

Lavado de Semen de Hombre
Seropositivo al VIH-1
para su utilización
en Técnicas de
Reproducción Asistida

7 LAVADO DE SEMEN DE HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1 PARA SU UTILIZACIÓN EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

7.1 Introducción

El principal problema para tratar con técnicas de reproducción asistida a las parejas serodiscordantes (hombre seropositivo) al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) es eliminar el virus del semen. Diversos autores han intentado eliminar microorganismos del semen con diferentes técnicas de lavado seminal (Bolton *et al.*, 1986; Wong *et al.*, 1986; Forman *et al.*, 1987; Sun *et al.*, 1987; Karlström *et al.*, 1991; Levay *et al.*, 1995; Cottell *et al.*, 1996; Cottell *et al.*, 1997). Estas mismas técnicas se han empleado para eliminar el VIH-1 del semen para su utilización en técnicas de inseminación artificial (Semprini *et al.*, 1992; Semprini *et al.*, 1997). Varios estudios defienden la eficacia de la centrifugación en gradientes de densidad para obtener espermatozoides libres de VIH-1 de sémenes de hombres seropositivos al virus (Anderson *et al.*, 1990; Chrystie *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Hanabusa *et al.*, 2000).

El VIH está presente en el semen de los pacientes seropositivos, en una mayor o menor concentración, en su forma de partícula libre RNA (Dulioust *et al.*, 1998) y en su forma de provirus asociado a células (Byrn y Kiessling, 1998). Si el VIH-1 se encuentra o no integrado en el genoma de espermatozoides o células germinales es objeto de una gran controversia (Baccetti *et al.*, 1998; Muciaccia *et al.*, 1998; Pudney *et al.*, 1998; Quayle *et al.*, 1998; Quayle *et al.*, 1997). El objetivo del lavado del semen consiste en obtener una muestra con la fracción de espermatozoides móviles libre de células germinales inmaduras, leucocitos, células epiteliales, plasma seminal, bacterias y virus. Este trabajo recoge nuestra experiencia clínica en la eliminación del virus VIH-1 del semen empleando una asociación de dos técnicas: gradientes discontinuos de PureSperm® (IVF Science, Suecia) y *swim-up*.

Para comprobar si el lavado seminal ha hecho posible la obtención de espermatozoides móviles libres de VIH-1 para su uso en inseminación artificial o fecundación *in vitro*, se usa la técnica de PCR aplicada al semen lavado para detectar la presencia de RNA o DNA viral del VIH-1.

Se compara también la cantidad de espermatozoides móviles que se recupera después del doble lavado con la recuperabilidad que se obtiene cuando se aplican como rutina de laboratorio las dos técnicas por separado en pacientes seronegativos que se someten a técnicas de reproducción asistida.

7.2 Técnica de lavado de semen procedente de hombre portador del VIH-1

7.2.1 Evaluación

La muestra de semen se recoge por masturbación en un frasco estéril. El semen ha de entregarse en el laboratorio dentro de la primera hora post eyaculación. Se recomienda un período de abstinencia sexual entre 4 y 7 días. Se deja que el semen se licúe a temperatura ambiente de 10 a 40 minutos. Antes de proceder al lavado del semen se valoran diferentes parámetros de la muestra según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1992): volumen, movilidad progresiva, concentración de espermatozoides por mL, viscosidad, licuación, presencia de aglutinación. Se evalúa la presencia de células no-espermatozoides y se anota cualquier otra observación de interés.

7.2.2 Primer lavado

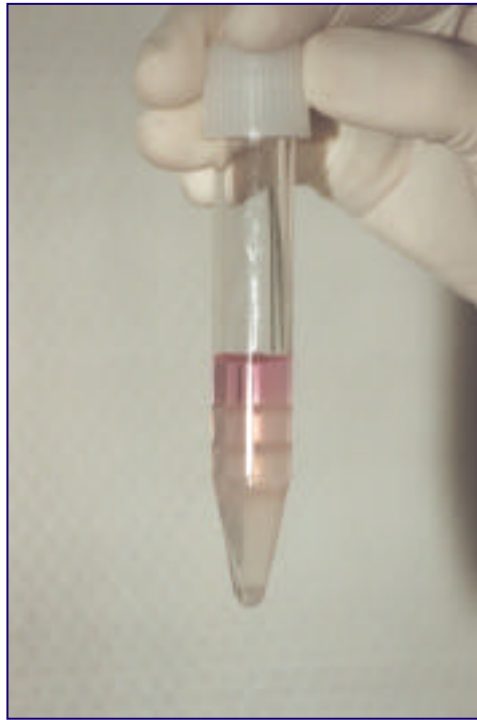
A la muestra de semen fresco se añade medio de cultivo *human tubal fluid* (HTF) (Anexo II) suplementado con albúmina sérica humana al 6% (*human serum albumin*. HSA: Grifols, Barcelona) en proporción 1:2. Se homogeneiza y se centrifuga a 400 g durante 10 minutos. El sobrenadante se extrae con una pipeta Pasteur mientras en el fondo cónico del tubo queda un sedimento formado por espermatozoides y por el resto de células del eyaculado. Este sedimento se resuspende en HTF/HSA.

7.2.3 Técnica de gradientes discontinuos de PureSperm®

Se parte de una solución isotónica de PureSperm®. Con HTF suplementado con HSA, y se realizan gradientes al 90, 70 y 50% de la solución madre de PureSperm®. En un tubo cónico se coloca 1 mL de cada concentración, de mayor a menor densidad, dejando caer cuidadosamente la fracción superior sobre la

inferior. El sedimento obtenido del primer lavado y resuspendido en 1 mL de HTF/HSA se coloca encima de la capa de 50% y se centrifuga a 300 g durante 20 minutos. Entre la densidad 1,1 y 1,14 se obtiene una muestra enriquecida en espermatozoides móviles libre de bacterias y otras células. En nuestro caso corresponde al gradiente de 90% (Figura 7.1).

Figura 7.1



Los espermatozoides inmóviles se quedan en la densidad de 1,06 a 1,09. Los espermatozoides móviles penetran en capas más densas debido a su velocidad progresiva. Durante la centrifugación todos los espermatozoides se alinean paralelos a la fuerza centrifuga y sus cabezas van hacia las capas más densas porque es la parte más pesada de la célula. Los espermatozoides inmóviles permanecen en la capa correspondiente a su densidad mientras que los móviles van a capas más densas por su movimiento progresivo (Gorus y Pipeleers, 1981). Para recuperar los espermatozoides móviles que se hallan en el fondo del tubo se eliminan las capas superiores hasta llegar a la de 90% y con ayuda de una pipeta Pasteur procedemos a la aspiración del sedimento, entre 0,3 y 0,5 ml aproximadamente de la capa de 90%.

7.2.4 Técnica de *swim-up*

El sedimento recuperado tras la centrifugación en gradientes de PureSperm® se coloca en un tubo estéril al que se añade 4 mL de HTF/HSA. Se resuspende y se fracciona en 4 tubos (1 mL por tubo). Los tubos se centrifugan a 200g durante 10 minutos, se extrae el sobrenadante y se añade 0,4 mL de HTF/HSA a cada uno de los tubos. Se deja que se realice el swim-up durante 1 hora (Figura 7.2).

Figura 7.2



Transcurrido este tiempo se recoge el sobrenadante donde estarán los espermatozoides móviles, la muestra obtenida se fracciona en dos partes iguales, una de ellas es para el estudio del VIH-1 por PCR y la otra mitad se utiliza para la inseminación intrauterina o para ICSI una vez se confirme por PCR la no evidencia de VIH-1.

7.3 Recuperabilidad espermática con la técnica del doble lavado

La Tabla 7.1 muestra las diferencias en porcentaje de recuperación cuando se compara el doble lavado aplicado a los pacientes seropositivos al VIH-1 con recuento espermático normal frente a la recuperación obtenida con las técnicas de PureSperm o swim-up aplicadas a los pacientes no seropositivos con recuento espermático normal. Los datos son presentados como medias \pm SD.

Tabla 7.1 Recuperabilidad espermática

	VIH-1 seronegativo		VIH-1 seropositivo	
	PureSperm®	Swim-up	PureSperm® + Swim-up	P
N	44	111	104	
Espermatozoides móviles totales en el semen fresco	154 \pm 147.6	139 \pm 131.7	123 \pm 105.9	NS
Espermatozoides móviles totales después de procesado	39.6 \pm 45.4	23.4 \pm 25.8	6.2 \pm 9.3	< 0.001
% Recuperado	28.9 \pm 18.1	17.1 \pm 10.3	6.8 \pm 7.7	< 0.001

7.4 Discusión

La cantidad de espermatozoides móviles normales recuperada de los sémenes de individuos VIH-positivos es significativamente menor que la que normalmente se recupera en los pacientes seronegativos que se someten a técnicas de reproducción asistida. El doble lavado implica mayor número de centrifugaciones, que generan radicales libres (Aitken y Clarkson, 1988). Esto causa la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide, provocando que la membrana sea más rígida, menos fluida, perjudicando a la movilidad y posiblemente reduciendo la fecundación (Jones *et al.*, 1979; Alvarez *et al.*, 1987). Si se perjudica la movilidad se reduce la recuperación.

Otros factores que pueden influir en la baja recuperación son el efecto gonadotóxico de la medicación antiviral o la influencia de estados más avanzados de la enfermedad en la calidad seminal.

Se pretende conseguir que la técnica de lavado sea lo más eficaz posible causando el menor daño posible a los espermatozoides. Cuando se realiza el primer paso de lavado se eliminan la mayor parte de los virus en su forma de RNA. La adición de medio de cultivo al semen provoca un efecto de dilución y, por lo tanto, se reduce la concentración de partículas virales, al igual que ocurre con las bacterias (Wong *et al.*, 1986, Karlström *et al.*, 1991). El plasma seminal es eliminado y con él probablemente los viriones (virus libre extracelular en forma de RNA). Según algunos autores, la proporción de sémenes de hombres seropositivos que presentan RNA-viral en el plasma seminal es entre un 62-96% (Tachet *et al.*, 1999). Para que los virus libres formasen parte del sedimento se debería centrifugar la muestra entre 100.000-160.000 g más de 10 minutos lo cual es de 250-400 veces más rápido que lo habitual.

El PureSperm® (producto de similares características a las del Percoll que es recomendado para su uso en humanos) se compone de partículas de sílice

coloidal de 15-30 nm de diámetro recubiertas de polivinilpirrolidona. El PureSperm® puede formar gradientes en un rango de densidades de 1,0-1,3 g/mL. La técnica de gradientes discontinuos con PureSperm® reduce considerablemente la concentración de virus, al igual que ocurre con las bacterias (Bolton *et al.*, 1986; Sun *et al.*, 1987). Los virus quedan retenidos en la capa superior de los gradientes, en nuestro caso por encima del gradiente de 50%. Se necesitaría una ultracentrifugación para que los virus penetrasen en las capas de PureSperm®. La viscosidad del PureSperm® impide el paso del virus. Además, los linfocitos B, T, macrófagos y células epiteliales quedan retenidos como máximo en la interfase entre el gradiente de 50 y 70 %; los espermatozoides inmóviles y células de espermatogénesis como máximo en la interfase entre el gradiente de 70 y 90%. Al quedar tan sólo el sedimento que se genera en el gradiente de 90% se consigue eliminar las posibles células que podrían tener integrado el DNA del virus, suponiendo que el espermatozoide no esté infectado por el virus. Se usan gradientes de 3 capas porque probablemente dan más seguridad a la hora de recuperar el sedimento libre de otras células que no sean los espermatozoides móviles. Además, los gradientes de tres capas parecen ser más efectivos que los de dos para eliminar el VIH-RNA (Chrystie *et al.*, 1998). La población de posibles leucocitos que se hallen en el semen quedará retenida como máximo en la interfase del gradiente de 50 y 70%, quedando en medio un gradiente de 70% que evitará posibles contaminaciones a la hora de recuperar el sedimento.

Aunque no se descarta la posibilidad de que las células de espermatogénesis y el mismo espermatozoide pueda ser infectados por el VIH, los leucocitos son la mayor fuente de VIH-proviral en semen (Byrn *et al.*, 1998). En el caso de que las células de espermatogénesis estuvieran infectadas por el virus, estas quedarían retenidas en las capas de PureSperm®. El segundo paso de lavado se realiza para eliminar los restos de PureSperm® de la muestra. La función del *swim-up* consiste en eliminar las posibles células que no sean espermatozoides móviles que hayan podido contaminar el sedimento del gradiente de 90%.

La necesidad de realizar el doble lavado para asegurar al máximo la eliminación del virus influye negativamente en la cantidad de espermatozoides disponibles para inseminar. Es necesario que estos pacientes tengan una calidad seminal inicial alta, puesto que después del doble lavado sólo se recupera el 6,8% de los espermatozoides móviles que hay en la muestra eyaculada.

8. □

Determinación del RNA y DNA

del VIH-1 en Semen Lavado

con la Técnica de PCR

8 DETERMINACIÓN DEL RNA Y DNA DEL VIH-1 EN SEMEN LAVADO CON LA TÉCNICA DE PCR

8.1 Introducción

Este capítulo describe el procedimiento normalizado de trabajo (PNT) número BM-MA-0019-5 propiedad del Laboratorio Dr. F. Echevarne cuyos finales responsables de su aplicación son el Dr. Joan Huguet y la Dra. Blanca Bermejo. Este procedimiento describe la metodología empleada para la detección de RNA del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, realizada simultáneamente con la detección de DNA provírico también por PCR, seguidas de una visualización de resultados mediante ELISA en placa, que permite una cuantificación de la cantidad de RNA de la muestra y una determinación cualitativa del DNA.

Se trabaja en muestras seminales lavadas (semen recuperado) para inseminación artificial o FIV-ICSI. El ámbito de aplicación de este PNT pertenece a la Unidad de Biología Molecular del Laboratorio F. Echevarne.

8.2 Procedimiento

8.2.1 Fundamento

El RNA del VIH-1 presente en la muestra es convertido a cDNA mediante una transcripción inversa y, posteriormente, amplificado mediante PCR usando cebadores marcados con biotina. El DNA provírico del VIH-1 es amplificado, del mismo modo, mediante PCR. Los amplificadores obtenidos mediante ambos procedimientos, se hibridan con sondas específicas unidas a los distintos pocillos de una placa microtiter de modo que, tras una visualización mediante un sistema conjugado-enzima/sustrato, puede determinarse su presencia y a la vez cuantificar el RNA inicial presente en la muestra.

8.2.2 Condiciones generales de trabajo y precauciones

A continuación se enumeran las condiciones básicas de trabajo:

- Trabajar en cámara de flujo laminar.
- Manipular las muestras siempre con guantes, un par para cada muestra.
- Pipetear siempre con puntas de pipeta para PCR.
- Mantener los tubos tapados (tanto muestras como reactivos), teniendo sólo abierto el que se esté usando.
- No tocar la boca de los tubos, ni el interior de los tapones.
- Evitar la dispersión de polvo de talco o almidón (según los guantes usados) del interior de los guantes cerca de las superficies de trabajo, material o en todo el interior de la cámara de flujo laminar.
- Pipetear los reactivos de forma que se observe visualmente que las puntas de pipeta no penetren en exceso en ellos, evitando al arrastre producido por adhesión de los mismos en el exterior de la punta.
- Trabajar en áreas de PCR según normas GLP (preparación de reactivos -1-, preparación de muestras -2-, amplificación -3- y detección de amplificadores -4-).

- La técnica está descrita para ser realizada en un solo día de trabajo. El resultado de algunas de las muestras remitidas debe informarse en un plazo máximo de 5 días (muestras para FIV-ICSI), mientras que los resultados de las muestras consideradas como urgentes deben entregarse dentro del tiempo máximo permitido por el protocolo de inseminación artificial (5,30 horas).

8.2.3 Obtención y preparación de las muestras

Para la realización del ensayo se envía al laboratorio semen recuperado (espermatozoides lavados, teóricamente sin virus libres, ni virus adheridos a los espermatozoides, ni células sanguíneas como linfocitos), congelado a -20°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) o refrigerado a 4°C .

8.2.4 Material

En el Anexo III se describe el material inventariable y fungible.

Preparación de Isopropanol frío: dispensar Isopropanol de calidad analítica en una botella estéril, de 100 mL de capacidad, y refrigerar a -20°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) para su uso.

Preparación de Etanol al 70% frío: dispensar 70 mL de Etanol absoluto de calidad analítica, a una botella estéril de 100 mL de capacidad, y 30 mL de agua destilada estéril. Mezclar por inversión. Refrigerar a -20°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) para su uso.

8.2.5 Método

Teniendo en mente que la técnica de PCR puede presentar problemas técnicos, y con la intención de eliminar posibles falsos negativos, se realizan dos determinaciones completas e independientes del DNA (Hammer *et al.*, 1993). Un resultado positivo en cualquiera de las dos determinaciones invalida la muestra de semen para su uso en TRA.

8.2.5.1 DNA

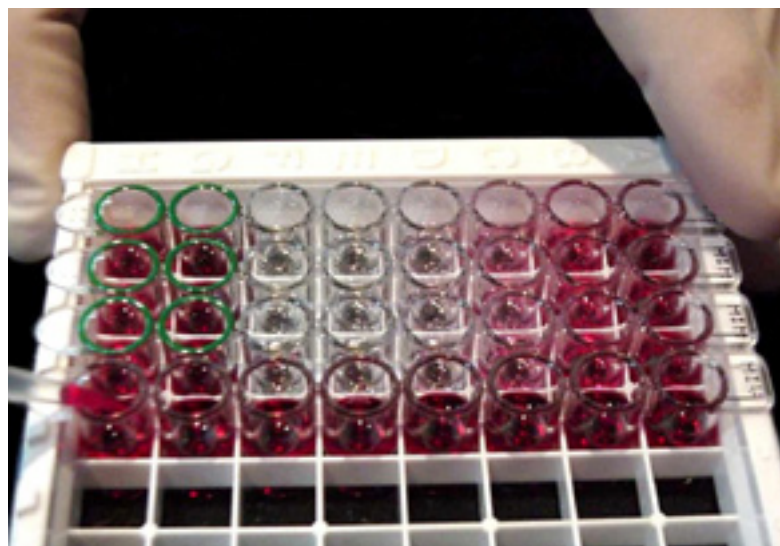
La amplificación del DNA proviral del VIH-1 por PCR se realiza mediante el equipo *Amplicor HIV-1* (Roche Diagnostic System, Inc., Branchburg, NJ, EE.UU.). Se dispensan 0,4 mL de la muestra de semen lavado en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se añaden 0,8 mL de solución salina estéril. Se centrifuga 3 minutos a 14.000 r.p.m. en una centrifuga de sobremesa. El sobrenadante se aspira; al sedimento se le añade 1 mL de solución salina y se resuspende mediante vórtex. Se realiza otro paso de centrifugación igual que el anterior. El sedimento obtenido se resuspende en 250 µL de tampón de extracción (conteniendo proteinasa K) suplementado con 40 mM de dithiothreitol (DTT). Se rotulan 4 tubos eppendorf de 0,5 mL y se añaden 200 µL del sedimento resuspendido al primer tubo. Los restantes 50 µL, se añaden al segundo tubo que contiene 150 µL del tampón de extracción suplementado con DTT. El tercer tubo contiene 200 µL de tampón de extracción suplementado con DTT y 50 µL de linfocitos infectados con VIH-1, como control positivo. De la misma forma, el cuarto tubo, como control negativo, contiene 200 µL de tampón de extracción suplementado con DTT y 50 µL de linfocitos de un individuo sano. Los cuatro tubos son incubados a 60°C durante 60 minutos y a 95°C durante 15 minutos en un Minicycler™ (MJ Research, Inc., Watertown, Massachussets, USA). La eficiencia del método de extracción se evalúa para cada lote de reactivos, mediante amplificación de una secuencia genómica común (HLA-DR o beta-actina).

La PCR se realiza añadiendo 50 μ L del sobrenadante de cada uno de los tubos, a una segunda serie de tubos eppendorf de 200 μ L que contienen 50 μ L de master mix con los cebadores biotinilados SK462 y SK431, delimitantes de una región del gen *gag* del VIH-1, según las instrucciones de ROCHE, en un termociclador Perkin Elmer 9600 (Perkin Elmer, Corp., Norwalk, EE.UU.) de acuerdo con el siguiente programa:

		50°C	2'	
5 X	–	95°C	10"	–
	–	55°C	10"	–
	–	72°C	10"	–
30 X	–	90°C	10"	–
	–	60°C	10"	–
	–	72°C	10"	–
		72°C	15'	

Finalizada la amplificación y tras una desnaturalización química de los amplificadores se realiza la hibridación, en una placa microtiter que contiene la sonda específica SK102 (Figura 8.1).

Figura 8.1



La detección se lleva a cabo mediante ELISA (conjugado: avidina-HRP y sustrato: TMB). El resultado de la reacción se lee a 450 nm, en un fotodensitómetro ANTHOS. Se considera positivo si la densidad óptica de las muestras es mayor o igual a 0,200 unidades. Este ensayo está diseñado para detectar al menos 10 copias de VIH-1-DNA.

8.2.5.2 RNA

La cuantificación del RNA del VIH se realiza mediante el equipo *HIV-1 MONITOR* (Roche Diagnostic, Inc., Branchburg, NJ, EE.UU.).

En un tubo eppendorf de 1,5 mL, se dispensan 200 µL de espermatozoides móviles lavados y 600 µL de tampón de lisis (Tiocianato de Guanidina) que contiene el RNA estándar de cuantificación (EC). El RNA es precipitado mediante Isopropanol frío y, posteriormente, lavado con Etanol al 70%. La transcripción a cDNA y posterior amplificación se realiza por medio de la rTth polimerasa y los oligonucleótidos biotinilados SK462 y SK431 como cebadores. El programa de amplificación es el siguiente:

		50°C	2'	
		60°C	30'	
8 X	–	95°C	10"	–
	–	52°C	10"	–
	–	72°C	10"	–
23 X	–	90°C	10"	–
	–	55°C	10"	–
	–	72°C	10"	–
		72°C	15'	

Finalizada la amplificación por PCR y después de una desnaturalización química, la hibridación se realiza en una placa microtiter con la sonda específica

SK102 del VIH-1 (unida a los pocillos A-F) y la sonda específica CP35 del EC (unida a los pocillos G-H). Para obtener resultados cuantitativos se realizan diluciones seriadas (de factor 5x) de los amplificados en los distintos pocillos de la placa. La detección, como en el caso del DNA, se realiza mediante ELISA (conjugado avidina-HRP y TMB). Los resultados se evalúan mediante lectura fotodensitométrica a 450 nm.

La concentración de RNA del VIH-1 presente en la muestra se calcula matemáticamente en relación a la del RNA del EC. La sensibilidad del ensayo es de 200 copias RNA-VIH-1 por mL de muestra.

8.2.6 Interpretación de los resultados

8.2.6.1 Resultados de DNA

Para que el resultado de la PCR sea válido, el control positivo debe dar una densidad óptica superior a 2,000. Es posible una degradación parcial del control positivo una vez abierto (posible absorbancia inferior a 2,000).

El control negativo debe dar una densidad óptica inferior a 0,250. En caso de obtenerse un resultado superior, el resultado se considera inválido y debe repetirse la determinación.

Las muestras se consideran positivas límite si son iguales o superiores a una densidad óptica entre 0,250 y 0,600. Las muestras son consideradas positivas claras si la densidad óptica es superior a 0,600. Los resultados son expresados cualitativamente, como positivos o negativos.

8.2.6.2 Resultados de RNA

Para cada muestra, al menos uno de los pocillos del control de cuantificación interno (EC) debe dar una densidad óptica mínima de 0,300. Para cada muestra se selecciona el pocillo con la menor densidad óptica entre 0,200 y 2,000 en los seis primeros pocillos (A-F) de la placa microtiter. Para cada pocillo de control de cuantificación interno se selecciona el de menor densidad óptica entre 0,300 y 2,000 en los dos pocillos siguientes (G-H). A cada densidad óptica seleccionada se le debe restar el valor de background (0,07).

El valor de la densidad óptica del pocillo seleccionado de cada muestra, se multiplicará por su factor de dilución (1,A - 5,B - 25,C - 125,D - 625,E - 3125,F). El valor de la densidad óptica del pocillo seleccionado del EC, se multiplicará por su factor de dilución (1,G - 5,H).

Se dividen los dos productos obtenidos (Muestra / EC) y el resultado se multiplica por **40** (factor de corrección de la dilución de la muestra inicial) y por el **valor** "*imput QS copies per PCR reaction*" que viene dado en cada lote de reactivos (cantidad de RNA de cuantificación añadido a la reacción PCR).

El valor resultante es la cantidad de copias de HIV-1 por mililitro de muestra.

Si la densidad óptica en el primer pocillo (A) de la muestra es inferior a 0,200 de absorbancia, el resultado a informar es: "Negativo, inferior a 200 copias/mL", y no se realiza el cálculo numérico.

La técnica no es válida si todos los estándares internos dan resultados inferiores a 0,300 o superiores a 2,000.

La técnica no es válida si los pocillos de muestra y estándar interno no presentan una disminución gradual y proporcional en las densidades ópticas de las diluciones seriadas. Hay que tener presente que valores muy elevados

8. Determinación del RNA y DNA del VIH-1 con la técnica de PCR en semen lavado

(superior a 3,000) o muy bajos (inferiores a 0,200), no presentarán un patrón de disminución proporcional; ello no invalida el ensayo.

8.3 Resultados

La Tabla 8.1 muestra los valores de absorbancia obtenidos en los productos amplificados.

Tabla 8.1 Valores de absorbancia (450 nm)

	Media	SD	Mínimo	Máximo
Controles negativos	0,051	0,038	0,018	0,128
Controles positivos	3,062	0,408	2,300	>3,500
Muestras negativas	0,055	0,042	0,016	0,145
Muestras positivas	1,537	0,358	1,051	2,200
Muestras dudosas	0,404	0,132	0,267	0,585

En la Tabla 8.2 se muestran los resultados de la determinación del DNA y el RNA del VIH-1 en las muestras de semen lavadas.

Tabla 8.2 Resultados obtenidos en los ensayos PCR-DNA y PCR-RNA ($n = 610$)

Muestras	VIH-1 DNA	VIH-1 RNA	%
588	NEGATIVO	NEGATIVO	96,4
14	POSITIVO	NEGATIVO	2,3
7	NEGATIVO	POSITIVO	1,1
1	POSITIVO	POSITIVO	0,2

8.4 Discusión

Aun realizando todo el proceso anteriormente descrito en el apartado 7, se han detectado un 3,6% de positivos en la muestra recuperada. Estos resultados positivos pueden ser debido a varias causas:

1. Que se haya contaminado la muestra cuando se manipulaba.
2. Que el método de detección por PCR haya dado falsos positivos (Martín, 1994).
3. Que el VIH-1 esté infectando a los espermatozoides o pegado a sus membranas (Dussaix *et al.*, 1993; Muciaccia *et al.*, 1998).

La existencia de falsos positivos es una posibilidad debido a que es difícil imaginar que restos de plasma seminal y/o células infectadas por el VIH-1 puedan permanecer en la muestra una vez sometida al doble lavado. En varios casos se obtuvieron resultados negativos cuando la técnica de PCR se repitió en la otra mitad de la muestra de semen que no fue usada para IAC o ICSI. En dos casos, el resultado de la PCR volvió a dar positivo en la otra mitad de la muestra, pero fue negativo en otras muestras de semen recogidas a los pocos días. Estos casos de posible contaminación durante la manipulación o de falsos positivos no suponen un riesgo para los pacientes puesto que en ambos casos el semen lavado se invalida para su uso en TRA. Un reciente estudio multicéntrico avala el método de detección de Roche empleado en este estudio para la cuantificación del RNA del VIH-1 en plasma seminal (Fiscus *et al.*, 2000). Este método muestra una sensibilidad y una especificidad del 100% en laboratorios con experiencia.

La posible presencia del VIH-1 en la fracción fértil del semen, los espermatozoides móviles, es motivo de arduo debate. Los estudios publicados sobre la posible presencia intraespermática del VIH-1 llegan a conclusiones dispares (ver Tabla 3.7 en el apartado de Antecedentes). La no concordancia en los resultados obtenidos puede ser debida a factores tales como el estadio del

SIDA de los pacientes estudiados, los trabajos publicados no son homogéneos en este punto o simplemente no lo mencionan. En cuanto a la muestra sobre la que se aplica la técnica de PCR se pueden encontrar diferencias debidas a que algunos autores realizan centrifugación en gradientes discontinuos, otros sólo *swim-up* y otros la combinación de ambos métodos. Otro factor no homogéneo de discordancia es la técnica de PCR en sí: los cebadores, los métodos de extracción del RNA viral, los métodos de amplificación del DNA viral o los métodos para evitar la contaminación y consecuentemente los falsos positivos son diferentes en cada estudio.

Otro punto controvertido relacionado con la presencia del VIH-1 en el espermatozoide humano es si la membrana espermática tiene receptores CD4+. Se ha postulado que la molécula galactosil ceramida presente en las membranas espermáticas podría actuar como receptor para el VIH-1 (Baccetti *et al.*, 1998; Brogi *et al.*, 1998) (ver Tabla 3.8 en el apartado de Antecedentes). El VIH-1 penetra la célula infectada en estado de RNA. EL RNA viral se transforma en DNA por acción de la enzima transcriptasa inversa. La detección de VIH-1 en estado de DNA puede ser debida a transcripción inversa parcial dentro del virión (Lori *et al.*, 1992; Zheng *et al.*, 1993). Es difícil imaginar la posible integración del DNA viral en el genoma espermático si éste entra en el espermatozoide. El espermatozoide es una célula haploide con cromosomas inactivos y condensados. Si el VIH-1 entrara en los espermatozoides, se detectaría en su forma de RNA, puesto que en esa fase del ciclo se encuentra en esta forma. Si el VIH-1 entra en los espermatozoides móviles y fértiles, como afirma Baccetti *et al.* (1999), ésta sería considerada una vía de transmisión específica. No existen evidencias clínicas de este hecho. Si los espermatozoides fértiles introdujeran el virus en el interior de ovocitos maduros y se formara un embrión, el embrión se infectaría, y así el feto y el futuro niño. Ningún dato clínico sustenta esta hipótesis.

De acuerdo con todo lo expuesto, parece lógico pensar que el VIH-1 no penetra en los espermatozoides fértiles, y si lo hace, sería incapaz de infectar al ovocito-

embrión-feto-niño. La posible explicación para los resultados positivos obtenidos usando la técnica de PCR es la no eliminación total del plasma seminal o de células infectadas, o la presencia de falsos positivos.

9. □

Aplicación de Técnicas
de Reproducción Asistida
en Parejas con Hombre
Seropositivo al VIH-1

9 APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN PAREJAS CON HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1

9.1 Inseminación Artificial Intrauterina

9.1.1 Estudio previo de la mujer

9.1.1.1 Revisión ginecológica

El objetivo de la práctica de la IA-IU, es conseguir la gestación de la mujer en ese ciclo. Por tanto, es preciso constatar la integridad orgánico-funcional del aparato genital femenino, o lo que es lo mismo, descartar cualquier alteración que impida o disminuya la posibilidad de embarazo.

La exploración básica consiste en:

1. Exploración de genitales externos e internos
2. Exploración mamaria
3. Citología
4. Ecografía vaginal
5. Histerometría

Algunas exploraciones se pueden evitar si se han realizado dentro del año previo a la IA y se dispone de informe.

9.1.1.2 Exploración de la integridad anatómica y funcional útero-tubárica

1. Ecografía vaginal. Como exploración básica en todos los casos, permite observar las características de útero y ovarios. Permite diagnosticar o sospechar la mayoría de las patologías: ovarios poliquísticos,

- endometriosis, hidrosalpinx, tumores (leiomiomas, quistes, etc.), malformaciones uterinas, etc..
2. Histerosalpingografía (HSG). Es una prueba clásica que permite visualizar el contorno de la cavidad uterina y de las trompas de Falopio. Se observa también el paso de contraste al abdomen de forma seriada. No se trata de una prueba definitiva, ya que presenta un número destacado de falsos positivos que no se detectan posteriormente al realizar laparoscopia con cromoperturbación. Está particularmente indicada cuando hay antecedentes de cirugía abdominal, infecciones pélvicas o tuberculosis. Para muchas pacientes esta exploración resulta notablemente dolorosa. En una propuesta de 4 ciclos de IA se podría obviar en el primer o en los dos primeros ciclos en pacientes que hayan tenido hijos y/o no presenten antecedentes de riesgo.
 3. Sonohisterosalpingografía. Permite una buena visualización de la cavidad uterina y se puede objetivar el paso de líquido a peritoneo. No resulta posible definir el contorno de las trompas. Puede ser difícil precisar si el paso de líquido es debido a la permeabilidad de una trompa o de las dos. Suele resultar mucho menos molesta que la HSG.
 4. Histeroscopia. Permite diagnosticar y tratar anomalías de la cavidad uterina como pólipos, miomas, tabiques, sinequias, etc.. Cuando se observa alguna malformación, se debe completar el estudio con laparoscopia. La faloscopia sería una variante que consistiría en introducir por vía histeroscópica un pequeño endoscopio a través del ostium tubárico para visualizar las trompas de Falopio. Su utilización actual en la clínica es casi nula.
 5. Laparoscopia. Es el complemento definitivo para confirmar el diagnóstico cuando se observan anomalías en las exploraciones anteriores. Permite el tratamiento de determinadas patologías:

endometriosis, adherencias, quistes ováricos, miomas subserosos, etc.. Es posible diagnosticar la permeabilidad tubárica inyectando colorante a la cavidad uterina. La salpingoscopia es una variante que consiste en introducir por vía laparoscópica un pequeño endoscopio para visualizar las porciones fimbria y ampular de la trompa. La utilidad de esta última técnica es dudosa.

6. Permeabilización del cérvix. En una exploración previa a la realización de la IA, puede resultar conveniente comprobar el paso del cérvix. Esta simple maniobra, que se puede hacer con una cánula similar a las de inseminación o con un histerómetro, permite descartar una posible estenosis.

9.1.1.3 Estudio de la función ovárica

En mujeres de menos de 35 años con ciclos regulares (de 26 a 36 días) es difícil que se presenten anomalías de la ovulación.

En mujeres que presenten síndrome de ovario poliquístico, al realizar el tratamiento adecuado de inducción de la ovulación, ya se solucionará el problema.

La función ovárica se puede estudiar también con las pruebas siguientes:

1. Temperatura basal. Es una prueba sencilla pero pesada para muchas mujeres.
2. Determinación de progesterona en segunda fase. Una mujer con ovulación normal ha de tener una progesterona plasmática de como mínimo 10 ng/mL en día +6 a +8. Esta determinación es simple y altamente fiable. Valores inferiores a 10 indican fase lútea insuficiente y valores de menos de 3 son propios de anovulación.

3. Biopsia de endometrio. Efectuada en los mismos días que la determinación de progesterona. Parece poco útil en un protocolo de IA.
4. Test basal. Consiste en la determinación de FSH, LH y 17-β estradiol en el día 3 del ciclo. Esta prueba está indicada en mujeres a partir de 35 años o de menos edad cuando se sospeche un fallo ovárico oculto. Valores de FSH inferiores a 10 pg/mL y de 17-β estradiol de como máximo 30 pg/ml demuestran una reserva ovárica suficiente. En casos de valores superiores resulta conveniente completar el estudio con la inhibina B, que en situaciones de normalidad ha de ser superior a 45 pg/mL.

9.1.2 Estimulación de la ovulación

Todas la IA-IU se realizan en ciclo estimulado. Todos los datos parecen confirmar que con un desarrollo folicular más numeroso o, lo que es lo mismo, con una mayor oferta de ovocitos, la probabilidad de conseguir la gestación es mayor. Por otro lado, la estimulación ovárica corregiría pequeñas alteraciones ovulatorias, difíciles de detectar con los métodos actuales de control de la foliculogénesis y ovulación.

En función de los datos obtenidos en el estudio previo, el inicio del tratamiento para la IA se efectúa por regla general el 3^{er} día de la menstruación. Según las características individuales de cada mujer, se decide el día de inicio de la estimulación y la dosis de hormonas. Habitualmente se utiliza FSH recombinante (Gonal-F , Serono, España) por vía subcutánea.

Los controles ováricos se inician a los 3-4 días de haber empezado el tratamiento. Consisten en determinación en sangre de 17-beta-estradiol, ecografía transvaginal de alta definición para valorar el número y el crecimiento folicular y grosor endometrial; y valoración reológica del moco cervical. En función de los resultados, se mantiene o varía la pauta de tratamiento y se indica la fecha del nuevo control. En el momento en que los controles indican que se han obtenido las condiciones foliculares y hormonales adecuadas, se

interrumpe la administración de FSH, y se inyecta por vía i.m. o s.c. una dosis ovulatoria de hCG (Profasi HP 10.000, Serono, España), que provocará la ovulación. Esta medicación se inyecta, habitualmente, 34-36 horas antes de la IA.

En general, se considera oportuno desarrollar entre 1 y 4 folículos de 16 mm ó más el día de la hCG. Algunos autores sitúan el límite en tres folículos en vistas de evitar la gestación múltiple.

Si se desarrollan más folículos de los considerados como límite, se puede optar por: a) cancelar el ciclo; b) efectuar una reducción folicular hasta tener la cifra deseada; c) convertir el ciclo de IA en FIV. En caso de riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica es mejor optar por la cancelación, o bien realizar una FIV, congelar los embriones y transferirlos en un ciclo siguiente.

9.1.3 Inseminación

El ginecólogo fija el día de la ovulación y, por tanto, de la IA según los criterios citados en el apartado 9.1.2.

El día de la IA el hombre aporta el semen en recipiente facilitado por el centro. Las condiciones de recogida del semen son las habituales (Anexo IV). El semen, una vez licuado, se somete al proceso de doble lavado descrito en el apartado 7. De la fracción de espermatozoides móviles recuperada en medio de cultivo, la mitad se envía al Laboratorio del Dr. F. Echevarne para determinar si hay VIH-1 tanto en su forma de RNA como DNA (Apartado 8). Una vez conocido que el resultado del estudio de VIH-1, en el semen, es negativo, el ginecólogo procede a inseminar a la mujer con la mitad restante de la fracción de espermatozoides móviles recuperados, empleando una cánula de inseminación (Gynetic IUI, Gynetic Medical Products, Bélgica).

La inseminación se realiza en la consulta ginecológica, de forma totalmente ambulatoria. Es un proceso fácil e indoloro. Con la paciente en posición ginecológica y después de colocar espéculo vaginal, se procede, si es necesario a la limpieza de secrecciones. Seguidamente se introduce por el cérvix la cánula de inseminación. Una vez atravesado el cervix, y cuando se tiene la evidencia de que el extremo distal de la cánula se encuentra en cavidad uterina, se inyecta el semen. Toda la maniobra se realiza con la máxima delicadeza evitando cualquier sangrado o traumatismo. El procedimiento se puede facilitar haciéndolo ecoguiado por sonda abdominal. Transcurridos 15 minutos en reposo, la paciente puede reiniciar su actividad normal.

En la práctica, el hombre entrega la muestra de semen sobre las 8 horas de la mañana. La inseminación se efectúa sobre las 18 horas del mismo día, una vez que el laboratorio ha informado de que el estudio de RNA y DNA del VIH-1 por PCR ha sido negativo.

9.1.4 Soporte de fase lútea

Parece mejor suplementar la fase lútea a partir del momento de la ovulación con progesterona micronizada vaginal a dosis de 100-200 mg cada 12 horas.

A los 7 días de la ovulación, se realiza determinación de 17- β -estradiol y progesterona plasmáticas (con resultado en el día), para incrementar si fuera necesario, la medicación de apoyo antes comentada. A los 14 días de la IA se cita a la paciente para realizar una determinación de β hCG en sangre que nos confirmará o no la gestación.

9.1.5 Seguimiento de las mujeres inseminadas

La mujer inseminada se debe efectuar entre 25 y 35 días después de la IA, determinación de RNA y DNA del VIH-1 por PCR. Este control se ha de hacer haya quedado gestante o no. El tiempo medio entre la infección y la aparición de los AcVIH-1 es de 2 meses; en el 90% de pacientes aparecen los AcVIH-1 (se han seroconvertido) antes de los 6 meses (Horsburgh *et al.*, 1989). La determinación de AcVIH no es un índice fiable para detectar precozmente un posible contagio de VIH-1 (En la mujer que se ha contagiado pero aún no se ha seroconvertido, es decir su sistema inmune no ha producido anticuerpos, la determinación de anticuerpos será negativa a pesar de estar infectada). La determinación en sangre del RNA y DNA del VIH-1 dará positiva en estas mujeres, mucho más precozmente, que la de Ac. VIH-1. En este estudio interesa de manera especial determinar ante un hipotético contagio de VIH-1 si la vía de entrada del virus fue la IA o no.

En caso de que la mujer tras la IA no quedase gestante, se repite la metodología descrita. En caso de que haya quedado gestante, se hace un segundo control a los tres meses de gestación, un tercer control a los seis meses, y un cuarto control tras el parto, tanto de la madre como del hijo. Estos controles del VIH-1 se hacen mediante determinación de anticuerpos anti-VIH-1.

9.1.6 Resultados

La Tabla 9.1 muestra los resultados obtenidos con la aplicación de IA.

Tabla 9.1 Resultado de las IA

Ciclos de IAC (<i>n</i> = 444; 100%)	
Mujeres inseminadas	229
Ciclos/mujer	1,94
Gestaciones clínicas	117
Gestaciones/ciclo	26,3%
Gestaciones/mujer	51,1%
Abortos	10 (8,5%)
Nacimientos	86
Partos gemelares	17 (19,8%)
Niños nacidos	103
Gestaciones en curso	21

Todos los controles de PCR y anticuerpos anti-VIH-1 realizados en las madres y en los niños nacidos han dado resultado negativo.

La Tabla 9.2 muestra los resultados de gestación según la edad de la paciente. Las pacientes con 35 o más años presentan una disminución estadísticamente significativa en la probabilidad de gestación ($P < 0,05$).

En la Tabla 9.3 se puede ver la edad de las mujeres gestantes y no gestantes.

Tabla 9.2 Resultados de IA según la edad de la mujer

Edad años	Ciclos n	Gestaciones	
		n	%
Menos de 30	155	41	26,4
30-34	199	60	30,1
35-39	83	16	19,3
40 ó más	7	0	0

Tabla 9.3 Edad de la mujer según el resultado de la IA

	Gestantes	No gestantes	P
Edad media \pm SD	30,78 \pm 3,29	31,45 \pm 4,02	0,013
Edad máxima	38	43	
Edad mínima	21	19	

La Tabla 9.4 muestra la media de espermatozoides móviles totales inseminados en las pacientes gestantes y no gestantes.

Tabla 9.4 Espermatozoides inseminados según el resultado de la IA ($\times 10^6$)

	Gestantes	No gestantes	P
Recuento medio \pm SD	8,221 \pm 11,70	6,683 \pm 9,43	0,021
Recuento máximo	77,625	55,290	
Recuento mínimo	0,532	0,427	

La Tabla 9.5 presenta las gestaciones obtenidas según el estado clínico del hombre.

Tabla 9.5 Resultado de las IA según el estadio clínico del hombre

	A1, A2, B1, B2	A3, B3, C1, C2, C3	P
Ciclos	298	146	
Gestaciones	90	27	
Gestaciones/ciclo	30,2%	18,5%	< 0,01

El Gráfico 9.1 muestra el porcentaje de ciclos que se han realizado según el estadio de la infección del hombre.

Gráfico 9.1

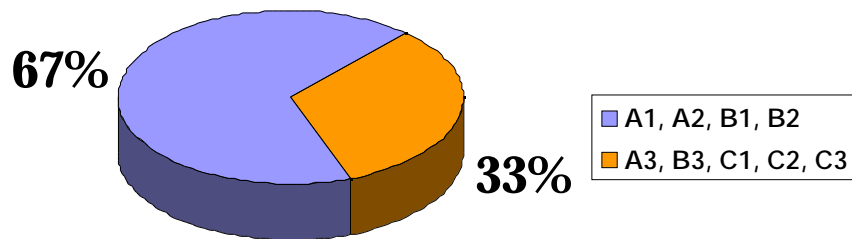


Tabla 9.6 Resultados de IA según la terapia antirretroviral

Tratamiento antirretroviral	Ciclos n	Gestaciones n	%	P
No tratamiento	83	22	26,5	
Sí tratamiento	361	95	26,3	NS
Total	444	117	26,3	
Sólo ITI	174	49	28,2	
ITI + IP	187	46	24,6	NS
Total	361	95	26,3	

En la Tabla 9.6 se presentan los resultados de gestación según la terapia antirretroviral.

9.1.7 Discusión

El riesgo de que una mujer se contagie en un episodio de exposición por la practica de coito vaginal no protegido con un hombre seropositivo al VIH-1 está evaluado en 0,3 - 2% (Zunzunegui *et al.*, 1992; Mastro y de Vincenzi, 1996). El riesgo de que la mujer se contagie a través de la IA (según la técnica descrita) no se conoce, no está evaluado. Es uno de los objetivos de este estudio. No obstante los datos y conocimientos expuestos permiten preveer con fundamento sólido que la IA reduce claramente el riesgo de contagiar a la mujer dejándola gestante. En síntesis los hechos a favor de la IAC en relación con el coito son:

1. En la IA la mujer recibe sólo espermatozoides móviles. No recibe plasma seminal ni células presentes en el semen como linfocitos CD4+. En el coito la mujer recibe el semen completo.
2. En la IA sabemos que en la fracción de espermatozoides móviles no se ha detectado RNA ni DNA del VIH-1 por la técnica más sensible que existe, la PCR. En el coito no es posible conocer si el semen que recibe la mujer está infectado de VIH-1 o no.
3. En la IA se consigue el embarazo antes, en un número de ciclos menor que con el coito, lo que también reduce la posibilidad de contagio (Johnson, 1988). Es lógico deducir que la IA comporta claramente menor riesgo de contagiar el VIH-1 que el coito sin protección.
4. En nuestra experiencia las parejas serodiscordantes tienen dos características, son parejas muy unidas y con un fuerte deseo de tener hijos propios. Esto induce a estas parejas en más de una ocasión a efectuar coito sin preservativo para tener el hijo deseado si no se les da otra opción.

Las IA en parejas serodiscordantes al VIH (marido seropositivo) tienen la particularidad de que la indicación no puede incluirse, en la mayoría de los casos, en ninguna de las indicaciones que hasta ahora eran reconocidas como indicaciones para la IA. No se trata de inseminaciones por baja calidad seminal, y en la mayoría de los casos tampoco por indicación femenina (cervical, uterina, endometriosis, disfunciones ovulatorias...); tampoco se trata de IA por causa desconocida. Se debe incluir un nuevo *item* en las indicaciones para efectuar IA.

El hecho de que en este tipo de inseminaciones en la mayoría de los casos no hay problemas femeninos, puede cuestionar la necesidad de inducir un desarrollo folicular múltiple. La mayoría de estas mujeres son fértiles, no han quedado embarazadas porque no han recibido semen.

Una revisión bibliográfica de los resultados publicados en la literatura apunta que los resultados de IA en ciclo no estimulado proporcionan un porcentaje de embarazo por ciclo de aproximadamente el 4,6%. Esta misma estimación proporciona en ciclos estimulados con citrato de clomifeno una tasa media de gestación por ciclo del 11,8%; y en ciclos estimulados con hMG una tasa del 17,7% (Pellicer y Cano, 1995). Una mayor oferta folicular aumentará las posibilidades de gestación por ciclo y reducirá el número de ciclos. Dado que el riesgo de contagio por inseminación con semen lavado no es conocido (hasta ahora es cero) es lógico reducir el número de posibles contactos en caso de no eliminación total del virus. Con el desarrollo folicular múltiple se aumenta la tasa de gestación por ciclo y se reduce el número de ciclos que una mujer requiere para quedar gestante. Se calcula que las mujeres tratadas con inseminación intrauterina en ciclos estimulados con gonadotropinas tienen un probabilidad 3,2 veces mayor de quedar gestantes que las mujeres sometidas a inseminaciones intracervicales; y una probabilidad 2 veces mayor de quedar gestantes que las sometidas a ciclos estimulados e inseminación intracervical o las sometidas a ciclos naturales e inseminación intrauterina (Guzick *et al.*, 1999)

El embarazo múltiple es el gran enemigo del desarrollo folicular múltiple. En IA el riesgo de embarazo múltiple se estima en un 17% (Nuojua-Huttunen *et al.*, 1999), este porcentaje puede variar según una postura más o menos agresiva en la estimulación o en los criterios para cancelar el ciclo. Mujeres jóvenes (< 30 años) normoovuladoras que desarrollen más de 6 folículos con niveles de estradiol >1000 pg/mL en ciclos estimulados con gonadotropinas presentan estadísticamente un mayor riesgo de gestación múltiple (Valbuena *et al.*, 1996).

Aplicando los protocolos de inducción de la ovulación se consigue aumentar la tasa de gestación por ciclo y se reduce el número de ciclos por mujer hasta conseguir la gestación. De esta forma se reduce el número de posibles contactos de riesgo que estén por debajo del límite de sensibilidad de la técnica de PCR.

De Geyter *et al.*, (1998) defienden la realización de aspiración folicular para prevenir la poliovulación y, así, reducir las tasas de cancelación y los embarazos múltiples. Este procedimiento se ha realizado en 2 pacientes de este estudio.

Los buenos resultados obtenidos en estas pacientes son debidos a que la mayoría de mujeres (casi un 80%) son menores de 35 años y fértiles.

El número total de espermatozoides móviles inseminados es significativamente mayor en el grupo de pacientes que quedaron gestantes. Estos mismos resultados se observan en las pacientes sometidas a IA con otras etiologías de esterilidad (Huang *et al.*, 1996).

Aunque en el estudio de calidad seminal no observamos diferencias estadísticamente significativas según el estadio de la enfermedad, sí que observamos diferencias significativas en los resultados de las inseminaciones. En estos pacientes se puede aplicar el tópico de que no es lo mismo un semen normal y un semen fértil. Aunque no hemos observado diferencia estadística en los parámetros de calidad seminal estudiados, sí que se observa mayor probabilidad de gestación en los pacientes seropositivos al VIH-1 que no han

desarrollado el SIDA (estadios A1, A2, B1 y B2) en relación con los pacientes afectados de SIDA (estadios A3, B3, C1, C2 y C3).

Aunque los pacientes sometidos a terapia antirretroviral presentaban una mayor proporción de sémenes que no cumplían los requisitos definidos de calidad seminal, este hecho no se traduce en los resultados de las inseminaciones debido a que muchos de estos pacientes son descartados para IA y se les efectúa FIV-ICSI.

9.2 Fecundación *in vitro* con inyección espermática intracitoplasmática (FIV-ICSI)

La fecundación *in vitro* con técnica de microinyección se aplica como primera técnica en mujeres que presentan obstrucción tubárica y en los casos en los que después del doble lavado de semen no se recuperan suficientes espermatozoides móviles para realizar una IA con garantías de éxito. En los pacientes que se han realizado 3 ó 4 ciclos de IA sin éxito también se recurre a la FIV-ICSI. Ésta es una técnica que también se puede utilizar como recurso en los pacientes en los que tras la estimulación ovárica la respuesta folicular ha sido excesiva.

9.2.1 Estimulación de la ovulación

La estimulación del desarrollo folicular múltiple se realiza mediante la administración de análogos agonistas de la GnRH (Procrin , Abbott, España) y de FSH urinaria ultrapura en algunos casos y recombinante en otros (Neo-Fertinorm® y Gonal-F , Serono, España). La respuesta ovárica es monitorizada mediante ecografía transvaginal y determinación seriada de niveles plasmáticos de 17-β estradiol con resultado en el día. Una vez que los folículos han alcanzado un estado madurativo óptimo según criterios del ginecólogo, se administra 10,000 UI de hCG (Profasi-HP , Serono) 36 horas antes de realizar la punción folicular ecoguiada. En el caso de que se alcancen niveles de estradiol plasmático superiores a 3,000 pg/mL se administran 5,000 UI de hCG en lugar de 10,000 UI. En las pacientes con una concentración de estradiol en sangre mayor de 4,000 pg/mL se realiza "*coasting*" para reducir los posibles riesgos de desarrollar un síndrome de hiperestimulación ovárica. La Figura 9.1 muestra una imagen ecográfica del aspecto de un ovario estimulado para un ciclo de FIV.

Figura 9.1



9.2.2 Extracción de los ovocitos

La punción folicular se realiza ecográficamente con un ecógrafo B&K Medical (Panther 2002), sonda vaginal y aguja de punción ovárica ecogénica y desechable de 17G (Labotect 324107, Labor-Technik, Alemania). La succión del líquido folicular se realiza mediante bomba de aspiración automática (Craft Duo-Vac Suction Unit, Rocket, Reino Unido). El líquido se aspira en tubos de 10 mL (Falcon 352001) conteniendo 1 mL de HTF/HEPES precalentado a 37 °C en un sistema de calentatubos (Multi-Block Heater, Lab-Line Instruments, EE.UU). Todo el proceso se realiza bajo sedación con propofol (Propofol, Abbott, España).

Figura 9.2



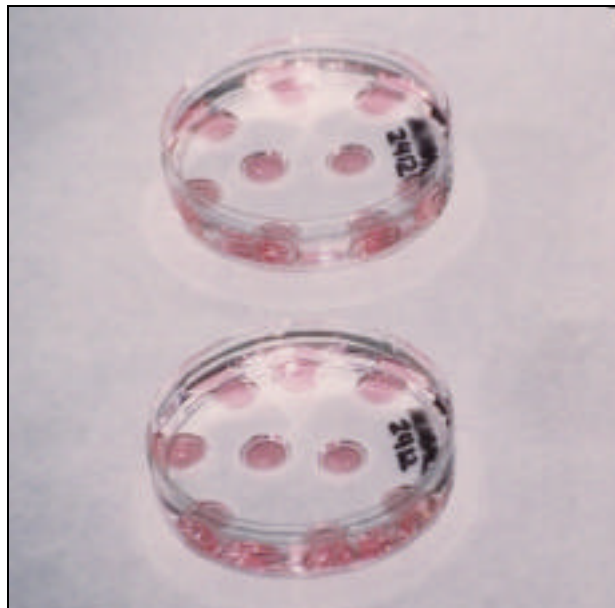
La Figura 9.2 muestra la imagen ecográfica de un folículo en el momento de ser aspirado, puede verse la aguja y la guía de puntos que nos orienta la posición de entrada de dicha aguja de punción-aspiración.

9.2.3 Inyección intracitoplasmática

9.2.3.1 Preparación de los ovocitos

Los complejos cúmulo-ovocito identificados en los líquidos foliculares con la ayuda del microscopio estereoscópico son incubados en gotas de medio HTF/HSA cubiertas de aceite mineral (Figura 9.3).

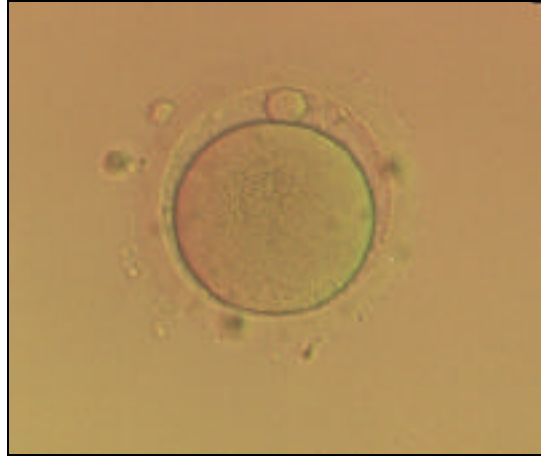
Figura 9.3



Los ovocitos se desnudan eliminando el cúmulo y la corona radiada. Para ello se colocan en medio HTF/HEPES (*Human Tubal Fluid* tamponado con HEPES) suplementado con HSA y conteniendo hialuronidasa (10UI/ml). Se pipetea durante unos 30 segundos aproximadamente. La corona radiada se elimina haciendo pasar los ovocitos por un capilar de policarbonato de 140 micras de diámetro (Flexpipet, Cook IVF, Australia). Esta fase se hace en HTF/HEPES/HSA sin hialuronidasa. Se microinyectan los ovocitos maduros

en metafase II (MII), es decir, en los que vemos el primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino (Figura 9.4)

Figura 9.4



9.2.3.2 Preparación del semen

El semen que se utiliza en los casos de FIV-ICSI en parejas en las que el hombre es portador del VIH-1 es siempre semen congelado. Este semen ha sido ya lavado y el resultado de la determinación con técnica de PCR del DNA y el RNA del VIH-1 ha sido negativo.

9.2.3.3 Instrumental

Para la realización de la ICSI se precisan dos micromanipuladores adosados a un invertoscopio que permiten movimientos finos en los tres ejes; y dos inyectores: en uno se acopla el fijador que permite mediante aspiración inmovilizar el ovocito. En el otro se acopla el microinyector, biselado en su extremo para lesionar lo menos posible el ovocito al atravesar la zona pelúcida y el oolema (Figura 9.5).

Figura 9.5



En este estudio se han empleado micropipetas fijadoras de fabricación propia y micropipetas inyectoras de la casa comercial Cook IVF. Para fabricar la micropipeta fijadora del ovocito se utilizan dos aparatos. El primero, denominado *estirador* (PB-7, Narishige), sirve para obtener dos capilares con los extremos muy afilados partiendo de un capilar de vidrio (Figura 9.6). Con el segundo aparato, la *microforja* (MF-9, Narishige) se realizan las últimas modificaciones (Figura 9.7).

Figura 9.6



Figura 9.7



Este último aparato es básicamente un filamento de platino conectado a corriente eléctrica de intensidad regulable y un sistema óptico. Sobre el filamento de platino se fabrica una pequeña gota de vidrio sobre la que se realizan diferentes tareas. La micropipeta fijadora se fabrica con el estiramiento de un capilar en el *estirador*; posteriormente con la *microforja* se rompe el capilar a un diámetro de 70-80 micras; por último, suministrando calor se redondean los bordes para no causar daño al ovocito. La rotura a 70-80 micras se consigue haciendo fundir el capilar con la gota de vidrio caliente a la altura en que el capilar tiene ese diámetro; para ello nos ayudamos de un ocular que dispone de una regleta graduada. Una vez fundido y ya en frío separamos un extremo y se romperá el capilar al diámetro marcado. Las dos micropipetas tienen una angulación de 35° en los extremos para que queden en el mismo campo de enfoque cuando sean instaladas en el micromanipulador.

9.2.3.4 Inyección del espermatozoide

En una placa de Petri para microinyección (Falcon. Ref 1006) se forman gotas de medio de cultivo HTF suplementado con albúmina (HTF/BSA), de 5 a 10 microlitros. En una se coloca la suspensión de espermatozoides. En otra, próxima, PVP al 5% de peso molecular 360.000 (Sigma). Las gotas se cubren con aceite mineral ligero (Sigma). Cada ovocito desnudo se pone en una gota de medio. La placa así preparada se mantiene a 37°C en el invertoscopio durante todo el proceso. Una fracción de la suspensión de espermatozoides se transfiere a la gota próxima que contiene PVP con lo que disminuye la movilidad al ser la PVP un medio muy viscoso. Uno de los puntos que parece tener suma importancia en el momento de succionar el espermatozoide, es su previa inmovilización. La rotura se efectúa con la micropipeta inyectora, cortando la cola aproximadamente por el medio, entre la cabeza y el final de la cola. Se consigue haciendo friccionar el espermatozoide con el fondo de la placa por presión del inyector. Hay que asegurarse de realizar el corte en la parte de la cola y no en la pieza intermedia. No es necesario separar el extremo distal de la

cola, basta con inmovilizar el espermatozoide y producir una clara angulación en el punto de la rotura.

El microinyector con el espermatozoide casi en el extremo, se traslada a la gota donde está el ovocito ya fijado y se inyecta en la posición horaria de las 3 en punto, de tal manera que primero entre la cabeza y luego la cola del espermatozoide. La zona se atraviesa fácilmente. El ovolema muy elástico se desplaza mucho sin perforarse. Es preciso asegurarse de que se ha perforado, aspirando un poco de ovoplasma con el microinyector. En el momento de la rotura del ovolema, se para la presión negativa para no seguir aspirando ovoplasma. Se introduce en el ovocito el espermatozoide junto con la pequeña fracción de ooplasma aspirado haciendo presión positiva (Figura 9.8). Se retira el microinyector, se libera el ovocito, se lava y se prosigue el cultivo habitual.

Figura 9.8



9.2.4 Cultivo embrionario

Para el cultivo embrionario se utilizan placas con gotas de medio HTF suplementado con albúmina y cubiertas por aceite mineral (Sigma).

9.2.4.1 Chequeo de fecundación

El resultado de la FIV-ICSI se observa entre las 16 y 18 horas de la microinyección espermática. Se evalúa si el ovocito ha sido correctamente fecundado (presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares) (Figura 9.9).

Figura 9.9



Debemos prestar especial interés en los siguientes factores:

- Presencia y cantidad de pronúcleos y corpúsculos polares.
- Tamaño: normal, reducido (con amplio espacio perivitelino), hipertrófico.
- Aspecto del espacio perivitelino: normal, amplio.
- Aspecto del ovolema: normal, irregular.
- Aspecto de la zona pelúcida: normal, gruesa, oscura, fina, hipertrófica.
- Aspecto del citoplasma: normal (concentrado en la zona central); presencia de vesículas, vacuolas o cuerpos densos; granular...
- Aspecto de los pronúcleos: alineación con el CP, cantidad de nucleolos, distribución de los nucleolos.

Una vez chequeada la fecundación de todos los ovocitos, éstos se separan en placas independientes los que presentan 2 PN del resto (3PN, 1 PN, no PN,...), se separan en gotas, y se rotulan con su número identificativo respectivo.

9.2.4.2 Chequeo de división embrionaria

A las 24 horas de la observación de los pronúcleos, se observa el estado celular y la calidad de los embriones. Se anota el número de células y el porcentaje de fragmentación según la Tabla 9.7.

Tabla 9.7 Clasificación embrionaria

Clasificación según fragmentación	
A	<=10
B	11-20
C	21-50
D	>50
Clasificación según blastómeros	
1	Iguales
2	Desiguales

Se ha de prestar especial atención a la presencia de blastómeros multinucleados. La tasa de implantación mejora cuando se prescinde de estos embriones para ser transferidos (Gerris *et al.*, 1999). La presencia de un núcleo en cada blastómero es señal de buena calidad embrionaria. La presencia de más de un 20% de fragmentación reduce la posibilidad de implantación del embrión.

En la Figura 9.10 se muestra un embrión en 4 células en día +2 a las 42 horas de ser microinyectado y en la Figura 9.11 un embrión en 8 células en día +3 a las 65 horas de ser microinyectado. Ninguno de los dos embriones presenta fragmentación y los blastómeros son iguales entre sí.

Además de evaluar el porcentaje de fragmentación y la isometría de los blastómeros es importante anotar el ritmo de división celular, la transferencia embrionaria se realiza en día +3 cuando disponemos de más de 3 embriones de buena calidad en día +2. De este modo se pueden descartar los embriones que se bloqueen o que presenten un ritmo de división lento o demasiado rápido.

Figura 9.10



Figura 9.11



Se considera que los embriones de mejor calidad son los que en día +2 presentan 4 células y 8 células en día +3 y no presentan fragmentación.

9.2.5 Transferencia embrionaria

La transferencia embrionaria al igual que el proceso de inseminación se realiza en la consulta ginecológica, de forma totalmente ambulatoria. Es un proceso fácil e indoloro. La paciente se coloca en posición ginecológica y después de colocar espéculo vaginal, se procede a la limpieza de secreciones. El procedimiento se puede facilitar utilizando la sonda abdominal para localizar el correcto posicionamiento de los embriones en la cavidad uterina (Figura 9.12). El cateter de transferencia se introduce por el cérvix, y cuando se tiene la evidencia de que el extremo distal de la cánula se encuentra en cavidad uterina entre 1 y 1,5 cm del *fundus* (Figura 9.12), se inyecta el medio conteniendo los embriones (unos 20 μ L)(Figura 9.13). Toda la maniobra se realiza con la máxima delicadeza evitando cualquier sangrado o traumatismo que dañe el tejido endometrial o induzca contracciones uterinas. Transcurridas 2 horas de reposo en camilla, y 2 días de reposo relativo, la paciente puede reiniciar su actividad normal.

Figura 9.12



Figura 9.13



9.2.6 Soporte de fase lútea

Al igual que en los casos de IA, se realiza soporte de fase lútea con progesterona micronizada por vía vaginal.

9.2.7 Resultados

La Tabla 9.7 muestra los resultados obtenidos con la aplicación de FIV-ICSI a parejas con hombre seropositivo al VIH-1.

Tabla 9.7 Resultado de los ciclos de FIV-ICSI

Ciclos de FIV-ICSI (n = 61; 100%)	
Mujeres	44
Ciclos/mujer	1,4
Gestaciones clínicas	30
Gestaciones/ciclo	49,2%
Gestaciones/mujer	68,2%
Abortos	7 (23,3%)
Nacimientos	11
Partos gemelares	5 (45,4%)
Niños nacidos	16
Gestaciones en curso	19

Todos los controles de PCR y anticuerpos anti-VIH-1 realizados en las madres y en los niños nacidos han dado resultado negativo.

En la Tabla 9.8 se muestran los resultados de folículos, ovocitos y embriones obtenidos en los ciclos de FIV-ICSI.

Tabla 9.8 Detalle de los ciclos de FIV-ICSI (media \pm SD)

Edad de la mujer	33,0 \pm 4,2
Folículos (\geq 16 mm)	14,3 \pm 8,4
Ovocitos	9,9 \pm 5,8
Tasa de recuperación	69,2%
Metafase II	7,8 \pm 4,7
Tasa de ovocitos maduros	78,8%
2 PN	5,5 \pm 3,9
Tasa de fecundación	70,5%
Embriones transferidos	2,9 \pm 1,1

La Tabla 9.9 muestra los resultados de las FIV-ICSI según la indicación.

Tabla 9.9 Resultado de la FIV-ICSI según la indicación

	Ciclos	Gestaciones	%
Masculina	34	16	47,1
Fallo de IA	19	9	47,4
Tubárica	7	4	57,1
DGP ^a	1	1	100
Total	61	30	49,2

^aEn un caso de hombre hemofílico se realizó diagnóstico genético preimplantacional para evitar el nacimiento de niñas portadoras

La Tabla 9.10 muestra los resultados de gestación según la edad de la paciente.

En la Tabla 9.11 se puede ver la edad de las mujeres gestantes y no gestantes.

Tabla 9.10 Resultados de FIV-ICSI según la edad de la mujer

Edad años	Ciclos	Gestaciones	
	n	n	%
Menos de 30	21	11	52,4
30-34	27	13	48,1
35-39	13	6	46,1
40 ó más	0	0	0

Tabla 9.11 Edad de la mujer según el resultado de la FIV-ICSI

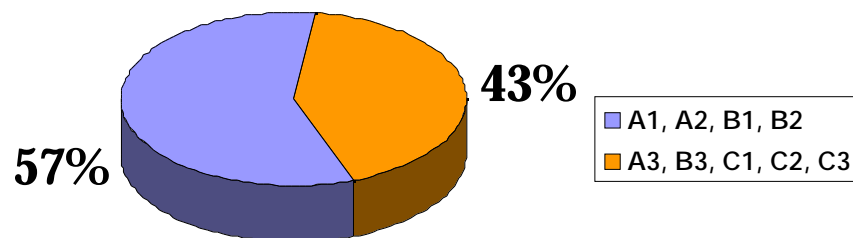
	Gestantes	No gestantes	P
Edad media \pm SD	30,37 \pm 4,42	31,06 \pm 4,38	0,959
Edad máxima	38	39	
Edad mínima	19	22	

La Tabla 9.12 presenta las gestaciones obtenidas según el estado clínico del hombre. En el Gráfico 9.2 se representa el porcentaje de ciclos según el estadio del SIDA del hombre.

Tabla 9.12 Resultado de las FIV-ICSI según el estadio clínico del hombre

	A1, A2, B1, B2	A3, B3, C1, C2, C3	P
Ciclos	35	26	
Gestaciones	18	12	
Gestaciones/ciclo	51,4%	46,1%	NS

Gráfico 9.2



En la Tabla 9.13 se presentan los resultados de gestación según si el hombre se sometía a terapia antirretroviral. Se muestran los también los resultados desglosados según el tipo de terapia que recibía: sólo inhibidores de la transcriptasa, o combinados con inhibidores de la proteasa viral.

Tabla 9.13 Resultados de FIV-ICSI según la terapia antirretroviral

Tratamiento antirretroviral	Ciclos n	Gestaciones n	%	P
No tratamiento	10	4	40	
Sí tratamiento	51	26	51,0	NS
Total	61	30	49,2	
Sólo ITI	22	10	45,4	
ITI + IP	29	16	55,2	NS
Total	51	26	51,0	

9.2.8 Discusión

Al igual que se observa en los ciclos de IA, en los ciclos de FIV-ICSI se observa una disminución progresiva en la tasa de gestación conforme aumenta la edad de la mujer. Aunque en los ciclos de FIV-ICSI esta disminución no es significativa cabe esperar que al aumentar el número de ciclos esta tendencia se verifique y revele lo que también ocurre en los ciclos de FIV-ICSI por otras indicaciones. Las tasas de gestación son altas debido a que se trata de un colectivo más joven (media de edad de $33,0 \pm 4,2$ años) que el que acude a la consulta de esterilidad por otras causas.

No observamos diferencias estadísticamente significativas en los resultados de gestación en los pacientes según el estadio clínico de la enfermedad ni según la terapia antirretroviral.

El número de ciclos es aún pequeño y es necesario ampliar el número de hombres seropositivos que se someten a FIV-ICSI para estudiar con mayor profundidad los factores que influyen en las probabilidades de gestación con la aplicación de esta técnica.

El bajo número de espermatozoides móviles recuperados tras el doble lavado es la principal indicación para la aplicación de FIV-ICSI en este estudio (55,7% de los ciclos). Los fallos previos de IA constituyen el 31,1% de los ciclos de FIV-ICSI y la obstrucción tubárica el 11,5%. En un caso de hombre hemofílico se realizó diagnóstico genético preimplantacional de los embriones para seleccionar embriones con dotación cromosómica 46,XY y evitar el nacimiento de niñas portadora (Santaló *et al.*, 2000).

En los casos de FIV-ICSI se emplea siempre semen lavado, congelado y testado para el VIH-1. El semen se testa previamente para evitar tener que cancelar el ciclo el día de la punción folicular porque la determinación del VIH-1 en la fracción espermática obtenida tras los lavados de positiva al RNA y/o DNA

viral. Habrá un número suficiente de espermatozoides móviles aunque sólo se disponga de la mitad de los espermatozoides y estos hayan sido congelados y descongelados puesto que siempre se realiza ICSI y no FIV convencional.

La congelación de muestras con un posible riesgo de contener virus es un tema que se ha debatido por la posible contaminación cruzada de otras muestras negativas (Bahadur y Tedder, 1997). Se sabe que el nitrógeno líquido preserva los virus y su actividad potencial (Tedder *et al.*, 1995). Un reciente estudio sobre la seguridad de diferentes pajuelas utilizadas para la criopreservación de gametos y embriones no encuentra que el VIH-1 sea capaz de atravesar las pajuelas de PVC (cloruro de polivinilo) utilizadas en este estudio (Benifla *et al.*, 2000). Las muestras utilizadas en este estudio permanecen congeladas en un tanque de nitrógeno específico para estos pacientes. Además, hay que recordar que todas las muestras congeladas han sido ya lavadas, si bien sin conocer el resultado de la PCR para el VIH-1, y el inóculo para una posible contaminación sería del todo insuficiente.

En estos pacientes parece indicado la aplicación de la técnica de ICSI, incluso en casos de sémenes normales, con el objetivo de reducir la exposición del ovocito a pequeñas cantidades de virus por debajo del límite de sensibilidad de la técnica de PCR empleada, y por tanto indetectables.

Aunque experimentos *in vitro* alertan sobre la posible vía de contagio a través de los espermatozoides (Baccetti *et al.*, 1994; Kiessling, 1998), los datos clínicos hasta ahora obtenidos muestran que ovocitos microinyectados con espermatozoides lavados procedentes de hombres seropositivos al VIH-1 pueden generar embriones evolutivos que den lugar al nacimiento de niños sanos (Marina *et al.*, 1998a; Loutradis *et al.*, 2001).

No son comparables los resultados obtenidos *in vitro* sobre la posibilidad de infectar ovocitos humanos con el VIH-1, con los resultados obtenidos en este estudio. Los pacientes incluidos en este estudio se encuentran en un estado

estable de la enfermedad y la mayoría muestran cargas virales indetectables en sangre. En este estudio se utiliza semen sometido a un doble proceso de lavado y testado con PCR para la presencia de RNA o DNA viral. Si *in vivo* se diese la posibilidad de que espermatozoides móviles infectaran al ovocito y al embrión, habría una vía nueva de transmisión. No se postula si quiera que el embrión sea una vía de contagio del VIH-1.

Otro punto conflictivo se genera con la congelación de embriones procedentes de estas parejas. Se crea un problema ético-legal en el caso de que la pareja decida no utilizar estos embriones congelados procedentes de ciclos en los que se ha utilizado semen procedente de un hombre seropositivo al VIH-1. La Comisión Nacional de Reproducción Asistida Humana deberá pronunciarse sobre el posible destino de estos embriones. Pueden ser donados a otras parejas serodiscordantes que los necesiten y den su autorización, aunque éste sea un colectivo reducido; pueden ser dedicados a investigación; o puede ser aconsejada su destrucción. Aunque la primera opción sería la ideal, la segunda opción parece ser más realista. Una pareja que solicita embriones de banco exigirá las máximas garantías sanitarias sobre los embriones que se les asignen.