

Lavado seminal en muestras de parejas serodiscordantes para VIH y su uso en reproducción asistida

Laura Victoria Mendieta Mayorga¹

¹ Embrióloga, Hisparep Clínica de Reproducción Asistida, Hospital español. Ciudad de México. México.

E-mail de correspondencia: lauravictoriamedieta@gmail.com

RESUMEN

La negación de la paternidad a las parejas serodiscordantes para VIH, en las que únicamente el hombre está infectado, ha cambiado sustancialmente gracias al lavado seminal y a los tratamientos de reproducción asistida. Éstos no sólo ayudan a las parejas a resolver problemas potenciales de infertilidad resultantes de la enfermedad, sino que también se ha descrito que el uso de una muestra de semen previamente lavada, en combinación con una técnica de reproducción asistida, como la inyección intracitoplasmática del espermatozoide, es segura y eficaz para reducir el riesgo de transmisión y seroconversión de la pareja y el recién nacido. A pesar de la controversia sobre la capacidad que tiene el virus para entrar al espermatozoide, se sabe que éste no lo hace en espermatozoides de buena calidad y se ha demostrado que el lavado seminal permite recuperar los espermatozoides viables y libres de partículas virales para ser usados en técnicas de reproducción asistida, sin ningún reporte de seroconversión a la fecha. Esta revisión expone diversos aspectos clínicos relacionados con la reproducción de hombres con VIH, así como expone el procedimiento realizado por las clínicas de reproducción asistida y los resultados obtenidos con el lavado seminal.

Palabras clave: VIH, reproducción asistida, lavado seminal, parejas serodiscordantes, ICSI.

Semen wash in samples of HIV serodiscordant couples and their use in assisted reproduction

ABSTRACT

The denial of paternity to serodiscordant HIV couples, in which only man is infected, has changed substantially due to semen wash and assisted reproduction treatments. These not only help the couples to solve potential problems of infertility resulting from the disease, but it has also been described that the use of a sample of previously washed semen, in combination with an assisted reproduction procedure, such as intracytoplasmic sperm injection, is safe and effective in reducing the risk of transmission and seroconversion of the partner and newborn. Despite the controversy over the ability of the virus to enter the spermatozoa, it is known that it does not enter in spermatozoa of good quality and it has been demonstrated that semen washing allows the recovery of viable spermatozoa and free of viral particles to be used in assisted reproduction techniques, without any seroconversion report to date. This review presents several clinical aspects related to the reproduction of men with HIV, as well as the procedure performed by assisted reproduction clinics and the results obtained with semen wash.

Keywords: HIV, assisted reproduction, semen wash, serodiscordant couples, ICSI.

Introducción

Desde el inicio de la pandemia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el descubrimiento de su capacidad de transmisión horizontal y vertical, las parejas que viven con este virus son despreciadas y juzgadas por desear tener hijos. Esta creencia está ligada a la baja expectativa de vida que se les concede a quienes padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). De igual forma, existe la percepción de que las parejas serodiscordantes para VIH, en donde el hombre es VIH positivo y la mujer VIH negativa, no deben tener el mismo acceso a los servicios de fertilidad, como las técnicas de reproducción asistida, dándoles como única opción en muchos casos la adopción. Sin embargo, muchas de las parejas viviendo con VIH desean tener hijos biológicos, por lo que en muchos casos estas personas tienden a ocultar su condición¹⁻⁴.

El tener hijos ha sido catalogado como un factor fundamental en la búsqueda y construcción de identidad, tanto de hombres como de mujeres, en la mayoría de culturas^{5,6}. De acuerdo con esto, diversos estudios han reportado que el deseo de tener hijos en personas que viven con VIH es comparable al de la población en general, ya que la gran mayoría de estas personas se encuentran en edad reproductiva. Es decir, 75% de esta población desea embarazarse y en ocasiones la intención de tener hijos biológicos es tan fuerte que las parejas aceptan el riesgo de infección, llegando a concebir de una forma no segura y aumentando el riesgo de transmisión horizontal y vertical⁷⁻¹⁰.

Actualmente, con el desarrollo de los tratamientos antirretrovirales combinados, la infección por VIH se cataloga como enfermedad crónica y quienes la padecen tienen la oportunidad de tener una vida casi normal, incluyendo el tener hijos biológicos. Sin embargo el apoyo médico en el planeamiento de un embarazo sano continúa siendo bajo y se ha comprobado que existe menos apoyo hacia

los hombres VIH positivos en su deseo por ser padres, en comparación con las mujeres infectadas^{4,6,11-14}.

En una encuesta realizada en Reino Unido a hombres viviendo con VIH se encontró que solo el 9.4% ha recibido asesoría médica en reproducción. Además, en estudios realizados en Brasil, EEUU, Reino Unido y Sudáfrica se reportó que un 65%, 28%, 44%, y 36% de hombres viviendo con VIH, respectivamente, desea ser padres y cerca de un 25% de ellos preferiría ocultar su estado de VIH positivo por la reacción negativa de las personas^{2,4,7-10}.

El lavado seminal para parejas serodiscordantes fue pionero en Milán en 1989 y no han sido reportados casos de transmisión de VIH con este método hasta la fecha^{15,16}. El valor clínico de este procedimiento fue descrito por primera vez en 1992 por Semprini et al., y desde entonces se ha reforzado por diferentes publicaciones con aspectos tanto clínicos como metodológicos. La importancia del uso de esta técnica ha sido resaltada en Europa, donde se reportó la seroconversión de una mujer después de una inseminación intrauterina, con la muestra de su esposo infectado con VIH sin haber lavado o procesado el semen previamente^{3,12,17,18}.

Se sabe que el VIH está presente en el semen poco tiempo después de la infección primaria y permanece en este durante todos los estadios de la enfermedad. A pesar de esto, en 2008 se insinuó que era seguro para parejas serodiscordantes que estuvieran en terapia antirretroviral, con carga viral no detectable y que no tuvieran otro tipo de infecciones de transmisión sexual, el tener hijos de forma convencional. Esta declaración ha generado mucho debate debido a las opciones de fertilidad que hay hoy en día disponibles para reducir el riesgo de transmisión y a que varios estudios han establecido la presencia de VIH en el semen de hombres infectados, incluso cuando no hay detección del virus en la sangre de estos pacientes^{2,3,12,15}.

Desde 2006 la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos (United States Department

of Health and Human Services, HHS por sus siglas en inglés) reconocieron la salud reproductiva de las personas con VIH como una prioridad^{19,20}, por lo cual en la actualidad no se justifica la negación de un tratamiento de fertilidad a los adultos con VIH a quienes estén en edad reproductiva y tengan deseos de formar una familia, ya que se ha comprobado que el lavado seminal y las técnicas de reproducción asistida en parejas serodiscordantes tienen un gran impacto en términos de prevenir la transmisión del virus. Sin embargo, pocas clínicas alrededor del mundo ofrecen este procedimiento, por lo cual los contrastos más evidentes son el alto costo de los procedimientos y la baja disponibilidad de los mismos^{1,3-9,13,16,21}.

VIH

De acuerdo con las estadísticas mundiales del programa conjunto de las naciones unidas sobre el VIH/Sida (ONUSIDA), se estima que hay 36,7 millones de personas viviendo con VIH y que aproximadamente el 86% de esta población está en edad reproductiva²².

La vía principal de transmisión del VIH es la sexual, donde el vehículo directo es el plasma seminal, ya que en éste se encuentran partículas virales libres y asociadas a células como linfocitos y macrófagos, que constituyen los reservorios principales del virus^{4,6,12,16,23}.

Si el VIH puede adherirse al espermatozoide o realmente infectarlo es todavía un tema de controversia y debate. En 1994 se describió la presencia de ARN viral en los espermatozoides de hombres con SIDA, a través de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, sin embargo, no se encontró ADN viral en el espermatozoide, por lo cual se concluye que los viriones no se pueden replicar en el espermatozoide²⁴. De acuerdo con esto, Brogi et al. (1998) propusieron que el VIH puede unirse a los espermatozoides a través de un mecanismo relacionado con las moléculas MHC-CD4 de clase II durante la espermatogénesis. Sugieren, que un glicolípido similar estructuralmente a la galactosilceramida, que está pre-

sente en la membrana y pieza media de los espermatozoides, puede funcionar como receptor alternativo para el VIH, al interactuar con la proteína gp120 presente en la membrana del virus. En este estudio, se realizaron ensayos de interacción y se determinó, que existe una interacción dependiente de concentración entre glicolípidos provenientes de espermatozoides de hombres con SIDA y la gp120 del virus y que el anticuerpo específico para la galactosilceramida es capaz de inhibir dicha interacción. Sin embargo, no es posible determinar si este glicolípido es capaz de actuar como un receptor alternativo o como molécula accesoria que permita la fusión de membranas y por ende la entrada del virus²⁵.

Posteriormente, en 2007 se reportó que hombres con infecciones más avanzadas presentaban un alto porcentaje de anomalías en sus espermatozoides⁵. El estudio realizado por Muciaccia et al. (2007), determinó que los individuos infectados con VIH pueden eyacular pequeñas cantidades de espermatozoides que presenten material genético viral, siendo estos anormales morfológicamente, presentando altos porcentajes de fragmentación del ADN espermático y no siendo funcionales. El grupo de pacientes sanos tenía a un 58% de espermatozoides anormales, mientras que en el grupo de pacientes con SIDA era de 80%. De igual forma, se observó un porcentaje de fragmentación del ADN espermático de 35.4% en el semen de pacientes con SIDA, mientras que en hombres sanos fue de 9.5%. También determinaron que el lavado seminal disminuye significativamente el número de espermatozoides positivos para VIH, al no detectar ADN ni ARN viral. Esto sugiere que los espermatozoides no son un vehículo de transmisión del virus, ya que al tener todas estas alteraciones son de muy mala calidad, por lo cual no sobreviven a las diferentes fases del lavado y en el caso de que logren pasar, no van a ser aptos para fecundar un ovocito^{8,15,26}. Con esto se demuestra que la técnica de lavado seminal es un procedimiento confiable y efectivo para recupe-

rar aquellos espermatozoides móviles, con morfología normal, membranas intactas y empaquetamiento normal de su ADN, siendo de este modo aptos para fecundar un ovocito, permitir un buen desarrollo embrionario y lograr un embarazo¹².

En el estudio de Wang et al. (2011) se observó nuevamente la presencia del VIH en los espermatozoides de pacientes infectados. En este estudio se realizó hibridación fluorescente in situ (FISH por sus siglas en inglés) y se encontraron señales positivas en las cabezas de los espermatozoides de 9 de los 33 hombres con VIH. Sin embargo, en este estudio no se realiza lavado seminal y no se especifican las condiciones clínicas de los hombres con VIH que participan, es decir no se tuvo en cuenta la carga viral o el estar bajo tratamiento antirretroviral, lo cual ha demostrado tener un efecto directo en la calidad espermática y por lo tanto en la interacción con el virus^{15,23,26}.

A pesar de las diversas evidencias que señalan el potencial de los espermatozoides como una fuente de infección, la interacción directa de estas células con el virus aún no ha sido claramente demostrada^{23,27}. En estudios previos se ha confirmado la falta significativa de expresión de receptores del VIH en los espermatozoides, indicando que es poco probable que sean uno de los objetivos principales para la infección del virus. Por todo esto, el virus aparenta no ser capaz de unirse o infectar a un espermatozoide sano y de buena calidad^{16,21}. Se sabe además, que los leucocitos son el principal vehículo de transmisión del virus y se ha reportado la presencia de un leucocito por cada mil células espermáticas en las muestras de semen después de la purificación y procesamiento con gradientes de densidad. De acuerdo con esto, las células no espermáticas en las muestras de semen pueden resultar en una falsa atribución del virus detectado a los espermatozoides^{15,21}.

En 2013, Li et al. determinaron nuevamente que, aunque el virus pueda llegar a estar dentro del espermatozoide, este no está activo, al no evidenciar la presencia de proteínas virales; es decir, no hay expresión del gen gag

del VIH que es fundamental en la patogénesis del virus. Se sugiere que el espermatozoide al tener una cantidad insuficiente de ribosomas no es capaz de soportar la traducción del ARN mensajero viral. Sin embargo, se ha observado que este sí es capaz de replicarse en los embriones. Esto realza la importancia del lavado seminal en hombres infectados, ya que, aunque el virus esté inactivo en el espermatozoide se ha visto que este puede pasarse al embrión al inyectar ovocitos de hámster con espermatozoides de mala calidad, provenientes de muestras de hombres con SIDA que no han sido previamente lavadas. Tras analizar con FISH, se confirmó la presencia del provirus de VIH integrado en el núcleo de embriones de dos células y que son capaces de replicarse en las células tempranas del embrión y segregar sus copias en las dos células hijas durante la primera división. Sin embargo, no se ha reportado la evaluación prolongada del desarrollo embrionario tras la inyección de ovocitos con espermatozoides infectados, ya que es altamente probable que estos embriones no tengan un buen desarrollo y se bloqueen en algún momento por mala calidad espermática disminuyendo la probabilidad de éxito y aumentando el riesgo de transmisión horizontal^{1,23,26,28}.

Alteraciones en el semen por VIH

Algunos estudios sugieren, que la calidad de la muestra seminal no se altera en las primeras etapas de la infección^{7,15}. Sin embargo, se ha encontrado que los hombres con VIH tienen un porcentaje de fragmentación del ADN espermático significativamente mayor al de hombres sanos. Esto tiene una correlación negativa con la concentración espermática, llevando por lo tanto a su disminución. Existen diversas hipótesis que intentan explicar el aumento en el porcentaje de fragmentación, como lo son: efectos directos del virus sobre la estructura nuclear del espermatozoide, efectos indirectos del virus por la secreción de citoquinas, efectos directos de los me-

dicamentos, disminución en la cantidad de linfocitos T CD4+ o hábitos tóxicos. Además, como los leucocitos son reservorios virales, incluso en pacientes que reciben terapia antirretroviral potente se ha descrito que la leucocitospermia es prevalente en hombres infectados con VIH, es decir tienen una cantidad mayor a un millón por mililitro de leucocitos en el eyaculado. Además, se sabe que pacientes con enfermedades virales crónicas como el VIH están expuestos a una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno debido a las reacciones inflamatorias y que los tratamientos antirretrovirales tienden a aumentar las alteraciones nucleares en los espermatozoides volviéndolos más sensibles a los procesos de congelación^{15,23,29}.

En el estudio realizado por Queiroz et al. (2008) se compararon las características seminales entre un grupo de hombres infectados y otros sanos antes y después de la criopreservación de las muestras de semen. El grupo con VIH presentó un porcentaje de espermatozoides normales (5.82%) significativamente menor al grupo control (14.3%), además de una disminución en la concentración, movilidad progresiva y vitalidad espermática^{7,21}. Otros autores también han identificado reducción en el volumen del eyaculado, siendo todas estas alteraciones directamente proporcionales a la cantidad de células CD4. Lambert-Niclot et al. (2011) reportaron que los pacientes VIH seropositivos presentan además un aumento en el pH, sugiriendo que una disfunción de las glándulas accesorias, como consecuencia de la infección latente, puede reducir el volumen seminal o tener un efecto directo en la espermatogénesis y en la composición del plasma, llegando finalmente a afectar la concentración, la movilidad y la morfología espermática^{13,15,21,29,30}.

También se propone que las drogas antirretrovirales, al estar relacionadas con varias disfunciones metabólicas y endocrinas, pueden llegar a afectar el funcionamiento de los testículos, el tracto reproductivo y los gametos masculinos. Se ha reportado que inicialmente los tratamientos

antirretrovirales al aumentar la cantidad de células CD4 tienen un efecto positivo en la calidad seminal, ocasionando únicamente alteraciones morfológicas. Sin embargo, con el transcurso del tiempo y el uso de estos medicamentos la calidad seminal se ve afectada debido a la toxicidad del tratamiento y a la disminución en la integridad de los espermatozoides ocasionando daño en el ADN. Por ejemplo, se ha descrito que los medicamentos inhibidores de proteasas están asociados con la inhibición de la apoptosis, lo cual puede llegar a suceder también en los espermatozoides, resultando en disfunciones morfológicas y funcionales. Diversos estudios indican una relación directa entre alteraciones en la movilidad espermática y las terapias antirretrovirales, específicamente con el uso de análogos nucleosídicos e inhibidores de la transcriptasa reversa, ya que son altamente tóxicos para las mitocondrias, al inhibir la replicación del ADN mitocondrial^{7,11,21,29,30,31}.

De acuerdo con esto, si existe una disminución en la calidad seminal de los hombres con VIH y es importante tener presente que no solo se debe a los efectos de la inflamación por la infección o a la colonización de las células por parte del virus, sino también es el resultado de cambios en el metabolismo de los espermatozoides por los tratamientos antirretrovirales^{13,23,31}.

Técnicas de reproducción asistida

Para muchas parejas serodiscordantes donde el hombre es VIH-positivo, la atención y el asesoramiento reproductivo puede reducir significativamente las tasas de transmisión horizontal y vertical del VIH. Es por esto, que desde hace más de una década algunos centros de reproducción asistida ofrecen sus servicios a estas parejas. De igual forma, estas personas acuden para resolver problemas potenciales de infertilidad resultantes de la enfermedad. Los tratamientos ofrecidos por estos centros incluyen: la inseminación intrauterina (IIU), con o sin estimulación ovárica, la fertilización in vitro (FIV), la inyección intracitoplasmá-

tica del espermatozoide o ICSI (del inglés intracytoplasmic sperm injection), entre otros^{7,9,16}.

Análisis seminal

El primer paso es realizar el análisis de la muestra de semen, el cual debe ser tanto macro como microscópico. Los factores macroscópicos que se evalúan son viscosidad, licuefacción, apariencia, volumen, pH y los microscópicos son movilidad, vitalidad, concentración, morfología y presencia de otras células como leucocitos o células germinales inmaduras. Los tipos de etiologías que se pueden presentar en un análisis de semen se clasifican de acuerdo al parámetro en el cual se presente la alteración, es decir si alguno de los parámetros se encuentra por debajo del límite inferior de referencia establecido por el manual de la OMS³².

Normalmente después del análisis se debe capacitar la muestra de semen para seleccionar los espermatozoides de mejor calidad y aumentar la probabilidad de fecundación y el éxito del desarrollo embrionario en el procedimiento que se desee realizar. Existen tres técnicas principales para hacerlo que son: el lavado, el swim up y los gradientes de densidad. Estas no son excluyentes entre sí y se pueden modificar los parámetros basándose en el análisis inicial^{15,16,29,33}.

Lavado seminal de muestras con VIH

El principio básico de las técnicas de reproducción asistida en parejas serodiscordantes para VIH, donde el hombre es quien está infectado, es el procesamiento del semen. Durante éste, los espermatozoides libres del virus, móviles y con morfología normal son separados del plasma seminal y de otras células no espermáticas. Varios estudios han establecido la presencia de VIH en el semen de hombres infectados incluso cuando no hay detección del virus en la sangre de estos pacientes. Por esto, es sumamente importante establecer condiciones para iniciar el procedimiento y realizar un buen lavado de semen para que el

riesgo de seroconversión sea mínimo^{8,12,16}. El abordaje para el tratamiento de estas parejas debe ser global y multidisciplinar como lo recomienda la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE por sus siglas en inglés), la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (American Society for Reproductive Medicine, ASRM por sus siglas en inglés) y la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), involucrando no solo al equipo médico y de laboratorio, sino también a psicólogos y trabajadores sociales^{4,34,35}.

De acuerdo a esto, como primer paso se deben brindar unas sesiones de apoyo psicológico antes de empezar cualquier procedimiento. Estas deben realizarse tanto en pareja como individualmente y en ellas se deben aclarar: los riesgos naturales del lavado seminal, el impacto de un tratamiento fallido, los factores relacionados con tener un hijo cuando alguno de los padres tiene VIH y la posibilidad de tener que criarlo como padre soltero. Es muy importante que la pareja entienda, que la técnica de lavado es un método para reducir el riesgo de transmisión de VIH más no para eliminarlo por completo. La alternativa de usar un donante de semen también debe ser expuesta y se debe entregar a la pareja un consentimiento informado, tanto del ciclo de reproducción asistida como de la técnica de lavado^{2,14,17-21}.

La infección de VIH debe ser monitorizada y tratada. Los pacientes seropositivos también recibirán tratamiento antibiótico, por si tienen alguna infección adicional, durante 3 semanas y luego si se solicitará la muestra de semen. Así mismo, se deben adoptar criterios estandarizados como por ejemplo solicitar que los pacientes tengan más de 200 linfocitos TCD4+/mm³ por lo menos dos veces en 4 meses antes del tratamiento y deben tener una carga viral estable durante por lo menos 4 meses. Por último, se debe garantizar que la infección sea por una cepa conocida de VIH. Se ha comprobado que los pacientes con cargas virales altas tienen mayor número de partículas virales asociadas a los espermatozoides y una calidad se-

minal disminuida. Asimismo, si los pacientes están infectados con serotipos de VIH no habituales en nuestro medio, el diagnóstico mediante las pruebas virológicas convencionales puede ser difícil^{7,9,12,15,17}.

Las muestras de semen deben ser obtenidas por masturbación, con un periodo de 3 a 7 días de abstinencia. Estas se deben mantener a 37°C para que se licuen durante 15 minutos aproximadamente. Después se evalúan los parámetros seminales de acuerdo a los criterios del manual de la OMS. Dependiendo de la calidad de la muestra, se determina que técnicas de procesamiento seminal se van a utilizar^{3,16,32}.

Generalmente primero es lavada con el mismo volumen de medio de cultivo y centrifugada a 400g durante ocho minutos. El precipitado se resuspende en 1mL del mismo medio. Las muestras entonces son procesadas utilizando gradientes de densidad, para separar los espermatozoides móviles de las células no espermáticas, los espermatozoides inmóviles y el plasma seminal. Dependiendo de la calidad de la muestra, se pueden utilizar dos (45% y 90%) o tres gradientes de densidad (45%, 75%, 90%). El utilizar tres gradientes confiere una ventaja, ya que en la primera fase queda el líquido seminal, en la segunda las células no espermáticas y algunos inmóviles y en la tercera la gran mayoría de inmóviles, dejando así en la cuarta fase los espermatozoides móviles y obteniendo una muestra mucho más limpia. La muestra lavada y resuspendida se deposita sobre los gradientes y se centrifuga a 400g durante 20 o 30 minutos dependiendo de lo sucia que este la muestra^{6,12}.

Posteriormente, el precipitado se lava y se descarta el sobrenadante. El precipitado se resuspende en 0.5mL de medio. Se toma una alícuota de la muestra para observar si todavía tiene gran cantidad de espermatozoides inmóviles o de células no espermáticas, de ser así se puede realizar nuevamente gradientes de densidad. Luego se centrifuga a 400g durante 10 minutos, se remueve el sobrenadante y sobre el precipitado se depositan 600µL de medio para realizar la técnica de swim up. A continuación, se incuba la muestra durante 30 minutos o 1 hora a

37°C y se recuperan al final 500µL de la superficie. Cuando está suficientemente limpia la muestra, se toma una alícuota de 100µL para evaluar la presencia de ARN del VIH. Para esto, se utiliza PCR en tiempo real teniendo como límite de detección 50 copias de ARN/mL.

La Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA por sus siglas en inglés) ha determinado que existen dos pruebas aceptadas para diagnosticar una infección dentro del periodo ventana clásico: la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR por sus siglas en inglés) y la valoración del antígeno p24. Sin embargo, varios autores coinciden con que la mejor técnica para detectar el virus en los primeros momentos de la infección es la PCR, ya que requiere menos partículas virales por mililitro en sangre para detectarlo y reduce el periodo ventana. Por esto si existe la posibilidad de realizar un test de tipo PCR, no se aconseja realizar una valoración de p24^{36,37}.

El resto de la muestra recuperada y lavada, es decir los 400 µL se criopreservan. Si el test de PCR para VIH es negativo, se procede a descongelar la muestra y a utilizarla para procedimientos in vitro. En caso de detectarse partículas virales, la muestra no puede ser usada con fines reproductivos^{6,12,17}.

Se ha visto que el porcentaje de fragmentación en estos pacientes disminuye después del lavado seminal, ya que se recuperan los espermatozoides de mejor calidad; sin embargo, al congelar la muestra lavada el porcentaje de fragmentación vuelve a aumentar llegando a ser similar al inicial, de igual forma sucede con el porcentaje de vitalidad y movilidad progresiva, por lo cual es recomendable volver a capacitar la muestra después de descongelarla²⁸. Las muestras de semen son entonces descongeladas a temperatura ambiente, lavadas y capacitadas con la técnica de gradientes de densidad y migración ascendente (swim up) para la fertilización.

Es importante tener en cuenta que el almacenamiento de las muestras de semen provenientes de pacientes seropositivos para VIH se debe realizar en un contenedor espe-

cífico. También se recomienda tener precauciones para disminuir el riesgo de contaminación, por lo cual la zona del laboratorio de reproducción asistida que se utiliza para este procedimiento se debe considerar un área de riesgo virológico y debe estar separada de la que se usa para ciclos de parejas negativas para VIH, hepatitis B y hepatitis C. Los gametos potencialmente infectados también se deben manejar de manera aislada^{4,38}.

Cuando se decide utilizar técnicas de alta complejidad, es decir FIV o ICSI, los ovocitos obtenidos de las parejas VIH-negativas se fertilizan dependiendo de la calidad seminal de la pareja. Los embriones se cultivan de 3 a 5 días y se transfieren. Se recomienda hacer una valoración de antígenos de VIH a las esposas después de 1, 2 y 3 meses de la transferencia y cuando se embarazan continuar con la valoración cada trimestre del embarazo. De igual forma, se debe realizar la valoración en el bebé al nacer y a los 6 meses^{1,18}.

Diversos estudios han descrito que el uso de una muestra de semen previamente lavada es seguro y eficaz para las diferentes técnicas de reproducción asistida. El procesamiento seminal adecuado asociado con la técnica de ICSI ha sido constantemente propuesto para estas parejas, ya que se hipotetiza que disminuye aún más el riesgo de transmisión en comparación con las otras técnicas^{6,39,40,41}.

Algunos centros realizan ICSI en todas sus parejas serodiscordantes, incluyendo aquellas con fertilidad probada, ya que en comparación con la IIU se expone al ovocito a un menor riesgo teórico de contaminación, al utilizar solo un espermatozoide y al no ser necesaria la interacción de la membrana del ovocito con el acrosoma del espermatozoide. Otras ventajas incluyen: altas tasas de éxito y un menor número de intentos de llegar al embarazo, lo que también disminuye la exposición viral por ciclos repetidos^{4,7,16,40,41}.

Para realizar un procedimiento de IIU se requiere una concentración mínima de 2 millones de espermatozoides después del lavado seminal para que se pueda realizar el test de PCR y la inseminación. En estos

casos no se congela la muestra después del lavado, sino que se realiza un control por PCR anidada dentro de 12 horas con un límite de detección de una copia. Sin embargo, como el lavado seminal es un procedimiento muy fuerte de limpieza, las concentraciones finales obtenidas son sumamente reducidas por lo cual es mejor realizar ICSI, ya que es menor la cantidad de espermatozoides requeridos y el coste y la efectividad de la técnica son razonables¹⁸. Asimismo, en ciertos países, como en Francia, la ley exige que la muestra se congele mientras se obtiene el resultado negativo para la presencia del virus, por lo cual no es viable en estos países realizar inseminación intrauterina a las parejas serodiscordantes²⁹. Sin embargo, si la muestra es de buena calidad después del lavado seminal, es decir, tiene una buena concentración y no se requiere congelar la muestra para el test de PCR, es factible realizar la IIU en mujeres y hombres fértiles, ya que no se ha establecido ninguna técnica de reproducción asistida como más segura que las otras^{41,42}.

Resultados obtenidos

Aún es necesario realizar largas series de ciclos estandarizados para verificar la seguridad del procedimiento en parejas serodiscordantes para VIH^{1,17}.

En múltiples estudios no se ha detectado material genético del virus después del procesamiento seminal. En cuanto a resultados clínicos, no se han reportado casos de transmisión en más de 4000 ciclos en Europa. Del mismo modo, en los 3.315 ciclos, publicados por la red de centros de técnicas de reproducción asistida para VIH (CREATHE), no se han reportado casos de seroconversión en la mujer de la pareja cuando el semen ha sido correctamente procesado. De igual forma, Savasi et al., (2007) reportaron 3.019 ciclos de IIU después de técnicas de lavado seminal en 111 parejas serodiscordantes con 361 bebés nacidos y 543 ciclos de FIV e ICSI en 352 parejas serodiscordantes con 131 bebés nacidos, en donde todas

las mujeres fueron sometidas a una evaluación de anticuerpos anti VIH dos semanas antes y después de cada intento de reproducción asistida, así como a los 3 y 6 meses. En los niños nacidos se evaluó la presencia de anticuerpos VIH al nacer, siendo en todos los casos negativos los resultados para la presencia del virus^{2,6,8,14,17,21,29}.

Se ha reportado que parámetros como la tasa de fertilización, la tasa de desarrollo embrionario y la calidad de embriones para transferencia son comparables entre parejas serodiscordantes y parejas infértiles sin infección, llegando a transferir en el grupo con VIH 2.0 embriones de buena calidad y en el grupo control 2.3^{4,7,12,29}. De acuerdo a éste y a otros estudios, las tasas de embarazo conseguidas en parejas serodiscordantes con técnicas de reproducción asistida son superponibles o incluso superiores a las que se obtienen en parejas infértiles que se someten a las mismas técnicas^{3,40}. En Europa, la tasa de embarazo con ICSI después del lavado seminal en parejas serodiscordantes es aproximadamente 45.5% y de recién nacidos vivos es de 36.3%. De igual forma, en EEUU son aproximadamente de 46% y 39%, respectivamente^{4,14,16}.

Los valores reportados indican que la edad materna así como la calidad inicial de la muestra seminal son los factores determinantes para el éxito del ciclo, más allá de los factores relacionados con la infección del VIH^{6,12,40}. De acuerdo con esto, desde el 2002 el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG), la ESHRE y la ASRM recomiendan que se ofrezca el lavado seminal a parejas serodiscordantes para VIH como medida de precaución^{4,17,21}.

Conclusiones

El lavado seminal resulta un tema crucial, ya que los espermatozoides son las células germinales que fertilizan el ovocito y transfieren la información genética masculina a la progenie²³. A pesar de la controversia que se ha generado

sobre la capacidad que tiene el virus para entrar en el espermatozoide, aún no existe suficiente evidencia sobre el posible mecanismo utilizado. Por esto siempre se debe mencionar al paciente que aún con el lavado, no hay garantía de que se elimine por completo el VIH existiendo un riesgo teórico de transmisión del 5%, ya que las partículas virales pueden permanecer en la muestra lavada y estar debajo del límite de detección de la prueba de PCR^{2,6,21,29}.

Se ha demostrado que es más eficiente la asociación de por lo menos dos técnicas de procesamiento seminal a la hora de eliminar las partículas virales. Por eso la técnica de lavado seminal para muestras con VIH se compone de una serie de diversos pasos de procesamiento seminal junto con una evaluación constante, que permita obtener como resultado espermatozoides móviles y libres de partículas virales para ser usados en técnicas de reproducción asistida^{1,3,4,6,8,12,16}.

Además se deben exigir pautas básicas para iniciar el procedimiento, como tratamiento antirretroviral para obtener cargas virales muy bajas o indetectables y estables durante varios meses, ya que la eficiencia del lavado seminal está relacionada con la carga viral y el estadio de la enfermedad^{6,8,12}.

Se sugiere que cualquier pareja serodiscordante utilice el método de ICSI, porque expone menos los ovocitos a los espermatozoides. Además, en algunos casos la calidad seminal se altera por la enfermedad y por los tratamientos, por lo cual también es recomendable, ya que tiene una mejor tasa de fecundación y disminuye la cantidad de ciclos necesarios para obtener un embarazo^{1,12,40}.

A pesar de esto las técnicas de lavado seminal y reproducción asistida no están al alcance de todo el mundo, bien sea por cuestiones económicas o geográficas, por lo cual existen nuevas investigaciones acerca de la concepción natural en este tipo de parejas, principalmente en regiones de bajos recursos. El embarazo por vía natural solo debe plantearse si la infección del VIH está bien controlada y si se realiza con un asesoramiento especializado constante, es decir con cumplimiento de los tratamientos antirretrovirales, mo-

nitoreo regular de la carga viral tanto en plasma como en semen y coitos programados^{43,44,45,46,47}. Con todo esto aún hace falta más investigación para poder estimar el riesgo de transmisión que conlleva este método de reproducción en parejas serodiscordantes para VIH y se debe tener en cuenta que no existe una correspondencia exacta en cuanto a las concentraciones del virus presente, la respuesta a las terapias antirretrovirales e incluso los genotipos virales existentes en las gónadas y en el plasma sanguíneo, por lo que resulta recomendable contemplar todas las opciones reproductivas de manera individual en cada caso y realizar el lavado de semen también a aquellos varones con carga viral indetectable cuando sea posible^{44,48}.

Además, se ha reportado una tasa de seroconversión de 4.3% en una serie de 104 concepciones naturales, por lo cual queda claro que las parejas serodiscordantes que intenten concebir de forma natural asumen un riesgo significativo de transmisión viral⁴².

De acuerdo a esto se propone que todas las técnicas que reduzcan el riesgo de transmisión deben ser parte del asesoramiento para personas viviendo con VIH que quieran tener hijos en todo el mundo. De cara al futuro se busca integrar el lavado seminal en protocolos de prevención para disminuir la incidencia de transmisión sexual del VIH y más en escenarios donde el hombre no tiene fácil acceso a los tratamientos antirretrovirales⁴¹. Por esto se deben realizar esfuerzos para desarrollar técnicas de lavado de semen y reproducción a bajo costo que se puedan usar en escenarios de bajos recursos, ya que la mayoría de los estudios a la fecha son realizados en países de ingreso alto y medio^{41,42}. El planteamiento ético actualmente mayoritario es ayudar a las parejas serodiscordantes para VIH basándose en tres grandes cuestiones: reducir al máximo la transmisión sexual del VIH durante la concepción, manejar adecuadamente la fertilidad de estas parejas y prevenir la infección del recién nacido^{3,5,16}.

Finalmente, al ver que las técnicas de procesamiento seminal no afectan los resultados del laboratorio como la tasa de fertilización y la calidad embrionaria, resulta su-

mamente recomendable y efectivo el uso de la técnica de lavado seminal, en conjunto con una terapia antirretroviral potente, antibioticoterapia profiláctica previa y técnicas de reproducción asistida para parejas serodiscordantes, en donde sólo el hombre está infectado, ya que se han demostrado excelentes resultados en la eliminación de fuentes activas de transmisión del virus y en la obtención de gametos seguros, proporcionando así gestaciones saludables sin seroconversión de la pareja o el bebé^{3,6,5,7,8,9,12,40}.

Bibliografía

1. Van Leeuwen E, Repping S, Prins JM, Reiss P, Van Der Veen F. Assisted reproductive technologies to establish pregnancies in couples with an HIV-1-infected man. *Neth J Med*. 2009;67:322-7.
2. Newmeyer T, Tecimer SN, Jaworsky D, Chirin S, Gogh K, Rachlis A, et al. Case series of fertility treatment in HIV-discordant couples (male positive, female negative): the Ontario experience. *PLoS One*. 2011;6:e24853.
3. López de Argumedo González de Durana M, Gutiérrez Iglesias A, Galnares Cordero L. Lavado de semen en parejas VIH serodiscordantes para su uso en técnicas de reproducción humana asistida. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco; 2013. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias: OSTEBA. Disponible en: http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/2014_osteba_publicacion/es_def/adjuntos/Lavado%20de%20semen.pdf (Consulta agosto 2016).
4. Savasi V, Mandia L, Laoreti A, Cetin I. Reproductive assistance in HIV serodiscordant couples. *Hum Reprod Update*. 2013;19:136-50.
5. Delvaux T, Nöstlinger C. Reproductive choice for women and men living with HIV: contraception, abortion and fertility. *Reprod Health Matters*. 2007;15(29 Suppl. 1):46-66.
6. Sánchez I, Sánchez MC, García I, Pascual P, Jiménez MI, Castilla JA. Lavado de semen en hombres con enfermedades infecciosas transmisibles. Documentos de la SEQC. 2014:52-7. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/281447891_Lavado_de_semen_en_hombres_con_enfermedades_infecciosas_transmisibles (Consulta agosto 2016).
7. Queiroz P, Taddeo C, Madaschi C, Rodrigues D, Iaconelli A, Firmbach F, et al. Obtenção de gametas seguros por meio de associação de técnicas de processamento

- seminal para casais sorodiscordantes para HIV. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008;30: 171-6.
8. Canto C, Segurado A, Pannuti C, Cedenho A, Srougi M, Spaine D, et al. Detection of HIV and HCV RNA in semen from Brazilian coinfecting men using multiplex PCR before and after semen washing. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2006;48:201-6.
 9. Matthews LT, Smit JA, Cu-Uvin S, Cohan D. Antiretrovirals and safer conception for HIV-serodiscordant couples. *Curr Opin HIV AIDS.* 2012;7:569-78.
 10. Goede AL, Vulto AG, Osterhaus AD, Gruters RA. Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part I: epidemiology and pathogenesis of HIV infection. *Ann Pharm Fr.* 2015;73:87-99.
 11. Van Leeuwen E, Wit FW, Repping S, Eeftink Schattenkerk JK, Reiss P, Van der Veen F, et al. Effects of antiretroviral therapy on semen quality. *AIDS.* 2008; 22:637-42.
 12. Nicopoullou J, Almeida P, Vourliotis M, Goulding R, Gilling-Smith C. A decade of sperm washing: clinical correlates of successful insemination outcome. *Hum Reprod.* 2010;25:1869-76.
 13. Kehl S, Weigel M, Müller D, Gentili M, Hornemann A, Sütterlin M. HIV-infection and modern antiretroviral therapy impair sperm quality. *Arch Gynecol Obstet.* 2011; 284:229-33.
 14. Schuffner A, Lisboa A, Rosa V, Silva M. Use of assisted reproductive technology to separate sperm from human immunodeficiency virus infected men resulting in pregnancy among serodiscordant couples. *Braz J Infect Dis.* 2011;15:397-8.
 15. Muciaccia B, Corallini S, Vicini E, Padula F, Gandini L, Liuzzi G, et al. HIV-1 viral DNA is present in ejaculated abnormal spermatozoa of seropositive subjects. *Hum Reprod.* 2007;22:2868-78.
 16. Eke AC, Oragwu C. Sperm washing to prevent HIV transmission from HIV-infected men but allowing conception in sero-discordant couples. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;(1):CD008498.
 17. Savasi V, Ferrazzi E, Lanzani C, Oneta M, Parrilla B, Persico T. Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Hum Reprod.* 2007; 22:772-7.
 18. Kashima K, Takakuwa K, Suzuki M, Makino M, Kaneko S, Kato S, et al. Studies of assisted reproduction techniques (ART) for HIV-1 discordant couples using washed sperm and the nested PCR method: a comparison of the pregnancy rates in HIV-1-discordant couples and control couples. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62:173-6.
 19. World Health Organization European Region. Support for sexual and reproductive health in people living with HIV. 2006. Disponible en: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/70099/E90840_Chapter_9.pdf (Consulta marzo 2017).
 20. U.S. Department of Health and Human Services. Recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1-infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV-1 transmission in the United States. 2016. Disponible en: <https://aidsinfo.nih.gov/Guidelines> (Consulta marzo 2017)
 21. Nicopoullou JDM, Almeida P, Vourliotis M, Gilling-Smith C. A decade of the spermwashing programme: correlation between markers of HIV and seminal parameters. *HIV Med.* 2011;12:195-201.
 22. ONUSIDA. Hoja informativa, Noviembre de 2016. Disponible en: <http://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet> (Consulta diciembre 2016)
 23. Wang D, Li LB, Hou ZW, Kang XJ, Xie QD, Yu X, et al. The integrated HIV-1 provirus in patient sperm chromosome and its transfer into the early embryo by fertilization. *Plos One.* 2011;6:e28586.
 24. Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG, Collodel G, Ceccherini EC, Crisa N, et al. HIV particles in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte. *J Cell Biol.* 1994;127: 903-14.
 25. Brogi A, Presentini R, Moretti E, Strazza M, Piomboni P, Costantino-Ceccarini E. New insights into the interaction between the gp120 and the HIV receptor in human sperm (human.sperm/gp120/galactoglycerolipid/antigalactosylceramide/seminolipid/sperm maturation). *J Reprod Immunol.* 1998;41:213-31.
 26. Li F, Li L, Zhong Y, Xie Q, Huang J, Kang X, et al. Relationship between LTR methylation and gag expression of HIV-1 in human spermatozoa and sperm-derived embryos. *Plos One.* 2013;8:e54801.
 27. Cardona W, Rugeles M, Cadavid A. Interacción entre espermatozoides humanos y el virus de la inmunodeficiencia humana. *Actas Urol Esp.* 2009;33:223-6.
 28. Luciano AM, Franciosi F, Dieci C, Lodde V. Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: A journey in company with follicular cells. *Anim Reprod Sci.* 2014;149: 3-10.
 29. Frainais C, Vialard F, Rougier N, Aegerther P, Damond F, Ayel JP, et al. Impact of freezing/thawing technique on sperm DNA integrity in HIV-1 patients. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27:415-21.
 30. Lambert-Niclot S, Poirot C, Tubiana R, Houssaini A, Soulié C, Dominguez S, et al. Effect of antiretroviral drugs on the quality of semen. *J Med Virol.* 2011;83:1391-4
 31. Frapsauce C, Grabar S, Leruez-ville M, Launay O, Sogni P, Gayet V, et al. Impaired sperm motility in HIV-infected

- men: an unexpected adverse effect of efavirenz?. *Hum Reprod.* 2015;30: 1797-806.
32. World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Switzerland: WHO, 2010. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf?ua=1 (Consulta marzo 2017)
 33. Petyin S, Neunton C, Thanaboonyawat I, Laokirkkiat P, Choavaratana R. Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. *J Assist Reprod Genet.* 2014; 31:1673-80.
 34. Sociedad Española de Fertilidad (SEF). Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. 2007. Disponible en: <http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/completo.pdf> (Consulta marzo 2017)
 35. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproduction in couples with HIV. 2011. Disponible en: <https://www.eshre.eu/Specialty-groups/Special-Interest-Groups/Andrology/Archive/Archive.aspx> (Consulta diciembre 2016)
 36. Araujo FM, Henriques IS, Monteiro FP, Meireles ER, Cunha-Ribeiro LM. Detection of HIV-1 subtype G using Cobas Ampliscreen test. *J Clin Virol.* 2004;30:205-6.
 37. Scuracchio P, Poli M, Lemos M, Oliveira A, Salles N, Chamone D, et al. Detection of HIV-1 infection in blood donors during the immunological window period using the nucleic acid-amplification technology. *Transfus Med.* 2007;17:200-4.
 38. Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Foresta C. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *J Reprod Immunol.* 2013;100:20-9.
 39. Barreto N, Meseguer M, Bellver J, Remoh J, Pellicer A, Garrido N. Human immunodeficiency type-1 virus (HIV-1) infection in serodiscordant couples (SDCs) does not have an impact on embryo quality or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome. *Fertil Steril.* 2008;89:141-50.
 40. Zamora MJ, Obradors A, Woodward B, Vernaev V, Vasena R. Semen residual viral load and reproductive outcomes in HIV-infected men undergoing ICSI after extended semen preparation. *Reprod Biomed Online.* 2016;32:584-90.
 41. Zafer M, Horvath H, Mmeje O, Van der Poel S, Semprini AE, Rutherford G, et al. Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2016;105:645-55.
 42. Sauer MV, Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, Vardhana P, Jovanovic V, et al. Providing fertility care to men seropositive for human immunodeficiency virus: reviewing 10 years of experience and 420 consecutive cycles of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2009;91:2455-60.
 43. Del Romero J, Baza MB, Río I, Jerónimo A, Vera M, Hernando V, et al. Natural conception in HIV-serodiscordant couples with the infected partner in suppressive antiretroviral therapy. A prospective cohort study. *Medicine.* 2016;95:30:e4398.
 44. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, Van Lunzen J, et al. Sexual activity without condoms and risk of HIV transmission in serodifferent couples when the HIV-positive partner is using suppressive antiretroviral therapy. *JAMA.* 2016; 316:171-81.
 45. Sun L, Wang F, Liu A, Xin R, Zhu Y, Li J, et al. Natural conception may be an acceptable option in HIV-serodiscordant couples in resource limited settings. *PLoS One.* 2015; 10:e0142085.
 46. Grupo de estudio del SIDA-SEIMC (GESIDA). Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. 2017. Disponible en: <http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2017/gesida-guiasclinicas-2017-TAR.pdf> (Consulta marzo 2017)
 47. European AIDS Clinical Society (EACS). EACS Guidelines. 2016. Disponible en: http://www.eacsociety.org/files/guidelines_8.1-english.pdf (Consulta marzo 2017)
 48. Bourlet T, Levy R, Maertens A, Tardy JC, Grattard F, Cordonier H, et al. Detection and characterization of hepatitis C virus RNA in seminal plasma and spermatozoon fractions of semen from patients attempting medically assisted conception. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3252-5.