57(3):133-6.
17. Ghanem ME, Bakre NI, Emam MA, Al Boghdady LA, Helal AS, Elmetwally AG, Hassan M, Albahlol IA, Elzayat MM. The effects of timing of intrauterine insemination in relation to ovulation and the number of inseminations on cycle pregnancy rate in common infertility etiologies. *Hum Reprod*. 2011;26(3):576-83. Epub 2010 Dec 21.
18. Merviel P, Heraud MH, Grenier N, Lourdel E, Sanguinet P, Copin H. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril*. 2010;93(1):79-88.
19. Scemama H, Salat-Baroux J, Antoine JM, Saada H. Value of controlled hyperstimulation in intrauterine inseminations. *Contracept Fertil Sex*. 1995;23(1):37-44.
20. Custers IM, Steures P, Hompes P, Flierman P, van Kasteren Y, van Dop PA, van der Veen F, Mol BW. Intrauterine insemination: how many cycles should we perform? *Hum Reprod*. 2008;23(4):885-8. Epub 2008 Feb 8.
21. Kerin JF, Kirby C, Peek J, Jeffrey R, Warnes GM, Matthews CD, Cox LW. Improved conception rate after intrauterine insemination of washed spermatozoa from men with poor quality semen. *Lancet*. 1984;1(8376):533-5.
22. Allen NC, Herbert CM 3rd, Maxson WS, Rogers BJ, Diamond MP, Wentz AC. Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil Steril*. 1985;44(5):569-80.
23. Francavilla F, Romano R, Santucci R, Poccia G. Effect of sperm morphology and motile sperm count on outcome of intrauterine insemination in oligozoospermia and/or asthenozoospermia. *Fertil Steril*. 1990;53(5):892-7.
24. Brasch JG, Rawlins R, Tarchala S, Radwanska E. The relations between total motile sperm count and the success of intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 1994;62(1):150-54.

25. Plosker SM, Jacobson W, Amato P. Predicting and optimizing success in an intra-uterine insemination programme. *Hum Reprod.* 1994;9(11):2014-21.
26. Shulman A, Hauser R, Lipitz S, Frenkel Y, Dor J, Bider D, Mashiach S, Yogev L, Yavetz H. Sperm motility is a major determinant of pregnancy outcome following intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15(6):381-5.
27. Nuojua-Huttunen S, Tomas C, Bloigu R, Tuomivaara L, Martikainen H. Intrauterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod.* 1999;14(3):698–703.
28. Dorjpurev U, Kuwahara A, Yano Y, Taniguchi T, Yamamoto Y, Suto A, Tanaka Y, Matsuzaki T, Yasui T, Irahara M. Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intrauterine insemination. *J Med Invest.* 2011;58(1-2):127-33.
29. Zhao Y, Vlahos N, Wyncott D, Petrella C, Garcia J, Zacur H, Wallach EE. Impact of semen characteristics on the success of intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet.* 2004;21(5):143-8.
30. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. WHO reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010;16(3):231-45.
31. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed. Geneva: WHO; 2010.
32. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
33. Arny M, Quagliarello J. Semen quality before and after processing by a swim-up method: relationship to outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 1987;48(4):643-8.
34. Campana A, Sakkas D, Stalberg A, Bianchi PG, Comte I, Pache T, Walker D. Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Hum Reprod.* 1996;11(4):732-6.
35. Wainer R, Merlet F. Indications des inséminations intra-utérines intraconjugales en cas d'oligo-astheno-térato-spermie. In: *Les Traitements Actuels de la Stérilité Masculine.* Montrouge, France: John Libbey Eurotext; 1998.
36. Miller DC, Hollenbeck BK, Smith GD, Randolph JF, Christman GM, Smith YR, Lebovic DI, Ohl DA. Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology.* 2002;60(3):497-501.

37. Spiessens C, Vanderschueren D, Meuleman C, D'Hooghe T. Isolated teratozoospermia and intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2003;80(5):1185-9.
38. Shibahara H, 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;27(2):63-8.
39. Wainer R, Albert M, Dorion A, Bailly M, Bergère M, Lombroso R, Gombault M, Selva J. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. *Hum Reprod*. 2004;19(9):2060-5. Epub 2004 Jul 8.
40. Grigoriou O, Pantos K, Makrakis E, Hassiakos D, Konidaris S, Creatsas G. Impact of isolated teratozoospermia on the outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2005;83(3):773-5.
41. Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2009;91(3):777-81.
42. Kamath MS, Bhave P, Aleyamma T, Nair R, Chandy A, Mangalaraj AM, Muthukumar K, George K. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination: A prospective study of factors affecting outcome. *J Hum Reprod Sci*. 2010;3(3):129-34.
43. Horvath P, Bohrer M, Shelden R, Kemmann E. The relationship of sperm parameters to cycle fecundity in superovulated woman undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 1989;52(2):288-94.
44. DiMarzo SJ, Kennedy JF, Young PE, Hebert SA, Rosenberg DC, Villanueva B. Effect of controlled ovarian hyperstimulation on pregnancy rates after intrauterine insemination. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166(6 Pt 1):1607-12; discussion 1612-3.
45. Le Lannou D. Intrauterine insemination, indications and results. *Contracept Fertil Sex*. 1994; 22(6):361-9.
46. Ombelet W, Puttemans P, Bosmans E. Intrauterine insemination: a first step procedure in the algorithm of male subfertility treatment. In *Modern andrology*. *Hum Reprod*. 1995; 10(Suppl 1):90-102.
47. Wainer R, Merlet F, Bailly M, Lombroso R, Camus E, Bisson JP. Prognostic sperm factors in intra-uterine insemination with partner's sperm. *Contracept Fertil Sex*. 1996;24(12):897-903.
48. Branigan EF, Estes MA, Muller CH. Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. *Fertil Steril*. 1999;71(3):547-51.

49. Duran HE, Morshedi M, Kruger T and Oehninger S. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Hum Reprod Update*. 2002;8(4):373-84.
50. Matorras R, Corcostegui B, Perez C, Mandiola M, Mendoza R and Rodriguez-Escudero FJ. Sperm morphology analysis (strict criteria) in male infertility is not a prognostic factor in intrauterine insemination with husband's sperm. *Fertil Steril*. 1995; 63(3):608-11.
51. Burr RW, Sieberg R, Flaherty S, Wang XJ and Matthews CD. The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. *Fertil Steril*. 1996;65(1):127-32.
52. Karabinus DS, Gelety DS. The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertil Steril*. 1997;67(3):536-41.
53. Hauser R, Yogev L, Botchan A, Lessing JB, Paz G, Yavetz H. Intrauterine insemination in male factor subfertility: significance of sperm motility and morphology assessed by strict criteria. *Andrologia*. 2001;33(1):13-7.
54. Berg U, Brucker C, Berg FD. Effect of motile sperm count after swim-up on outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 1997;67(4):747-50.
55. Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG. Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001;80(1):74-81.
56. Strandell A, Bergh C, Soderlund B, Lundin K, Nilsson L. Fallopian tube sperm perfusion: the impact of sperm count and morphology on pregnancy rates. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003;82(11):1023-9.
57. Bongso TA, Ng SC, Mok H, Lim MN, Teo HL, Wong PC and Ratnam SS. Effect of sperm motility on human in vitro fertilization. *Arch Androl*. 1989;22:185-90.
58. Eimers JM, te Velde ER, Gerritse R, Vogelzang ET, Looman CW, Habbema JD. The prediction of the chance to conceive in sub-fertile couples. *Fertil Steril*. 1994; 61(1):44-52.
59. Donnelly ET, Lewis SEM, McNally JA, Thompson W. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril*. 1998;70(2):305-14.
60. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Hum Reprod*. 2000;15(7):1562-7.

61. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 2001;18(4):213-8.
62. Eddy EM, O'Brien DA. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press; 1994. p. 29–77.
63. Huang HY, Lee CL, Lai YM, Change MY, Wang HS, Change SY and Soong YK. The impact of the total motile sperm count on the success of intrauterine insemination with husband's spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 1996;13(1):56-63.
64. Stanford JB, Mikolajczyk RT, Lynch CD, Simonsen SE. Cumulative pregnancy probabilities among couples with subfertility: effects of varying treatments. *Fertil Steril.* 2010;93(7):2175-81. Epub 2009 Mar 28.
65. ESHRE - Guideline for the Diagnosis and Treatment of Endometriosis [Internet]. [update 2007 June 30; cited 2012 Jan 10]. Available from: <http://www.guidelines.endometriosis.org>.
66. Kably Ambe A, Carrera Lomas E, Carballo E, Campos Cañas JA, Nuñez García M. Intrauterine insemination results in the Specialized Center for Women's Care. *Ginecol Obstet Mex.* 2011;79(5):280-4.
67. Sun Y, Li B, Fan LQ, Zhu WB, Chen XJ, Feng JH, Yang CL, Zhang YH. Does sperm morphology affect the outcome of intrauterine insemination in patients with normal sperm concentration and motility? *Andrologia.* 2012 Feb 16. doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01280.x. [Epub ahead of print]
68. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Sperm and Semen-cervical Mucus Interaction*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.
69. Nulsen JC, Walsh S, Dumez S, Metzger D. A randomized and longitudinal study of human menopausal gonadotropin with intrauterine insemination in the treatment of infertility. *Obstet Gynecol.* 1993;82(5):780-6.
70. Demir B, Dilbaz B, Cinar O, Karadag B, Tasci Y, Kocak M, Dilbaz S, Goktolga U. Factors affecting pregnancy outcome of intrauterine insemination cycles in couples with favourable female characteristics. *J Obstet Gynaecol.* 2011;31(5):420-3.

71. Moohan JM, Lindsay KS. Spermatozoa selected by a discontinuous Percoll density gradient exhibit better motion characteristics, more hyperactivation, and longer survival than direct swim-up. *Fertil Steril.* 1995;64(1):160-5.
72. Yoshida M, Kawano N, Yoshida K. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(21):3446-57.
73. Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J Androl.* 2003;24(6):790-803.
74. McGovern P, Quagliarello J, Arny M. Relationship of within-patient semen variability to outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 1989;51(6):1019-23.
75. Pasqualotto EB, Daitch JA, Hendin BN, Falcone T, Thomas AJ Jr, Nelson DR, Agarwal A. Relationship of total motile sperm count and percentage motile sperm to successful pregnancy rates following intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16(9):476-82.
76. Aboulghar M, Mansour R, Serour G, Abdrazek A, Amin Y, Rhodes C. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of unexplained infertility should be limited to a maximum of three trials. *Fertil Steril.* 2001;75(1):88-91.

ANEXO A

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 040/2010


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP n.º 0274/2010 sob a responsabilidade de Ligia Fernanda Previato de Araújo, com o título "Avaliação de um teste de análise Seminal avançado em prever sucesso em inseminação intra uterina: análise preliminar", está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi **aprovado por esse CEP.**

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 08 de fevereiro de 2010.

Dr.ª Maria Angélica Benes Teixeira Lemos
Secretária do CEP/FAMERP


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP - FAMERP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Avaliação de um teste de amostra seminal avançado em provar sucesso em inseminação intrauterina análise preliminar" aprovado pelo CEP em 08/02/2010, teve seu título alterado para "Eficácia da motilidade espermática pós capacitação e incubação na produção de gravidez após inseminação intra uterina sem em indivíduos normospermicos".
nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.

Botucatu, 02/04/2012

Nome/Assinatura do(a) aluno(a)

Ligia Amanda Furato Kayo

Nome/Assinatura do(a) orientador (a)

Luiz Guilherme Pereira

Programa de Pós Graduação em

Ginecologia e Obstetrícia e Mastologia

✓ Preencher formulário em 2 vias e protocolar no respectivo CEP

De acordo

Cristiane
Cristiane de Fátima O. Matos
Auxiliar de Serviço
Comitê de Ética em Pesquisa
Data: 28/03/2012

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós: _____, brasileira, _____, _____, portadora da CIRG-SSP-SP sob n. _____, inscrita no CPFMF sob n. _____ e _____, brasileiro, _____, _____, portador da CIRG-SSP-SP sob n. _____, inscrito no CPFMF sob n. _____, domiciliados nesta cidade, onde residimos na rua _____, n._____, declaramos estarmos no gozo de plena e perfeita saúde mental, estando esclarecidos e cientes, efetuamos a completa leitura do presente instrumento, redigido após detalhada e exaustiva explicação do seu teor, bem como de todos os termos técnicos pela EMBRIOLOGISTA LÍGIA FERNANDA PREVIATO DE ARAÚJO, compreendemos toda a sua extensão, e desta forma estando plenamente concordes em participar deste projeto de pesquisa científica, efetuamos em conjunto as declarações e autorizações que seguem abaixo:

A Embriologista Lígia Fernanda Previato de Araújo nos explicou que estamos sendo convidados a participar de uma pesquisa denominada “EFICÁCIA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA PÓS-CAPACITAÇÃO E INCUBAÇÃO NA PREDIÇÃO DE GRAVIDEZ APÓS INSEMINAÇÃO INTRAUTERINA EM INDIVÍDUOS NORMOSPÉRMICOS”.

Será um trabalho de mestrado na área de reprodução humana assistida, coordenado e efetivado pela própria Embriologista, sob a orientação da Dra. Anaglória Pontes, tendo como objetivo avaliar a relação da progressão e motilidade dos espermatozóides com os resultados positivos ou negativos da inseminação artificial intra-uterina .

Compreendemos que a nossa participação se dará da seguinte forma :

- o senhor _____doará uma quantidade mínima de espermatozóides (cerca de 20 microlitros), o que representa, exemplificando, a quantidade de líquido que caberia no espaço de dois milímetros.
- a senhora _____participará apenas autorizando que se observe através de acompanhamento qual será a evolução e o resultado da inseminação

A quantidade de 20 microlitros de espermatozóides será retirada do total do sêmen que for colhido para o tratamento de inseminação artificial intra-uterina que o casal estará realizando.

Conforme os resultados, o casal poderá eventualmente ser beneficiado futuramente.

Embora não se possa identificar qualquer risco neste momento, se existir algum, os participantes serão indenizados por eventual dano.

Os sujeitos de pesquisa não terão qualquer despesa financeira e também nenhuma compensação será oferecida em decorrência das suas participações

A assinatura neste documento, por livre espontânea vontade, representa a concordância para atuar como sujeito de pesquisa no estudo proposto.

Estão plenamente assegurados os seguintes direitos:

- liberdade para interromper a participação em qualquer fase do estudo, no momento em que julgarem necessário;
- garantia de sigilo absoluto de identidade

Em caso de outras dúvidas, fomos esclarecidos de que poderemos entrar em contato com a pesquisadora Lígia Fernanada Previato de Araújo, no endereço seguinte: Rua XV de Novembro, nº 4461, Redentora, fone (17) 3216-8662 , ou então diretamente com o Comitê de Ética e Pesquisa, na Av. Brigadeiro Faria Lima, nº 5716, fone (17) 3201-5700 ramal 5813.

São José do Rio Preto, ___ de _____ de 2.010 .

Esposo

Esposa