



Universidad de Granada

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**AVANCES EN LA ATENCIÓN A LOS DESEOS REPRODUCTIVOS DE
LOS VARONES VIH⁺ Y EN LA SEGURIDAD DE LAS TÉCNICAS DE
REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Purificación Navas Bastida

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Purificación Navas Bastida
ISBN: 978-84-9163-845-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/51122>

D. JOSÉ ANTONIO CASTILLA ALCALÁ, PROFESOR ASOCIADO LABORAL DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA, UNIVERSIDAD DE GRANADA. FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE LABORATORIO CLÍNICO Y UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. Purificación Navas Bastida ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: “AVANCES EN LA ATENCIÓN A LOS DESEOS REPRODUCTIVOS DE LOS VARONES VIH⁺ Y EN LA SEGURIDAD DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA” que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 4 de Septiembre de 2017

Fdo: José Antonio Castilla Alcalá

D. MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ RUZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA. JEFE DE SECCIÓN DE LA UNIDAD DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. Purificación Navas Bastida ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: “AVANCES EN LA ATENCIÓN A LOS DESEOS REPRODUCTIVOS DE LOS VARONES VIH⁺ Y EN LA SEGURIDAD DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA” que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 4 de Septiembre de 2017

Fdo: Miguel Ángel López Ruz

La doctoranda, Purificación Navas Bastida y los directores de la tesis, D. José Antonio Castilla Alcalá y D. Miguel Ángel López Ruz, garantizamos, que al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 4 de Septiembre de 2017

Directores de tesis

Doctoranda

Fdo: José Antonio Castilla Alcalá

Fdo.: Purificación Navas Bastida

Fdo: Miguel Ángel López Ruz

Agradecimientos:

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tienes que agradecer a tanta gente.

Principalmente al Dr. Jose Antonio Castilla, por creer en mí. Por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral a su lado, por su confianza y por compartir todos sus conocimientos. Gracias por todas las aportaciones, por su infinita paciencia y por transmitirme que con entrega y sacrificio todo llega.

Al Dr. López Ruz, por su disponibilidad y por todas las apreciaciones aportadas. Gracias por su colaboración en este proyecto.

A la Dra. M^a Carmen Gonzalvo, por su implicación durante mi formación, por la seguridad que nos da saber que siempre está ahí y por la confianza que ha depositado en mí. Por haberme escuchado y ayudado siempre. Me siento afortunada por haber podido aprender junto a ella.

A la Dra. Ana Clavero, por su cercanía y calidez. Por haberse involucrado durante mi formación y por hacer que los días de trabajo sean más divertidos.

A todos mis compañeros de laboratorio, María Serrano, Marina, Vane, Mario, Isa, Mercedes, Helena, María Navarrete, Mirian, Ana y especialmente a Alba. Gracias por hacer de esta etapa una de las más maravillosas y enriquecedoras de mi vida.

A Marisa y Luis, por ser las luces que me guían cuando me pierdo, por estar siempre a mi lado, apoyándome y animándome. Gracias por vuestra amistad, vuestros consejos, vuestra confianza y por las risas escandalosas. Pero sobre todo, gracias por estar siempre ahí cuando más os necesito.

A Toñi, enfermera de la Unidad de Reproducción, por preocuparse, animarme y acompañarme durante todo este camino. A Matías, el crack de las impresoras, por ayudarme de forma desinteresada y recibirme siempre con una sonrisa.

A todo el personal de la Unidad de Reproducción del HU Virgen de las Nieves de Granada por brindarme su ayuda siempre que la he necesitado y hacer que todo sea más fácil. A todos y cada uno, mil gracias.

A mis amigos Chus, Laura, Nati, Pechus y Mulero, por todo lo que hemos compartido y porque a pesar de la distancia, sé que puedo contar con vosotros. A Alberto, por saber sacarme una carcajada siempre. A Ana, por todo lo vivido y soñado juntas, porque no debiste partir tan pronto; te siento cerca, amiga.

A mi familia, por el apoyo constante e incondicional, especialmente a mis tías, Fina y Antoñi, porque sois mi ejemplo a seguir. A mis abuelos, Lucas y Pura, por contagiarme su fuerza.

A mi hermana mayor, Marga, porque gracias a ella he conocido al amor de mi vida, mi sobrino Alonso. A mi hermana pequeña, Cristina, por hacerme ver que nunca es tarde para continuar creciendo. A las dos, gracias por ser lo mejor que me ha pasado en la vida.

Finalmente, a mis padres, Jacinto y Francisca, por ser los pilares de mi vida. Por su sacrificio, comprensión, y cariño, por enseñarme a no rendirme nunca y por convencerme de que lo imposible solo tarda algo más en llegar. Porque su esfuerzo ha hecho que sea la persona que soy hoy y se lo debo a ellos.

A Alonso y Ana

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes **revistas** científicas:

- Lopez-Ruz MA, Navas P, López-Zúñiga MA, Gonzalvo MC, Sampedro A, Pasquau J, Hidalgo-Tenorio C, Javier R, Castilla JA. Effect of Monotherapy with Darunavir/Ritonavir on Viral Load in Seminal Fluid, and Quality Parameters of Semen in HIV-1-Positive Patients. PLoS One. 2016;11:e0159305.
- Navas P, Paffoni A, Intra G, González-Utor A, Clavero A, Gonzalvo MC, Díaz R, Peña R, Restelli L, Somigliana E, Papaleo E, Castilla JA, Viganò P. Obstetric and neo-natal outcomes of ICSI cycles using pentoxifylline to identify viable spermatozoa in patients with immotile spermatozoa. Reprod Biomed Online. 2017;34:414-421.

Y han sido presentados en las siguientes reuniones y congresos de sociedades científicas **nacionales** e **internacionales**:

- VIII Congreso Nacional de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). (San Sebastián, España) Noviembre 2015.
- XXIII Reunión Científica de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos. (Almería, España) Marzo 2016.
- 31º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad. (Málaga, España) Mayo 2016.
- Congresso Nazionale di Medicina e Biologia della Riproduzione. (Riccione, Italia) Mayo 2016.
- 32nd Annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). (Helsinki, Finlandia) Julio 2016.
- X Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. (Zaragoza, España). Octubre 2016.

GLOSARIO

ARV	Antirretrovirales
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
CDC	Centros para el control y prevención de enfermedades
CV	Carga viral
CVP	Carga viral plasmática
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DRV	Darunavir
DZT	Gemelos dicigóticos
eSET	Transferencia de embrión único
FET	Transferencia de embriones crioconservados
Gp	Glicoproteínas
IN	Integrasa
INI	Inhibidor de la integrasa
IP	Inhibidor de la proteasa
ITIAN	Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de los nucleós(t)idos
ITINAN	Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de los nucleós(t)idos
LPV	Lopinavir
MZT	Gemelos monocigóticos
NLS	Señal de localización nuclear
PVP	Polivinilpirrolodona
PTX	Pentoxifilina
RT	Retrotranscriptasa
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales
SHO	Síndrome de hiperestimulación ovárica
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TAR	Tratamiento antirretroviral
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
TE	Transferencia embrionaria
TI	Transcriptasa inversa
TRA	Técnicas de reproducción asistida
VHB	Virus de la hepatitis B
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes históricos de la infección por el VIH	3
1.1. Características generales del VIH	4
1.1.1. Estructura del VIH-1	4
1.1.2. Genoma del VIH-1	5
1.1.3. Ciclo biológico del VIH-1	10
1.2. Fármacos antirretrovirales.....	12
1.3. Estrategias actuales frente al VIH	17
1.3.1. Triterapia.....	18
1.3.2. Monoterapia con IP: DRV o LPV.....	19
2. Deseos reproductivos en parejas con varón VIH ⁺	28
2.1. Influencia del VIH sobre la fertilidad masculina	28
2.2. Opciones reproductivas en parejas con varón VIH ⁺	30
2.2.1. Reproducción natural	30
2.2.2. Profilaxis pre-exposición	32
2.2.3. Lavado de semen	34
2.2.4. Detección del virus en la muestra lavada.....	39
2.3. Técnicas de reproducción asistida	41
2.3.1. Resultados reproductivos tras TRA en parejas con varón VIH ⁺	41
2.4. Atención a los deseos reproductivos en nuestro medio.....	45
3. Tratamiento de la esterilidad y técnicas de reproducción asistida	45
3.1. Inseminación artificial	46
3.2. FIV/ICSI.....	47
3.3. Otras técnicas	49
3.4. Evaluación ovocitaria	50
3.5. Evaluación del cigoto	52
3.6. Evaluación embrionaria: Morfología estática	54
3.7. Sistemas de clasificación embrionaria.....	58
3.8. Nuevas técnicas de selección embrionaria: Morfocinética	62
3.8.1. Plataformas de morfocinética: Tecnología time-lapse.....	63
3.8.2. Ventajas y limitaciones de la tecnología time-lapse	63
3.8.3. Parámetros cinéticos embrionarios	65

3.8.4. Morfocinética y viabilidad embrionaria	70
3.9. Vitrificación embrionaria	70
4. Efectos adversos relacionados con la esterilidad y las TRA	71
4.1. Efectos adversos generales asociados con procedimientos invasivos	72
4.2. Efectos adversos específicos de los tratamientos utilizados en reproducción asistida	72
4.3. Efectos adversos asociados a las características particulares de la mujer sometida a técnicas de reproducción asistida	74
4.4. Errores médicos asociados a las TRA.....	74
4.5. Aspectos psicológicos	76
4.6. Seguridad en las TRA	76
4.6.1. Inseminación artificial.....	77
4.6.2. FIV/ICSI	79
4.6.3. Crioconservación de embriones.....	83
4.6.4. Día de la transferencia embrionaria	85
4.6.5. DGP	86
4.6.6. Inhibidores de la fosfodiesterasa.....	88
 JUSTIFICACIÓN	 91
 OBJETIVOS	 95
 MATERIAL Y MÉTODOS	 99
1. Efecto de la monoterapia con DRV/r sobre la calidad y carga viral seminal	101
1.1. Diseño experimental.....	101
1.2. Selección de pacientes	101
1.2.1. Criterios de inclusión.....	101
1.2.2. Criterios de exclusión.....	102
1.3. Características sociodemográficas, clínicas y de laboratorio en pacientes VIH ⁺	102
1.4. Características de parámetros seminales	102
1.4.1. Análisis de semen.....	102
1.4.2. Detección de carga viral en plasma seminal	104

2. Evaluación de la calidad embrionaria en parejas con varón VIH ⁺	104
2.1. Diseño experimental.....	104
2.2. Lavado de semen en varones VIH ⁺ que se someten a TRA.....	105
2.2.1. Lavado de semen	105
2.2.2. Detección de la carga viral.....	106
2.2.3. Congelación de semen	106
2.2.4. Protocolos de estimulación ovárica.....	107
2.2.5. Punción folicular y laboratorio de FIV-ICSI.....	108
2.2.6. Cultivo embrionario	110
2.4. Clasificación embrionaria mediante análisis de time-lapse. Parámetros morfológicos y morfocinéticos.	111
2.4.1. Parámetros morfológicos	111
2.4.2. Parámetros morfocinéticos	111
2.5. Transferencia embrionaria.....	113
2.6. Ciclos de criotransferencia	114
2.7. Evaluación de la gestación.....	116
3. Resultados obstétricos y neonatales en ciclos de ICSI realizados con pentoxifilina para identificar espermatozoides viables	117
3.1. Diseño del estudio.....	117
3.2. Selección de pacientes	117
3.3. Preparación de las muestras con pentoxifilina	118
3.4. Transferencia embrionaria.....	118
3.5. Evaluación y seguimiento de la gestación	118
3.6. Malformaciones neonatales.....	119
4. Análisis estadístico	119
4.1. Efecto de la monoterapia con Darunavir/Ritonavir sobre la calidad y carga viral seminal	119
4.2. Evaluación de la calidad embrionaria en parejas con varón VIH ⁺	120
4.3. Resultados obstétricos y neonatales en ciclos de ICSI realizados con pentoxifilina para identificar espermatozoides viables	121

RESULTADOS	123
1. Efecto de la monoterapia con Darunavir/Ritonavir sobre la calidad y carga viral seminal.....	125
1.1. Selección de pacientes	125
1.2. Características sociodemográficas, clínicas y de laboratorio	126
1.3. Características de parámetros seminales	127
1.4. Detección de carga viral en plasma seminal	132
2. Evaluación de la calidad embrionaria en parejas con varón VIH ⁺	133
2.1. Resultados de estimulación ovárica e ICSI en parejas VIH ⁻ y VIH ⁺	134
2.2. Evaluación embrionaria mediante análisis de time-lapse. Parámetros morfocinéticos directos e indirectos.	138
2.3. Resultados de la gestación en parejas con varón VIH ⁻ y VIH ⁺	144
2.4. Resultados de la técnica de vitrificación embrionaria en embriones procedentes de varones VIH ⁻ y VIH ⁺	145
2.5. Resultados de gestación acumulada en varones VIH ⁻ y VIH ⁺	147
2.6. Resultados obstétricos y neonatales en parejas con varones VIH ⁻ y VIH ⁺	148
3. Resultados obstétricos y neonatales en ciclos de ICSI realizados con pentoxifilina para identificar espermatozoides viables	150
3.1. Malformaciones neonatales.....	156
DISCUSIÓN	161
1. Efecto de la monoterapia con DRV/r sobre la calidad y carga viral seminal	163
2. Evaluación de la calidad embrionaria en parejas con varón VIH ⁺	168
3. Resultados obstétricos y neonatales en ciclos de ICSI realizados con PTX para identificar espermatozoides viables.	172
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	183

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos de la infección por el VIH

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue reconocido por primera vez en Estados Unidos en 1981, cuando los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) comunicaron la aparición inexplicable de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente denominado *P. carinii*) y de sarcoma de Kaposi en varones homosexuales previamente sanos de Nueva York y Los Ángeles (CDC, 1986). Pronto empezaron a aparecer casos que afectaban a varones y mujeres heterosexuales usuarios de drogas por vía parenteral, así como a sus hijos. También entre pacientes que habían recibido transfusiones de sangre completa o de productos sanguíneos por su condición de hemofílicos. De ello se concluyó que la causa debía ser un agente infeccioso que se transmitía de forma semejante a como lo hace el virus de la hepatitis B (VHB) (CDC, 1992).

Una vez conocidos los primeros casos de SIDA, se iniciaron las labores científicas destinadas a conocer más características de la enfermedad. Estas primeras investigaciones permitieron, en 1983, a Luc Montaigner y Barré-Sinoussi del Instituto Pasteur de París aislar un retrovirus humano en un paciente homosexual con linfadenopatías, al que denominaron virus asociado a linfadenopatía (Barre Sinoussi et al., 1983). En 1984 se demostró que este virus era el agente causal del SIDA y un comité taxonómico internacional acordó denominarlo virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Popovic et al., 1984).

Posteriormente, en 1987, tras múltiples debates sobre su autoría, este hallazgo lo compartieron los equipos de Luc Montaigner del Instituto Pasteur de París y de Robert C. Gallo del National Cancer Institute de Estados Unidos. Este grupo de virus tiene la peculiaridad de necesitar a la célula humana para transformar su información genética y replicarse, de ahí su enorme diversidad, que, a su vez, conlleva una gran dificultad para erradicarlo (Levin et al., 2001).

1.1. Características generales del VIH

El VIH pertenece a la familia de *Retroviridae*, subfamilia de *Lentivirinae* (Levy JA. 1993). Los retrovirus constituyen una familia grande y diversa de virus ARN envueltos, que están constituidos por un ARN de cadena única con dos hebras idénticas, que se copia en ADN lineal de doble cadena, para integrarse posteriormente en el genoma del hospedador. Por tanto el material genético es ARN en la partícula viral y ADN cuando se encuentra en la célula infectada. Este proceso de retrotranscripción es característico de los retrovirus; y se lleva a cabo mediante la acción de la enzima ADN polimerasa dependiente de ARN presente en el virus, la transcriptasa inversa (TI) o retrotranscriptasa (RT) que es una enzima fundamental para el virus (Coffin, 1992).

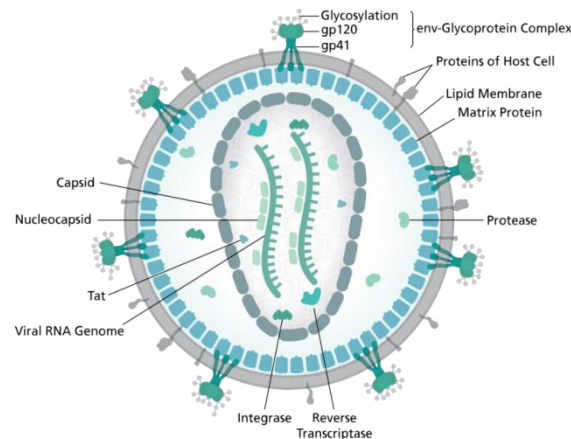
El VIH tiene una elevada tasa de mutaciones y una variabilidad e inestabilidad genéticas mucho mayores que otros virus y todos los seres vivos celulares. Esto es debido a que las enzimas que utilizan para su replicación son polimerasas sin actividad correctora, como ocurre con la TI. Este hecho, unido a las elevadísimas tasas de replicación habitualmente asociadas a los virus ARN, hace que las sucesivas generaciones virales sean cada vez más diferentes de las progenitoras desde el punto de vista genético, ya que van acumulando mutaciones que se localizan de forma aleatoria (Coffin, 1995).

1.1.1. Estructura del VIH-1

Se trata de una envoltura con estructura icosaédrica externa formada por una bicapa lipídica con 72 protuberancias externas formadas por las glicoproteínas (gp) gp120 y gp41 (Gelderblom et al., 1987; Moore et al., 2001; Zhu et al., 2008). La p17 está ligada a la parte interna de la bicapa lipídica, formando una matriz, y se cree que probablemente tenga una función de estabilización de los componentes externos e internos del virión. Estas envolturas protegen una cápside formada por cuatro proteínas, p24, p17, p9 y p7 (Figura 1), que se forman a partir de una proteína precursora de 53-kD producto del gen *gag* por acción de la VIH-1 proteasa. El polipéptido fosforilado p24 forma la estructura principal de la cápside. Y en el interior de la comentada cápside existe otra nucleocápside icosaédrica, compuesta por las proteínas p6

y p7, en cuyo interior se alojan dos filamentos idénticos de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple; un par de iniciadores de ARN transferente (ARNtLys); las enzimas virales proteasa (p10), integrasa (p31), ARNasa (p15) y transcriptasa inversa (p50); y varias proteínas reguladoras y accesorias (Gelderblom et al., 1987).

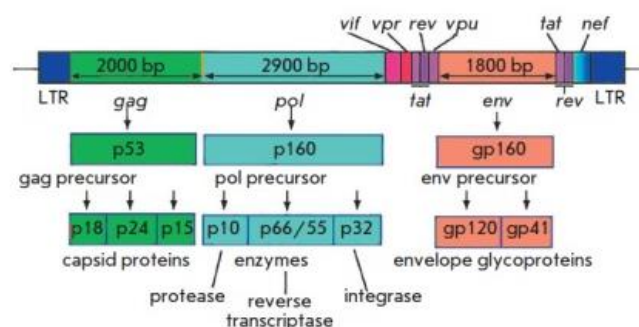
FIGURA 1: Estructura del VIH-1.



1.1.2. Genoma del VIH-1

El genoma del VIH se compone de tres regiones codificantes básicas, “group specific antigen gene” (*gag*), “DNA polymerase gene” (*pol*) y “envelope glycoprotein gene” (*env*). El esquema estructural clásico del genoma retroviral es 5’LTR-*gag-pol-env*-LTR 3’ (Seibert et al., 1995). Además posee seis genes adicionales: “trans-activator of transcription gene” (*tat*), “regulator of virion gene” (*rev*), “viral protein unknown gene” (*vpu*), “virion infectivity factor gene” (*vif*), “negative factor gene” (*nef*) y “viral protein r” (*vpr*) (Muesing M. et al., 1985; Steffy K and Wong-Staal F, 1991) (Figura 2).

FIGURA 2: Genoma del VIH-1 (Prokofjeva M et al., 2016).



◆ Precursor Gag-Pol

Los genes *gag* y *pol* sintetizan la poliproteína precursora Gag-Pol que por acción de la proteasa viral se escinde en las poliproteínas “group-specific antigen” (Gag) y “DNA polymerase” (Pol).

Durante la maduración del virión la proteína Gag (p55) es cortada por la proteasa viral en 4 fragmentos: La proteína de la cápside (p24), la proteína de la matriz (p17) y las proteínas que forman la nucleocápside (p6 y p7) (Gottlinger et al., 1989). Además de funciones estructurales, algunas de las proteínas escindidas de Gag tiene otras funciones durante ciclo replicativo del VIH. La p17 facilita la integración del ácido desoxirribonucleico (ADN) viral en el núcleo celular. La p6 es responsable de la incorporación de la proteína accesoria Vpr, codificada por el gen *vpr*, al virión en formación y de la interacción con la membrana de la célula huésped que hace posible la gemación. Por último, la p7 es responsable de la incorporación del ARN al virión en formación y es facilitadora de la transcripción inversa (Paxton W. et al., 1993) (Figura 3).

La poliproteína Pol, tras escindirse del precursor Gag-Pol, es dividida por acción de la proteasa viral en cuatro proteínas con actividad enzimática: La proteasa (p10), la transcriptasa inversa (p50), la ARNasa (p15) y la integrasa (p31) (Jacks et al., 1988). La proteasa (PR) actúa como un dímero y su función es separar las distintas proteínas del complejo Gag-Pol (Ashorn et al., 1990). La TI es una ADNpolimerasa dependiente tanto de ADN como de ARN. Es capaz de sintetizar una cadena complementaria de ADN viral a partir del ARN viral o de otra cadena de ADN viral, previamente transcrita a partir de ARN (Miller et al., 1989). La ribonucleasa H (ARNasa H) es la enzima que libera el ARN del complejo transcriptasa inversa-ADN viral de cadena simple para permitir que la transcriptasa inversa pueda producir una cadena complementaria de ADN viral y así poder formar una hebra de ADN viral de doble cadena (ADN proviral). Por último la integrasa (IN) es la enzima responsable de la inserción del ADN proviral en el genoma de la célula huésped.

◆ Vif

Vif es un polipéptido de 23 kDa y 193 aminoácidos esencial para la replicación viral en linfocitos periféricos, macrófagos y en algunas líneas celulares (Strebel et al., 1987; Malim and Emerman, 2008; Neil and Bieniasz, 2009). Para la infección de otras líneas celulares no es necesaria la proteína vif, esto sugiere la presencia de otra proteína celular que ejerce la misma función. Las cadenas de VIH que son vif-defectivas pueden entrar en las células, pero no pueden sintetizar el ADN provírico eficientemente (von Schwedler et al., 1994). Los viriones mutantes del gen vif se ven afectados en la estabilidad del complejo nucleoproteínico viral, mostrando nucleoproteínas del core incorrectamente ensambladas (Hoglund et al., 1994; Gaddis et al., 2003).

◆ Vpr

La proteína Vpr es un polipéptido de 14 kDa y 96 aminoácidos que posee una señal de localización nuclear (NLS) que regula su principal función, la importación al núcleo celular del complejo pre-integración del VIH (von Schwedler et al., 1994). Juega un importante papel en la capacidad infectiva del VIH sobre células que no se encuentran en división (Heinzinger et al., 1994; Le Rouzic and Benichou, 2005). También la proteína vpr es capaz de bloquear el ciclo celular en la fase G2 (Jowett et al., 1995; Rogel et al., 1995; Kogan and Rappaport, 2011).

◆ Vpu

El polipéptido Vpu es una fosfoproteína de 16 kDa y 81 aminoácidos, específica del VIH que se localiza en la membrana interna de la célula (Sato et al., 1990). Vpu se inserta en las membranas del aparato de Golgi y en endosomas celulares (Willey et al., 1992) donde realiza dos funciones separadas: actúa degradando los complejos intracelulares formados por CD4 y gp160 que dificultan el ensamblaje de las partículas virales (Willey et al., 1992; Dube et al., 2010), y actúan también incrementando la liberación de partículas en la superficie de las células infectadas (Tokarev and Guatelli, 2011). En ausencia de vpu, pueden verse un gran número de viriones unidos a la superficie de la célula (Klimkait et al., 1990).

◆ **Env**

El gen *env* codifica las proteínas estructurales de la superficie del virus. A partir del gen *env* se transcribe y traduce un precursor común para las glicoproteínas gp120 y gp41. Este precursor es una glicoproteína de 160 kD, la gp160, que sufre una rotura por acción de una proteasa celular dando lugar a la glicoproteína de superficie gp120 y a la glicoproteína transmembrana gp41. Por otro lado, la expresión de *env* hará que disminuya la expresión de CD4 en las células infectadas.

◆ **Nef**

Es una pequeña proteína de 27-35 kDa que se expresa en el citoplasma y parcialmente en la membrana celular. Actualmente se piensa que nef actúa como factor positivo aumentando la infectividad del VIH, manipulando la respuesta del huésped contra el patógeno, favoreciendo la replicación del VIH (Fisher et al., 1986; Chowes et al., 1994; Miller et al., 1994; Rhee and Marsh, 1994; Miller et al., 1995; Schaeffer et al., 2001). Induce cambios en la expresión de proteínas (CD4 entre ellas) en la superficie de la membrana celular de las células infectadas como los CD4 (García and Miller, 1992). Estos cambios provocan una disminución del umbral de activación de los linfocitos T CD4+ en reposo ante estímulos exógenos, a través de la interacción de estas células con los receptores de las células T infectadas (Cullen, 1999). Nef también es capaz de estimular la infectividad de los viriones (Rogel et al., 1995).

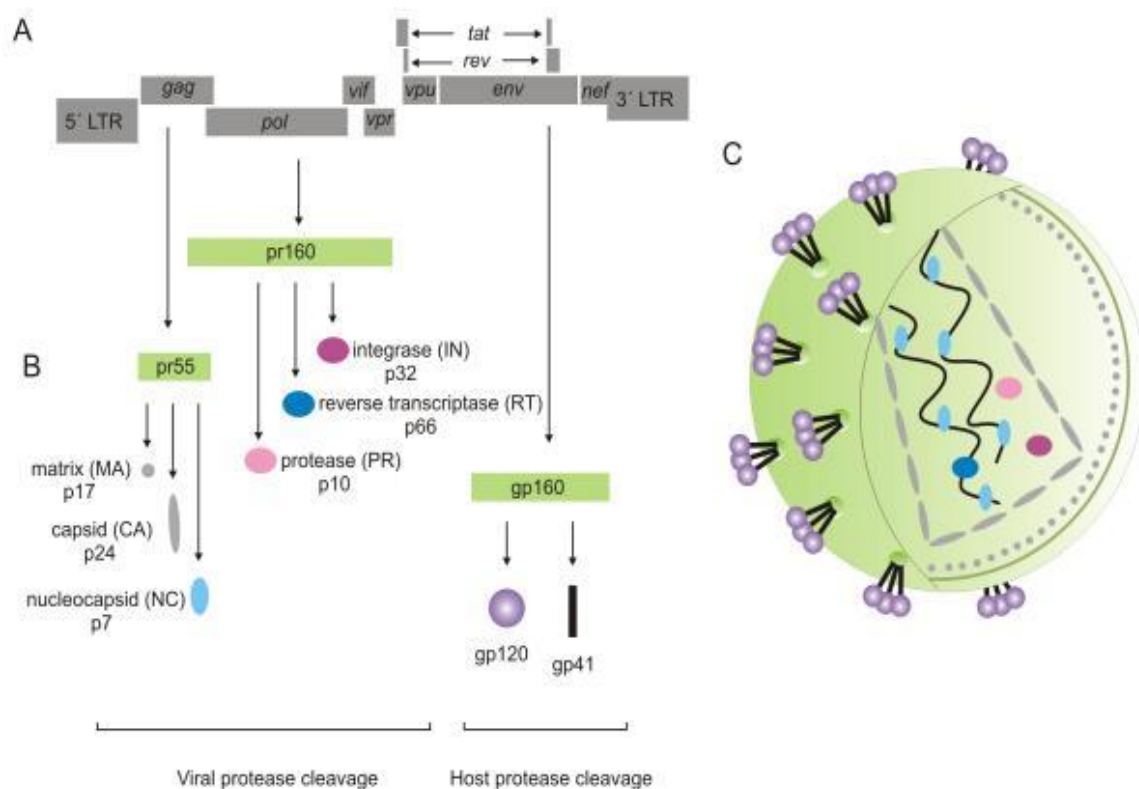
◆ **Tat**

La proteína Tat está implicada en la replicación del VIH (Meredith et al., 2009). Actúa como transactivador del ARN producido a partir del ADN proviral, promoviendo la elongación de la cadena de ARN (Feng et al., 1996). Según algunos estudios, tat actúa principalmente promoviendo la fase de elongación durante la transcripción (Kao et al., 1987; Feinberg et al., 1991). Otros estudios sugieren que tat incrementa la tasa de transcripción (Southgate and Green, 1991; Tiley et al., 1992; Okamoto, 2011). Gracias a la acción de Tat, se pueden transcribir las cadenas de RNA mensajero de 9KB y 4KB que codifican (Gag-Pol, Env, Vpr, Vif y Vpu). La migración de estas cadenas de ARN del núcleo al citoplasma celular está regulada por la acción de Rev (Lama et al., 1999).

◆ Rev

La proteína reguladora Rev permite junto con otras proteínas celulares el paso del ARNm no procesado desde el núcleo al citoplasma celular. Esto permite que se sinteticen las proteínas precursoras necesarias para la producción de partículas virales. En ausencia de Rev los transcritos son retenidos en el núcleo y degradados (Thomson Okatsu, 1998; Furnes et al., 2008).

FIGURA 3: Organización del genoma el VIH. (A) Representación de los nueve genes codificados por el genoma del VIH-1. (B) Los genes *gag*, *pol* y *env* codifican precursores proteicos (pr55, pr160 y gp160) que requieren tratamiento adicional por proteasas virales o celulares que generan proteínas estructurales necesarias para la formación de un virión maduro (C) (Lazar et al., 2016).



1.1.3. Ciclo biológico del VIH-1

El ciclo de replicación del virus de la inmunodeficiencia humana comienza con la unión del virus a una célula diana susceptible, mediante la interacción específica entre la glicoproteína viral de la envoltura gp120 y el receptor de superficie celular CD4 que está presente en los linfocitos Th (CD4+), macrófagos y algunas otras células (Maddon et al., 1986; Levy, 1998). En otros tipos celulares como células gliales y neuroblastos, el glicolípido galactosil ceramida parece actuar como receptor de la gp120 (Harouse et al., 1991).

Posteriormente a la unión celular, comienza el proceso de introducción del core viral en el interior del citoplasma celular. Este proceso es facilitado por la glicoproteína de la envoltura gp41, y en otros tipos celulares y cepas virales, por otros receptores de la membrana celular como: fusina, CKR5, CKR3, CKR-2b (Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996; Overbaugh et al., 2001).

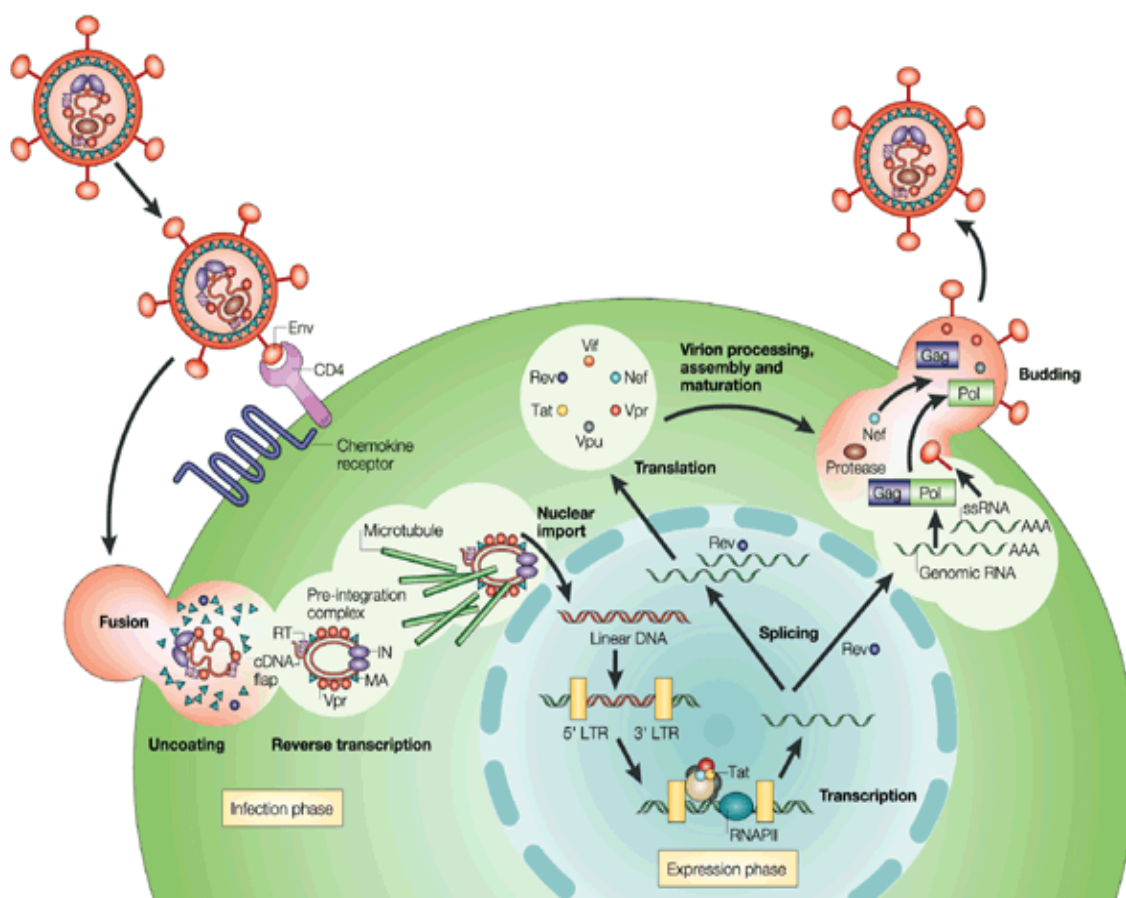
En los linfocitos T activados se produce la transcripción inversa del ARN viral creando una copia lineal de ADN (Katz and Skalka, 1990). La retrotranscriptasa viral (RT) crea muchas mutaciones en cada ciclo de replicación, es una enzima con muy poca fidelidad a la hora de replicar y puede introducir hasta diez errores en la incorporación de bases durante cada ronda de replicación (Preston et al., 1988; Roberts et al., 1988). Este proceso permite generar diferentes cepas virales que pueden alterar el tropismo celular, crear resistencias a los fármacos antirretrovirales (ARV) y facilitar el escape a la neutralización por el sistema inmunitario del huésped.

La integración del ADN viral en el ADN genómico depende de la actividad de la proteína viral IN. El ADN viral se puede integrar aleatoriamente en un gran número de sitios, pero existen regiones con mayor preferencia (Shih et al., 1988; Pryciak and Varmus, 1992; Schroder et al., 2002). La transcripción del ADN viral es regulada por factores de transcripción de la célula huésped infectada y por la proteína viral Tat (Liang and Wainberg, 2002; Alcamí et al., 2007).

Una vez es sintetizada la cadena completa de ARN, ocurren fenómenos de ajuste diferencial regulados por la proteína viral Rev para crear diferentes ARN mensajeros. Las partículas virales son ensambladas en la superficie de la célula huésped. Cuando Env es expresado en la célula infectada, disminuye la presencia del receptor CD4 celular. Esta reducción se debe a que en el retículo endoplasmático quedan bloqueados complejos gp160/CD4 (Buonocore and Rose, 1990). Los niveles de CD4 en la superficie celular están también regulados por las proteínas virales Nef y Vpu (Garcia and Miller, 1992; Willey et al., 1992). Es importante la reducción de los niveles de CD4 en la superficie celular para evitar interferencias durante el ensamblaje viral. Sólo los ARN transcritos de longitud completa son reconocidos por una estructura secundaria del ARN altamente estable y conservada para la formación de la nucleocápside viral (Harrison and Lever, 1992).

Las nucleocápsides ensambladas adquieren las proteínas de la envoltura durante la liberación a través de la membrana plasmática de la célula huésped. Las poliproteínas precursoras Gag y Gag-Pol son escindidas por acción de la proteasa viral PR durante o en el instante posterior a la liberación (Kaplan, 2002). La acción de la proteasa viral es esencial para la creación de viriones maduros infecciosos (Kohl et al., 1988).

Las familias de virus desarrollan una serie de complejos mecanismos, llamados de escape, para no ser eliminados por la respuesta defensiva del organismo ante su presencia. En el caso de los retrovirus, estos mecanismos corresponden básicamente al desarrollo de variabilidad genética, debida a la alta tasa de error de la transcriptasa inversa en la retrotranscripción y a la posibilidad de permanecer en estado latente en determinados reservorios (López Chicharro and López Mojares, 2008) (Figura 4).

FIGURA 4: Ciclo viral del VIH.

1.2. Fármacos antirretrovirales

En 1987 se aprobó el uso del primer inhibidor de la transcriptasa inversa la zidovudina, también conocido como AZT, como monoterapia en pacientes VIH⁺. No obstante, se demostró que la monoterapia no era efectiva ante el VIH, ya que el virus, presenta una rápida replicación y mutación, por lo que rápidamente se vuelve resistente a las terapias simples; por ello, las terapias (monoterapia o biterapia) con inhibidores de transcriptasa inversa eran capaces, en principio, de reducir la replicación del virus, pero en poco tiempo se volvían ineficaces. Ante esta situación, se hizo necesario el desarrollo de nuevos fármacos capaces de reducir drásticamente la carga viral, para con ello reducir también su capacidad de replicación y mutación. A mediados de 1996 apareció un nuevo tipo de fármacos antirretrovirales denominados inhibidores de la proteasa, enzima responsable de la replicación del virus dentro del linfocito. La inclusión de estos fármacos y su combinación con los anteriores

dio lugar a lo que hoy se conoce como terapia de gran actividad (TARGA o HAART del inglés *Highly Active Antiretroviral Therapy*) (Villa and Vinaccia, 2006). El TARGA se basa en combinaciones de tres o más fármacos, y permite conseguir una supresión sostenida de la replicación del virus y el incremento de los niveles de linfocitos CD4+.

Los fármacos antirretrovirales se clasifican según la etapa del ciclo de replicación del VIH sobre la que actúan. En función a su mecanismo de acción, los fármacos antirretrovirales disponibles actualmente se dividen en cuatro categorías: inhibidores de la TI, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la entrada y de la fusión e inhibidores de la integrasa (Tabla I).

a) Inhibidores de la TI

La TI es una enzima fundamental en el ciclo biológico del VIH, es un heterodímero compuesto de dos subunidades denominadas p66 y p51 (Hsiou et al., 1996). En la subunidad p66 se localiza el sitio activo de la enzima, formado por el dominio polimerasa y el dominio ARNasa H, mientras que la subunidad p51 actúa como soporte estructural de la subunidad p66 (Kohlstaedt et al., 1992). La TI sintetiza ADN y utiliza como molde ARN o ADN, y degrada ARN cuando se encuentra formando parte del complejo ARN-ADN (actividad ARNasa H).

Se clasifican en dos grupos en función a diferentes mecanismos de actuación:

- Inhibidores de la TI Análogos de los Nucleósidos o Nucleótidos (ITIAN).
 - Inhibidores de la TI No Análogos de Nucleósidos (ITINAN).
-
- Inhibidores de la TI Análogos de los Nucleósidos o Nucleótidos (ITIAN).

Los ITIAN son semejantes estructuralmente a los nucleósidos naturales y al igual que éstos, requieren ser trifosforilados en el citoplasma celular por una fosfoquinasa para ser biológicamente activos. Una vez fosforilados, compiten con los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) en su incorporación a la cadena de ADN sintetizada por la TI (Winter et al., 1996), interrumpiendo

su proceso de síntesis, ya que carecen de grupo hidroxilo en la posición 3' del azúcar y los nuevos nucleótidos no se pueden unir a la cadena de ADN sintetizada. Bloquean la elongación de la cadena de ADN viral, impidiendo la unión de nucleósidos adicionales.

- Inhibidores de la TI No Análogos de Nucleósidos (ITINAN).

Los ITINAN interactúan directamente con la TI del virus y bloquean su actividad enzimática. Se unen a esta enzima induciendo un cambio en su conformación que bloquea su centro catalítico y su actividad y, a diferencia de los ITIAN, no deben activarse para ejercer su actividad antirretroviral.

b) Inhibidores de la Proteasa (IP)

Los IP actúan como inhibidores competitivos, que se unen directamente a esta enzima, bloqueando su actividad e impidiendo que se generen las proteínas estructurales y las enzimas virales (transcriptasa inversa, proteasa e integrasa), esenciales para el ensamblaje de nuevos viriones capaces de infectar nuevas células. Lo que resulta en la formación de partículas virales inmaduras, y por lo tanto no infectivas (Tomasselli and Heinrikson, 2000).

Es la única familia de ARV cuya actividad afecta a varios pasos del ciclo replicativo del VIH, ya que al procesar de forma anómala algunos precursores poliproteicos, entre ellos la gp-160, que es precursora de la proteasa, la TI y la integrasa viral, afecta a los procesos de entrada, retrotranscripción e integración del ADN viral (Rabi et al., 2013). De esta forma consiguen niveles de inhibición muy elevados, una de las características que los hace candidatos ideales para la monoterapia.

En la actualidad se han valorado atazanavir (ATV), darunavir (DRV) y lopinavir (LPV), junto con dosis muy bajas de ritonavir (RTV) actuando éste como potenciador farmacológico, así como ATV y DRV con cobicistat (COBI) como potenciador farmacológico. Los IP administrados de esta forma se conocen como IP potenciados.

c) Inhibidores de la entrada y de la fusión

Se trata de inhibidores de la reordenación estructural de la glicoproteína gp41 de VIH, que actúa uniéndose extracelularmente a esta proteína de la envuelta del virus, de manera competitiva y específica, bloqueando la fusión entre la membrana del virus y la membrana de la célula diana, previniendo de esta manera la entrada del ARN viral en dicha célula.

Enfuvirtide bloquea la proteína transmembrana gp41 del VIH impidiendo la fusión del virión con la célula huésped. Maraviroc es un antagonista del receptor CCR5, el cual impide la interacción entre esta quimiocina receptora y la gp120. Solo es activo frente al VIH con tropismo CCR5.

d) Inhibidores de la integrasa (INI)

Los inhibidores de la integrasa inhiben la actividad catalítica de la enzima integrasa, enzima codificada por el VIH y necesaria para la replicación viral. La inhibición de la integrasa, evita la integración del genoma del VIH en el genoma de la célula huésped. Los genomas del VIH que no se integran no pueden dirigir la producción de nuevas partículas virales infectivas, por lo que inhibir la integración evita la propagación de la infección viral.

TABLA 1: Tipos de fármacos antirretrovirales comercializados.

Tipo de antirretroviral	Principio activo
Inhibidores de la TI: - Análogos de los Nucleósidos/Nucleótidos (ITIAN)	Zidovudina (AZT)
	Didanosina (ddl)
	Zalcitabina (ddC)
	Estavudina (d4T)
	Lamivudina (3TC)
	Emtricitabina (FTC)
	Abacavir (ABC)
	Tenofovir (TNF)
Inhibidores de la TI: - No Análogos de Nucleósidos (ITINAN)	Nevirapina (NVP)
	Delavirdina (DLV)
	Efavirenz (EFV)
	Etravirina (ETV)
	Rilpivirina (RPV)
Inhibidores de la Proteasa (IP)	Nelfinavir (NFV)
	Ritonavir (RTV)
	Indinavir(IDV)
	Saquinavir (SQV)
	Lopinavir (LPV)
	Fosamprenavir (FOS)
	Atazanavir (ATV)
	Tipranavir (TPV)
	Darunavir (DRV)
Inhibidores de la entrada y de la fusión	Enfuvirtida (ENF, T-20)
	Maraviroc (MVC)
Inhibidores de la integrasa (INI)	Raltegravir (RAL)
	Elvitegravir (EVG)
	Dolutegravir (DTG)

1.3. Estrategias actuales frente al VIH

Los principales motivos para iniciar el tratamiento antirretroviral son: la reducción de la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por el VIH, la recuperación y preservación de la función inmunológica, evitar el efecto nocivo de la replicación del VIH sobre posibles comorbilidades existentes y la prevención de la transmisión del VIH (Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2016; The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2008; The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2010).

La cifra de linfocitos CD4 es el indicador fundamental del estado inmunológico. Se utiliza para estadificar la infección VIH, evaluar el riesgo de comorbilidad o mortalidad, la vulnerabilidad a determinadas infecciones oportunistas, así como, la necesidad de su profilaxis. Una vez iniciado el TAR, suele producirse una fase de ascenso rápido de los linfocitos CD4 durante los primeros meses, seguida de una segunda fase de recuperación más lenta (Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2016).

La carga viral plasmática (CVP) desciende rápidamente tras el inicio de un TAR efectivo. Se entiende por respuesta virológica al tratamiento, la reducción de la CVP en más de 1 log a las cuatro semanas del inicio del TAR y ser indetectable (<50 copias/mL) tras 24 semanas de tratamiento, aunque en pacientes con CVP muy elevadas (superiores a 100.000 copias/mL) se puede tardar más de 24 semanas en conseguir niveles inferiores a 50 copias/mL. El objetivo de supresión de la CVP es conseguir, de forma permanente, unas cifras inferiores a 50 copias/mL, lo que se asocia a la máxima recuperación inmunológica y previene la aparición de mutaciones de resistencia (Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2016).

Una condición indispensable para conseguir la eficacia del TAR es la adherencia óptima de los pacientes al mismo. Se entiende por adherencia al TAR la capacidad del paciente para implicarse correctamente en la elección, inicio y cumplimiento del mismo, a fin de conseguir una supresión adecuada de la replicación viral. Numerosos estudios han demostrado que una adherencia

incorrecta es la primera causa de fracaso terapéutico (Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2016). Por ello, la adherencia al TAR sigue siendo un foco de atención de los profesionales sanitarios e investigadores.

Por otro lado, la alta tasa de mutación capacita al VIH para reaccionar rápidamente ante presiones selectivas ejercidas tanto por el sistema inmune del individuo, como por la administración de fármacos antivirales (Perelson et al., 1996). Esta capacidad adaptativa del VIH ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar terapias antivirales combinadas (Domingo et al., 2006).

1.3.1. Triterapia

La pauta recomendada para el tratamiento inicial de la infección por el VIH consiste en una combinación de tres fármacos antirretrovirales que incluyan dos ITIAN asociado a un INI, o un ITINAN, o un IP potenciado. Con estas combinaciones se puede conseguir una CVP inferior a 50 copias/mL en más del 80% de los casos a las 48 semanas (Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2017). Además de tratamiento inicial la triterapia está establecida como el tratamiento antirretroviral que garantiza la supresión mantenida de la replicación del virus, ya que gracias a esta terapia combinada, se previene la resistencia viral.

El TAR debe iniciarse en todos los pacientes con infección por VIH, con o sin sintomatología, y con independencia del número de linfocitos CD4+. Esta recomendación se sustenta en diferentes estudios observacionales, en algunos subanálisis de ensayos clínicos, y en dos grandes ensayos clínicos, para evitar la progresión de la enfermedad, disminuir la transmisión del virus y limitar el efecto nocivo sobre posibles morbilidades coexistentes (Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2017).

Aunque los beneficios de un régimen de triple terapia son incuestionables, los pacientes en terapia a largo plazo sufren riesgo de tener efectos secundarios, en particular toxicidad mitocondrial, efectos metabólicos y lipodistrofia (Gutmann et al., 2010). Estos efectos secundarios pueden aparecer al inicio o bien a lo largo del tratamiento. Aunque se han descrito en todos los medicamentos, el tipo y la gravedad están relacionados con la familia de antirretrovirales o con el propio medicamento. La predisposición del paciente puede ser determinante en su aparición: se han observado con más frecuencia en comorbilidades, enfermedades de base, uso concomitante de otros medicamentos o drogas. También se han implicado factores genéticos (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents, 2011).

Sin embargo, el TARGA es incapaz de erradicar la infección por el VIH porque éste permanece latente en diversos reservorios celulares en los que elude tanto la respuesta inmunitaria como la acción de los ARV. Diversos autores han encontrado CV en semen positiva, a pesar de CVP negativa en pacientes con triterapia (Günthard et al., 2001; Vernazza et al., 2007; Lambert-Niclot et al., 2010; Lambert-Niclot et al., 2012; Torres-Cornejo et al., 2016). Esta circunstancia tiene una gran trascendencia clínica, pues implica la necesidad de mantenerlo de por vida, lo cual entraña un elevado riesgo de incumplimiento terapéutico y, por ende, de resistencia farmacológica (Lozano and Domingo, 2011). Actualmente, existen avances que permiten establecer objetivos en lo referente a la reducción de la morbilidad, mortalidad, aumento de la tolerancia y comodidad para los pacientes. Con estos objetivos se han realizado estudios sobre la eficacia de la monoterapia con inhibidores de la proteasa potenciado con ritonavir (IP/r) como estrategia de simplificación del tratamiento.

1.3.2. Monoterapia con IP: DRV o LPV

La simplificación del TAR se define como el cambio de un esquema terapéutico que ha conseguido la supresión de la replicación viral por otro más sencillo que sigue manteniendo dicha supresión (Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2012). Las ventajas que pueden aportar este tipo de estrategias frente a otras más complejas son múltiples: la reducción de los

efectos adversos e interacciones, la mejora de la adherencia y la calidad de vida del paciente y la disminución de los costes. Además, en el caso de la monoterapia, a estas ventajas se le añade la de permitir el mantenimiento de otros fármacos como alternativas de tratamiento frente a una posible aparición de resistencias en un paciente en el futuro (Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2016).

Se realizaron diversos ensayos clínicos que trataban de dilucidar que ARV podían ser usados en monoterapia. Los ensayos IMANI y MONARK utilizaron LPV/r como estrategia de primera línea en pacientes *naïve*. El estudio MONARK (MONotherapy AntiRetroviral Kaletra) investigó la utilidad de LPV/r en monoterapia como tratamiento inicial de la infección por el VIH (Delfraissy et al., 2008). Mientras que los estudios IMANI 1 y 2 fueron estudios no comparativos en los que se exploró también la utilidad de la monoterapia con lopinavir potenciado con ritonavir (LPV/r) como tratamiento inicial de la infección por el VIH (Gathe et al., 2004; Gathe et al., 2007). En ambos, la monoterapia no resultó ser una opción adecuada como tratamiento inicial, ya que demostró una menor supresión viral frente a la triterapia (Gathe et al., 2004; Gathe et al., 2007; Delfraissy et al., 2008; Ghosn et al., 2010).

Existen otros ensayos clínicos que contemplaron la opción de usar la monoterapia como tratamiento de mantenimiento (simplificación), en vez de tratamiento inicial (Gasol Boncompte et al., 2013). Los únicos fármacos que disponen de evidencia suficiente para ser usados en monoterapia son LPV y DRV potenciados con RTV o DRV potenciado con COBI (Pulido et al., 2008; Nunes et al., 2009; Girard et al., 2017).

1.3.2.1. Monoterapia como tratamiento de mantenimiento y/o simplificación con LPV/r

Entre los ensayos clínicos realizados con monoterapia usando LPV/r podemos encontrar:

- **KalMO:** Se trata de un estudio aleatorizado llevado a cabo en 2 centros de Brasil. A las 48 semanas, los resultados por intención a tratar (IT) fueron: un 86% con CVP < 80 copias/ml en el brazo de monoterapia frente a un 83% en el de triterapia (Nunes et al., 2006).
- **OK:** Se trata de un estudio piloto multicéntrico, aleatorizado, abierto, que se llevó a cabo en 4 centros españoles. En el análisis realizado por intención de tratar (IT), el 81% de los pacientes en el brazo de monoterapia y el 95% de los del brazo de triterapia alcanzaron el objetivo primario de tener una CVP < 500 copias/ml de ARN viral en la semana 48 (Arribas et al., 2005).
- **OK04:** A partir de los resultados del estudio OK, se diseñó este estudio multicéntrico, aleatorizado, abierto, de no-inferioridad, que se llevó a cabo en 28 centros españoles. Los resultados tras 48 semanas fueron que el 94% de los pacientes en monoterapia y el 90% de los del brazo de triterapia no desarrollaron fracaso terapéutico, con un IC del 95% para la diferencia entre los 2 grupos de -11,8 a 3,4% ($p = 0,28$), cumpliendo los criterios preestablecidos de no-inferioridad (Pulido et al., 2008).
- **Estudio de Pierone et al. (2006):** Se trata de un estudio piloto, no comparativo, llevado a cabo en 2 clínicas estadounidenses. El 66% de los pacientes alcanzó el objetivo primario de CVP < 75 copias/ml a las 48 semanas (IC del 95%, 41-86,7%). El 72% completó la monoterapia con LPV/r durante las 48 semanas y de esos el 92% mantuvo CVP < 75 copias/ml a las 48 semanas (Pierone et al., 2006).

- Estudio de Singh et al. (2007): Se trata de un estudio aleatorizado y abierto, a 48 semanas, llevado a cabo en un solo centro en el Reino Unido. Se disponen resultados a 24 semanas que indican que no hay diferencias estadísticamente significativas en la tasa de supresión viral sostenida por IT (81% en el brazo de triterapia y 73,1% en monoterapia; $p = 0,64$) (Singh et al., 2007).
- Estudio de Sprinz et al. (2008): Es un estudio piloto, no aleatorizado, realizado en un centro de Brasil. Los resultados demuestran un 63% de pacientes con supresión virológica a los 2 años (Sprinz et al., 2008).
- Estudio de Ruane et al. (2007): Se trata de un estudio pequeño, prospectivo, abierto, realizado en un único centro, que evaluó la eficacia y seguridad del LPV/r en monoterapia como TAR de mantenimiento en pacientes con CVP indetectable, durante al menos los 9 meses previos a la simplificación y sin evidencia de resistencias previas a IP. De los 19 pacientes, 4 recibían LPV/r previamente al inicio del estudio. Sólo un paciente presentó fallo virológico, y presentó un virus sensible a LPV/r tanto en el genotipo, como en el fenotipo (Ruane et al., 2004).

El objetivo de la mayoría los ensayos clínicos fue evaluar la eficacia y la seguridad del LPV/r en monoterapia como mantenimiento frente a la triterapia con ITIAN o ITINAN. Estos estudios indican que la estrategia de simplificación a LPV/r mantiene la CVP suprimida en un gran número de pacientes y durante un período largo. Sin embargo, en algunos estudios, especialmente en el OK04, se observó una mayor incidencia de viremia de bajo grado (50-500 copias/ml) (Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el Sida, 2008).

1.3.2.2. Monoterapia como tratamiento de mantenimiento y/o simplificación con DRV/r

Se han realizado tres grandes estudios en monoterapia con DRV/r, el estudio MONET, MONOI y PROTEA:

- **MONET:** Se aleatorizaron 256 pacientes en dos grupos que recibieron monoterapia con DRV/r y triple terapia. Se trata de un estudio de no-inferioridad, abierto y controlado. El análisis principal, analizó el porcentaje de pacientes con CV <50 copias/ml tras 48 semanas sin elevación de la CV en ningún momento del estudio y sin cambio de tratamiento. El ensayo demostró la no inferioridad del brazo de monoterapia frente al de triple terapia a las 48 semanas, con un margen de no inferioridad del 12%. El porcentaje de pacientes con carga viral <50 copias/ml a las 48 semanas fue de 86,2 en el brazo de monoterapia frente al 87,8% en triple terapia (Arribas et al., 2010; Gasol-Boncompte et al., 2013).
- **MONOI:** Es un estudio prospectivo, abierto y de no-inferioridad, que evalúa la eficacia y la seguridad en 225 pacientes con supresión vírica con triple terapia, aleatorizados a monoterapia con DRV/r. La variable principal era la proporción de pacientes con CVP <400 copias/ml en la semana 48. Se consideró fracaso la obtención de dos niveles consecutivos de RNA VIH superiores a 400 copias/ml o un cambio de tratamiento. La eficacia fue del 94% en los pacientes en monoterapia frente al 99% en los pacientes en triple terapia en el análisis por protocolo, demostrando no inferioridad. El análisis por intención de tratar obtuvo unos valores de eficacia de 87.5% en monoterapia frente al 92% en triple terapia, y no demostró no inferioridad. En la semana 96, la tasa de supresión virológica (carga viral en plasma <50 copias/mL) no fue diferente entre las 2 estrategias. En el análisis por intención de tratar (ITT) fue del 93,8% en el brazo de monoterapia frente a 90.6% en triple terapia ($p = 0,43$), y en el análisis por protocolo, el 94,9% en el brazo de monoterapia frente a 89,7% en triple terapia ($p = 0,26$). A pesar de que

los pacientes con DRV/r en monoterapia experimentaron con más frecuencia episodios transitorios de cargas virales bajas (blips), no aparecieron mutaciones de resistencia a DRV (Gasol-Boncompte et al., 2013; Valantin et al., 2012).

- **PROTEA:** Es un ensayo controlado aleatorizado cuyo objetivo fue evaluar la eficacia y seguridad de la monoterapia con DRV/r como alternativa a la triple terapia en 273 pacientes. El principal objetivo del estudio era demostrar la no inferioridad en términos de porcentaje de participantes con CV <50 copias/ml tras 48 semanas de tratamiento, considerándose como fracaso virológico aquellos casos en que se cambiara el tratamiento inicial por cualquier motivo. Un 86,1% de los integrantes del grupo con monoterapia y un 94,9% de los integrantes del grupo con triple terapia alcanzaron una carga viral por debajo de 50 copias/mL. Sin embargo, tras 96 semanas de tratamiento el grupo de monoterapia mostró una eficacia menor al grupo de triterapia (75,2% vs 85,3%) (Girard et al., 2016).

1.3.2.3. Meta-análisis realizados con monoterapia

En un meta-análisis que analizó la eficacia de la monoterapia con IP/r no se encontraron diferencias significativas entre la triple terapia y la monoterapia (OR= 1,39, IC 95% 1,02-1,90) En cuanto a la seguridad, los pacientes tratados con IP/r en monoterapia mejoraron su calidad de vida y disminuyeron los efectos adversos (Saez de la Fuente et al., 2010). Otro meta-análisis más reciente concluye que la monoterapia presenta un incremento del riesgo de fracaso virológico frente a la triple terapia a las 48 semanas del 10-13% en el peor de los casos, sin embargo, estos pacientes consiguen altas tasas de resupresión viral (93%) tras la reintroducción de los inhibidores de la transcriptasa inversa (Mathis et al., 2011). También se han publicado resultados de esta estrategia en la práctica clínica, con resultados similares (Valencia-Ortega and Moreno-Celda, 2008; Moltó et al., 2007; Pierone et al., 2006).

La estrategia de simplificación a monoterapia con IP/r ha demostrado, como hemos visto, la no inferioridad frente a la triple terapia en pacientes que cumplen ciertos criterios. Al plantear su aplicación en la práctica clínica, se deben sopesar tanto las ventajas como los inconvenientes, con el objetivo de determinar en qué circunstancias podrían beneficiarse los pacientes de esta estrategia de simplificación.

Entre las ventajas destaca principalmente la mejora de la tolerancia, ya que al eliminar del tratamiento los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa, se evitan sus efectos adversos, mejorando de manera significativa su adherencia al tratamiento y evitando, además, las posibles interacciones de los inhibidores de la transcriptasa inversa con otros medicamentos, aunque no son frecuentes ni importantes en general.

En cuanto a los posibles inconvenientes de la monoterapia con IP, se han planteado principalmente tres:

a) Aparición de resistencias: La alta barrera genética de los IP hace que la aparición de resistencias sea baja, pero no nula, en pacientes con supresión virológica. Es importante destacar que en los pacientes en tratamiento con IP/r en monoterapia en los que han aparecido resistencias, la supresión viral se ha restablecido al reiniciar la triple terapia, sin que esto haya supuesto una pérdida de opciones terapéuticas (Pérez-Valero and Arribas, 2011).

b) Presencia de cargas virales bajas sostenidas: La presencia de cargas virales entre 50 y 200-500 copias/ml es más común en pacientes en monoterapia que en triple terapia, aunque sus implicaciones clínicas no están claras (Pulido et al., 2010). Todos los estudios muestran que el aumento de CD4 no es menor en pacientes en monoterapia que en los que mantienen la triple terapia, por lo que, en cualquier caso, esta baja viremia no parece afectar a la recuperación inmunológica de estos pacientes. Además, en la mayoría de los casos, la baja viremia no conllevó la aparición de mutaciones de resistencia. El origen de esta viremia de bajo nivel no está del todo aclarado, pero parece que la adherencia inadecuada podría desempeñar un papel importante, más del que desempeña

en pacientes en tratamiento con triple terapia, ya que la corta vida media de LPV/r hace que el fallo en una toma de medicación en pacientes en monoterapia conlleve más riesgo de rebote viral (Pulido and Llenas-García, 2008).

c) Control de la replicación viral en reservorios anatómicos: Que abordaremos en el siguiente apartado.

1.3.2.4. Monoterapia y reservorio genital masculino

El reservorio celular del VIH es inaccesible al TAR por una cuestión farmacodinámica. El ADN proviral, que es el elemento básico de este reservorio, está integrado en el ADN de la célula hospedadora, y no hay fármacos que puedan atacarlo de forma selectiva. A pesar de esta limitación, hace años se defendió la hipótesis de la erradicación de la infección por el VIH a partir de un tratamiento que fuese capaz de suprimir completamente la replicación del VIH. En ausencia de replicación, la curación llegaría cuando los reservorios celulares del VIH se agotasen; algo que, como en todos los ciclos biológicos, era cuestión de tiempo. La primera limitación importante para esta hipótesis se obtuvo cuando se supo que esas células CD4 quiescentes podían tener una vida media enorme, que impedía la eliminación del ADN proviral durante el período de la vida de una persona. La segunda limitación la proporcionó la evidencia de que nuestras estrategias terapéuticas actuales frente al VIH son incapaces de conseguir la supresión completa de la replicación del VIH. Es decir, que siempre hay, fundamentalmente dentro de estos reservorios celulares, una replicación residual que garantiza la continua infección de nuevas células, la renovación del ADN proviral y, por tanto, la perpetuación de la infección (Pasquau, 2008).

El tracto genital masculino es un reservorio donde no existe un paralelismo absoluto entre la carga viral del compartimento plasmático y la de este, donde la evolución genotípica del VIH puede ser distinta, y donde hay un acusado gradiente negativo de las concentraciones de los fármacos antirretrovirales (Pasquau, 2008). Diferentes estudios han comparado los

niveles de antirretrovirales en semen y sangre, documentando diferencias en cuanto a la penetración de varios fármacos en este compartimento (Lambert-Niclot et al., 2012; Osborne et al., 2013). La monoterapia con IP logra niveles de penetración bajos en el compartimento genital (Bunupuradah 2014) comparados con la sangre (Osborne et al., 2013). Mientras que la triterapia con ITIAN/ITINAN alcanza un alto nivel de penetración en el compartimento genital (Bunupuradah 2014).

Estudios realizados con pacientes en monoterapia con IP con atazanavir potenciado con ritonavir (ATV/r), muestran resultados contradictorios. Los dos estudios publicados hasta el momento describen la actividad antirretroviral de ATV/r en plasma seminal (Swindells et al., 2006; Vernazza et al., 2007). Ambos estudios suprimieron las CVP con triterapia antes de cambiar a monoterapia con ATV/r. Uno de ellos no mostró detección de ARN-VIH en el plasma seminal de 8 pacientes tras 24 semanas de monoterapia (Swindells et al., 2006), sin embargo, en el otro estudio, se detectaron altos niveles de ARN-VIH en el plasma seminal en 2 de 15 pacientes tras 24 semanas de tratamiento a pesar de la supresión viral completa en sangre (Vernazza et al., 2007). No se realizó medición farmacológica en semen en ninguno de los dos estudios (Sahali et al., 2008). Otros estudios realizados con monoterapia con lopinavir potenciado con ritonavir (LPV/r), como el estudio MONARK (monoterapia con LPV/r en pacientes *naive*) no detectaron CV en semen en ninguno de los participantes (Ghosn et al., 2008), sin embargo, en el estudio KALMO, encontraron concentraciones detectables de ARN-VIH en semen en 1 de los 15 pacientes del estudio (Nunes et al., 2009). Estos últimos resultados coinciden con el estudio realizado por Santos et al. (2016). Por otro lado, un estudio realizado con monoterapia con darunavir potenciado con ritonavir (DRV/r) y triterapia, detectó ARN-VIH en semen en 3 pacientes de 45 (uno con monoterapia y dos con triterapia) tras 48 semanas de tratamiento. Resultados similares a los observados por Santos et al. (2016). Todos ellos mostraron CVP indetectable. Estos resultados sugieren que existe una difusión pasiva desde el compartimento sanguíneo al compartimento genital, demostrando que aunque la penetración de DRV, en términos de concentración, sea baja, en términos de eficacia es óptima (Lambert-Niclot et al., 2010).

Según Lowe et al., (2004) la mayoría de los estudios muestran casi siempre un paralelismo estrecho en los acontecimientos inmunoviológicos entre el compartimento plasmático y el líquido seminal. Los IP aparecen en menor medida en semen. Esto es debido principalmente, a una mayor afinidad de los IP por las proteínas, quedando muy poca fracción libre que pueda difundirse al semen, y no debido a la dificultad de los IP de atravesar la barrera hematotesticular (Lowe et al., 2004).

En resumen podemos decir que actualmente, la monoterapia con IP es una estrategia terapéutica, alternativa al tratamiento antirretroviral convencional con tres antirretrovirales. Su uso está aceptado como tratamiento de mantenimiento en pacientes muy adherentes, con al menos seis meses de supresión viral, que no hayan experimentado fracasos terapéuticos previos con un régimen que contuviese un inhibidor de proteasa (Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2011).

2. Deseos reproductivos en parejas con varón VIH⁺

Las diferentes opciones de tratamiento antirretroviral han supuesto una mejora en la calidad y esperanza de vida de los pacientes, dando lugar a nuevas cuestiones como la fertilidad y la reproducción segura (Pilatz et al., 2014). La mayoría de los pacientes infectados por VIH están en edad reproductiva e intentan concebir hijos sanos, por lo tanto, sus demandas reproductivas, son cada vez más importantes (Wang et al., 2014).

2.1. Influencia del VIH sobre la fertilidad masculina

En 1991, Krieger et al. informaron por primera vez sobre la calidad seminal de pacientes VIH⁺ describiendo alteraciones en los parámetros espermáticos (Krieger et al., 1991) desde entonces, varios estudios han evaluado la calidad seminal en varones infectados con VIH (Dulioust et al., 2002; Nicopoullou et al., 2004; Bujan et al., 2007; Lambert-Niclot et al., 2011; Pilatz et al., 2014;).

La fertilidad de los varones infectados por VIH puede verse afectada por una disminución en la función testicular, expresada tanto por la disminución de testosterona, como por el aumento de globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) (Lorusso et al., 2010). Ha sido muy debatido el efecto del VIH sobre los parámetros seminales (WHO, 1999). Algunos autores encuentran que los parámetros seminales de los pacientes con VIH están por debajo de lo establecido (Muller et al., 1998; Dulioust et al., 2002; Nicopoullou et al., 2004; Bujan et al., 2007), mientras que otros no encuentran diferencias (Semprini and Fiore, 2004; Garrido et al., 2005; Lorusso et al., 2010). En un estudio que incluyó 55 hombres que no recibían tratamiento antirretroviral, los parámetros de semen no se veían afectados durante un periodo medio de 77 semanas (van Leeuwen et al., 2008a). No se encontró efecto adverso en la calidad del semen hasta que el recuento de las células CD4 bajaba de 200 células/mm³ o el paciente desarrollaba síndrome de inmunodeficiencia adquirida. De igual manera, ya había sido descrito el empeoramiento progresivo de los parámetros seminales de los eyaculados de varones infectados a medida que progresa el deterioro inmunológico y la enfermedad clínica (Muller et al., 1998), constatándose reducción en el recuento espermático, la motilidad y el porcentaje de formas normales (Politch et al., 1994; Muller et al., 1998; Jerónimo et al., 2017). Por lo que podemos concluir que la afectación seminal dependerá del estadio de la enfermedad.

Varios estudios han encontrado alteraciones en la calidad seminal en hombres VIH⁺, bajo terapia antirretroviral (monoterapia, biterapia, triterapia), en comparación con hombres VIH⁻. Han informado de una disminución significativa de la movilidad progresiva, concentración espermática y recuento total de espermatozoides, así como de un menor volumen de eyaculado en pacientes VIH⁺ sometidos a terapia antirretroviral (Muller et al., 1998, Dulioust et al., 2002; Nicopoullou et al., 2004). Sin embargo, otros estudios demuestran que los tratamientos antirretrovirales no perjudican la espermatogénesis en pacientes VIH⁺, siendo comparables los análisis de semen entre pacientes VIH⁺ y VIH⁻ (Lorusso et al., 2010). Lambert-Niclot et al. (2011) realizaron un estudio para determinar que antirretrovirales se asociaban a cambios en los parámetros seminales. No encontraron diferencias significativas entre los diferentes ARV

(ITIAN, ITINAN e IP) y los parámetros seminales estudiados, pero sí una tendencia a un menor volumen del eyaculado, una menor movilidad espermática progresiva y un menor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Cuando consideraban únicamente el régimen de ITINAN, obtuvieron diferencias significativas entre dos de ellos (nevirapina y efavirenz). Efavirenz demostró un menor movilidad progresiva y una menor vitalidad espermática de forma significativa, lo que podría afectar a los deseos reproductivos en varones VIH⁺ sometidos a este tipo de fármaco antirretroviral (Lambert-Niclot et al., 2011; Jerónimo et al., 2017).

2.2. Opciones reproductivas en parejas con varón VIH⁺

Ante parejas con varón VIH⁺, el consejo reproductivo integral y riguroso es prioritario, asumiendo que la reproducción asistida no siempre es la vía más idónea.

2.2.1. Reproducción natural

La reproducción natural debería ser la primera opción a valorar, en función del estado serológico de la pareja, estado de la infección en el varón seropositivo y del estudio básico de esterilidad.

El porcentaje de parejas serodiscordantes para VIH que tiene relaciones con deseos reproductivos, es decir, sin protección mediante métodos de barrera (Buchacz et al., 2001; Kalichman et al., 2002; Klein et al., 2003), ha ido aumentando conforme el TAR se ha ido implantando, ya que actualmente puede ser superior al 75% (Van Leeuwen et al., 2008b). En 2008, la Comisión Federal del SIDA/VIH de Suiza (Vernazza et al., 2008) declaró que una persona seropositiva para VIH con adherencia total al TARGA, con CVP indetectable durante al menos 6 meses y sin infecciones de transmisión sexual no transmitía el VIH a través de las relaciones sexuales, estimado en 1:100.000 el riesgo de transmisión en coito sin protección. Esta declaración fue objeto de múltiples debates, pero apoyó la concepción natural, propuesta anteriormente por grupos españoles (Barreiro et al., 2007; Bujan and Pasquier, 2016).

En 2006, un estudio español (Barreiro et al., 2006a) informó de 76 concepciones naturales en 62 parejas serodiscordantes para el VIH. El estudio realizado en parejas con varones con anticuerpos anti-VIH positivos en tratamiento con terapia antirretroviral de alta actividad y menos de 50 copias ARN-VIH/mL al menos durante 6 meses, registró 62 gestaciones sin seroconversiones en sus parejas seronegativas, recomendando a las parejas mantener relaciones no protegidas solo en días alternos y en el periodo próximo a la ovulación. Estos resultados deberían ser valorados con cautela y reafirmados por estudios más extensos antes de generalizar dicha práctica, tal como los propios autores recomendaran (Barreiro et al., 2006b). Recientemente, un estudio prospectivo realizado por Del Romero et al. (2016) en parejas serodiscordantes para VIH que optaron por la concepción natural y cumplían exhaustivos criterios de inclusión (pacientes en seguimiento con tratamiento ARV, supresión viral plasmática durante al menos 6 meses, adherencia máxima al tratamiento ARV, estado inmunológico conservado, carga viral y proviral indetectable en semen y ausencia de infecciones genitourinarias), obtuvo un total de 144 gestaciones espontaneas y 105 RNV (72,9%). Sin embargo, se detectó carga viral positiva en semen en un 6% de los pacientes, por lo que se les aconsejó evitar relaciones sexuales sin protección hasta que resultaran negativas. No se produjo ningún caso de transmisión horizontal o transmisión vertical del VIH. Por lo que concluyen que en ausencia de problemas de fertilidad y bajo condiciones controladas, la concepción natural podría ser un medio reproductivo seguro y eficaz para parejas que eligen esta opción.

Sin embargo, aunque existen estudios que afirman que no hay transmisión horizontal, no significa que no exista riesgo de transmisión en la concepción natural. Los riesgos y los beneficios deben de ser valorados al elegir esta opción (Sun et al., 2015). Existe una oposición a la reproducción natural en determinados varones VIH⁺ que se sustenta por los hallazgos de Dornadula et al., (1999) que detectan la presencia de VIH en semen en varones con anticuerpos anti-VIH y menos de 50 copias/mL en suero bajo tratamiento de triterapia. En el aparato genital, al igual que en el SNC, distintos factores locales pueden afectar a la infección por VIH. Entre estos factores

estarían la coinfección con otros patógenos de transmisión sexual, que pueden provocar condiciones inflamatorias que conlleven una mayor replicación del VIH (p. ej. Citomegalovirus) (Speck et al., 1999; Xu et al., 2005) o que algunos antirretrovirales no puedan alcanzar determinadas regiones del tracto genital masculino (Solas et al., 2003).

Para adoptar decisiones aplicando criterios de medicina basada en la evidencia deberíamos usar como medida de efecto el NNH (número de pacientes que se necesita tratar para prevenir un efecto adverso), que proporciona una medida de efecto fácilmente relacionable con la relación coste/eficacia. Debemos recordar que el riesgo de transmisión sexual de VIH de varón a mujer por coito en parejas estables es de 0,001 y que en parejas con baja carga viral este riesgo es diez veces menor (Gray et al., 2001). Si las parejas tratadas con técnicas de reproducción asistida son precisamente aquellas con baja o nula carga viral, demostrar que el riesgo de contagio utilizando lavado seminal es menor que con relaciones naturales requeriría un estudio sobre 3000 casos, y para un riesgo de 0,0001 se necesitarían 30.000 casos (Englert et al., 2004).

La casuística más completa publicada hasta el momento asciende a unos 4000 ciclos (Bujan et al., 2007), que representan una cifra muy lejana de los 30.000 casos comentados. No existe evidencia científica de calidad que demuestre la utilidad del lavado seminal, y será difícil obtenerla, ya que, considerando el actual estado de la práctica clínica, parece poco probable que se emprendan ensayos clínicos con metodología adecuada para generar la evidencia necesaria (Englert et al., 2004).

2.2.2. Profilaxis pre-exposición

En el caso de parejas seropositivas para VIH con buena adherencia al tratamiento con TARGA, estudios recientes han unido reproducción natural con coito programado y profilaxis pre-exposición (PrEP) (Matthews et al., 2010). La PrEP con TARGA diaria ha demostrado gran eficacia clínica contra la infección del VIH y es muy recomendada por la Organización Mundial de la Salud para

personas no infectadas por el VIH con alto riesgo de exposición (Jindal et al., 2016), por lo que se plantea como opción para reducir aún más el posible riesgo. Vernazza et al. (2011) describieron mayores tasas de gestación con PrEP que mediante IA en parejas serodiscordantes con varón seropositivo para VIH.

Truvada es un comprimido combinado que contiene emtricitabina y tenofovir, y ha sido aprobado para prevenir la infección en parejas no infectadas de hombres VIH⁺. Debido a que Truvada se debe tomar diariamente, la adherencia es una limitación (Jindal et al., 2016). En ensayos clínicos con adultos heterosexuales activos, el uso diario de PrEP oral con Truvada fue seguro y redujo el riesgo de contraer el VIH en un promedio de 63 a 75%. Se hallaron altos niveles de protección ($\geq 90\%$) en las personas cuyo nivel de fármaco en la sangre indicó que habían tomado el medicamento de manera consistente (Baeten et al., 2012; Thigpen et al., 2012). En ensayos con PrEP, se ha hecho un seguimiento durante un promedio de 1 a 4 años a las personas que estaban tomando el medicamento. Aunque el uso de la PrEP en adultos no infectados por el VIH no se asoció a graves riesgos para la salud, la seguridad de la PrEP a largo plazo no se ha determinado todavía.

En 2015 se publicó un ensayo para analizar el beneficio de la PrEP para parejas serodiscordantes con deseos de concebir (Hoffman et al., 2015). No se encontró ningún beneficio y se concluyó que siempre que el TARGA esté disponible para el varón VIH⁺, las parejas serodiscordantes pueden tener los resultados deseados sin añadir la PrEP. Además, en una reciente revisión realizada por Unemo et al., 2017 destaca que muchos de los beneficios observados en ensayos sobre PrEP se deben más a cambios en los hábitos sexuales que en el tratamiento en sí.

2.2.3. Lavado de semen

Los primeros casos de gestación conseguidos tras el lavado de semen en parejas con enfermedades infecciosas transmisibles fueron reportados por Semprini et al. (1992), que tras lavar 59 muestras de semen provenientes de 29 parejas serodiscordantes con hombre seropositivo y mujer seronegativa para VIH consiguió 17 gestaciones en 15 mujeres, no se produjo ninguna seroconversión ni horizontal ni vertical.

La técnica de lavado de semen consistió en someter al semen a una doble selección de espermatozoides: primero haciendo que atravesase por un gradiente de varias densidades mediante centrifugación y luego dejando que naden hacia arriba los espermatozoides móviles (swim-up). Estos espermatozoides son los que se utilizan para la inseminación, previa comprobación mediante PCR de la ausencia de VIH. De esta manera se consiguió lograr la fecundación con menor riesgo de contagio para la mujer y su descendencia.

Posteriormente a esta publicación, fueron apareciendo diferentes modificaciones a esta técnica: diferentes porcentajes de gradientes de densidad, tiempo y fuerza de centrifugación, y la utilización de diferentes dispositivos. Las diferentes técnicas de lavado de semen disponibles actualmente son:

a) Gradiente de densidad/Swim-up: Consiste en formar diferentes capas de densidades variables. La capa de mayor densidad estará en el fondo del tubo de centrifuga y sobre ésta se colocan otras capas en densidad decreciente. El número de capas, la densidad y el volumen de las mismas variarán dependiendo de los componentes de la muestra a separar. Cuando se realiza la centrifugación, cada componente celular comienza a descender por el gradiente hasta que llega a la zona en la que la densidad de la solución es igual a su propia densidad. La velocidad a la que sedimenta cada uno de los componentes depende fundamentalmente de su tamaño y de su forma. Los componentes de menor tamaño necesitan mayor fuerza de centrifugación y

mayor tiempo para alcanzar la capa de su misma densidad (Gorus and Pipeleers, 1981). Para conseguir la separación de los espermatozoides se pone la muestra de semen en la parte de arriba de un tubo de ensayo, donde se han preparado los gradientes a diferentes porcentajes. Se suelen realizar dos o tres capas de gradientes.

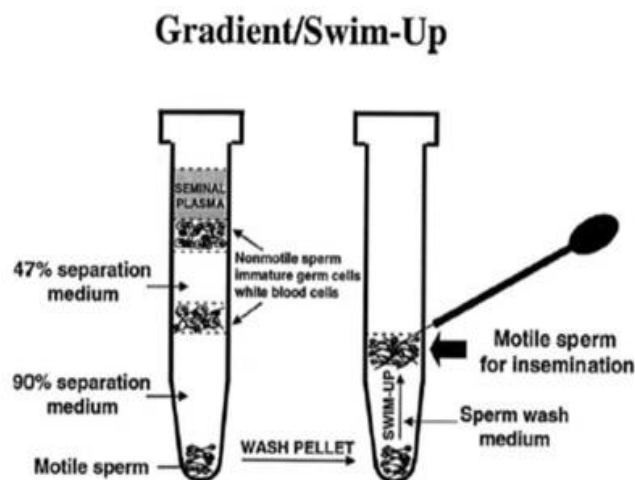
Para realizar los gradientes se utiliza una solución que habitualmente es de partículas coloidales de sílice. Existen diferentes productos para realizar los gradientes: SpermGrad, PureSperm, etc.

Se centrifuga a una velocidad y tiempo que varían según los diferentes estudios, oscilando entre los 300-400 g durante 20-30 minutos. Después de la centrifugación, los espermatozoides móviles se localizaran en la capa de mayor densidad, es decir, al fondo el tubo. Para recuperar esta capa se debe tener cuidado de que no se contamine con las otras capas superiores donde pueden estar presentes las partículas virales. El botón celular obtenido, tras ser lavado en un medio de cultivo una o dos veces, es recuperado y sometido a la técnica de swim-up. Esta técnica se basa en una selección de los espermatozoides por su movilidad. El botón celular recuperado del gradiente de densidad, se coloca en un tubo estéril al que se le añade cuidadosamente medio de cultivo, luego se coloca inclinado 45° en la incubadora a 37°C de temperatura y 6,5% de CO₂ durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se recoge el sobrenadante donde estarán los espermatozoides móviles, que habrán nadado hacia arriba desde el botón celular.

La muestra de espermatozoides obtenida se divide en varias partes: una parte se usa para la valoración de la muestra mediante recuento y movilidad espermática, otra para la determinación viral mediante PCR y una última fracción será utilizada para reproducción asistida, siempre y cuando la PCR haya sido negativa.

Algunos autores han criticado esta técnica de lavado pues se trata de un procedimiento relativamente largo que requiere conocimientos técnicos avanzados. Además, se ha observado que puede existir contaminación durante la etapa de recolección de la muestra al aspirar las capas superiores de gradiente y puede afectar a los espermatozoides móviles (Politch et al., 2004) (Figura 5).

FIGURA 5: Método de gradiente/swim-up (Politch et al., 2004).



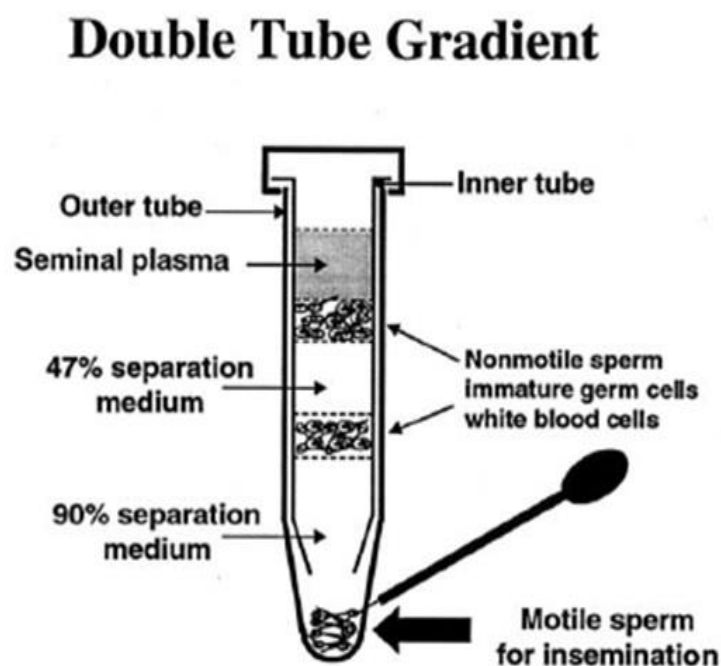
b) Tubo de doble gradiente: Se trata de un método que limita la contaminación de los espermatozoides durante el procedimiento de separación de gradientes, mediante la disposición del gradiente de densidad dentro de un tubo interno. El tubo interior es similar a una jeringa sin émbolo, desechable, colocada con el bisel hacia abajo dentro de un tubo cónico estándar de poliestireno de 15 mL. Primero se depositan los gradientes de densidad en el interior del tubo interno, para finalmente colocar encima de estos la muestra de semen. El tubo interno se sella con Parafilm (American National Can, Greenwich, CT) y se centrifuga la muestra, de tal forma que la abertura en la parte inferior del tubo interno permite a los espermatozoides móviles formar un botón celular en el fondo del tubo exterior (Figura 6). Tras la centrifugación de la muestra se retira el tubo interno que contiene los gradientes junto con el plasma seminal, dejando únicamente el gradiente de mayor densidad y los espermatozoides móviles en el fondo del tubo exterior. Gracias a que el tubo interno quedó sellado previamente, el material contaminado se puede desechar de forma limpia.

Parte del gradiente de mayor densidad puede permanecer en el tubo exterior junto con el botón celular que contiene los espermatozoides móviles, por lo que deberá ser retirado con una pipeta desechable. El botón celular debe de ser resuspendido en medio de lavado de semen y transferido a un tubo limpio para volver a centrifugar la muestra y eliminar las partículas coloidales que forman los gradientes de densidad (Politch et al., 2004).

Al igual que la técnica anterior, la muestra se divide en varias partes: para la valoración mediante recuento y movilidad espermática, para la determinación viral mediante PCR y para reproducción asistida, siempre y cuando la PCR haya sido negativa.

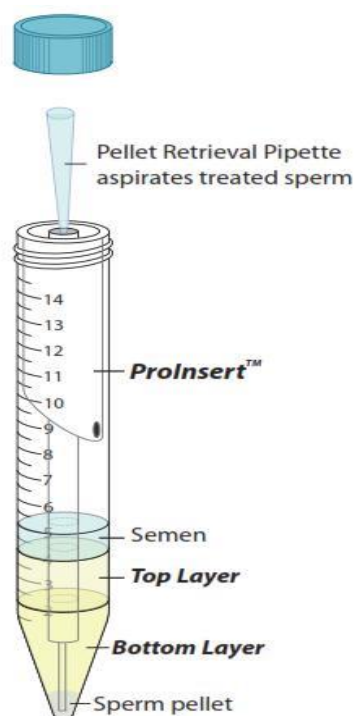
Este método es una técnica relativamente simple y rápida para excluir el VIH de la fracción móvil del semen, y la recuperación de espermatozoides móviles es mayor en comparación con el método estándar. Esta técnica parece ser prometedora, pero estos tubos no están disponibles en el mercado todavía.

FIGURA 6: Método de tubo de doble gradiente (Politch et al., 2004).



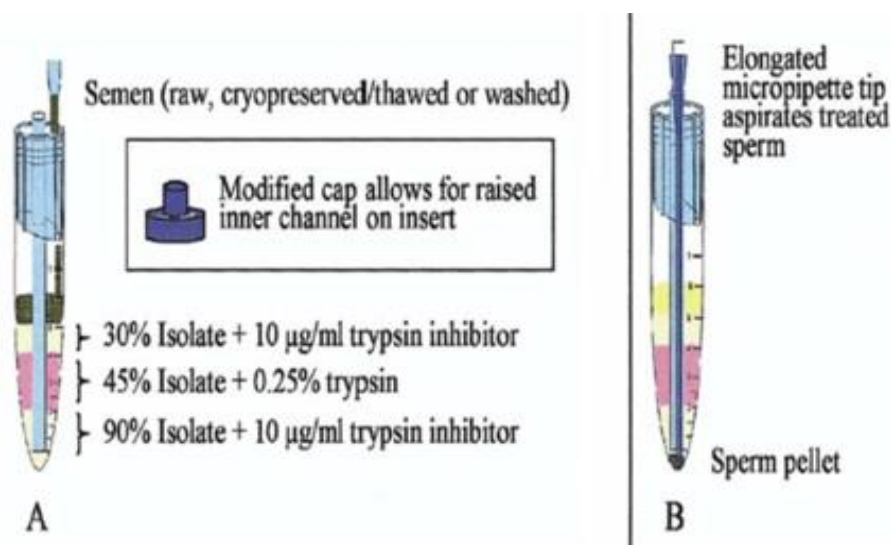
c) ProInsert™ (Nidacon): El ProInsert™ es un kit esterilizado que consta de dos tubos de centrifuga, uno de ellos contiene un dispositivo de polipropileno inserto con una cánula para la recuperación del botón celular (Figura 8). Dentro del tubo de centrifuga que contiene el dispositivo se preparan los gradientes de densidad, primero se añade el de mayor densidad, luego el de menor densidad y por último, la muestra de semen. Después de la centrifugación y a través de la cánula que contiene el dispositivo se recupera el botón celular, y se resuspende en el otro tubo de centrifuga incluido en el kit, que contiene un medio de lavado. Tras una segunda centrifugación, la muestra es dividida en varias alícuotas, que tendrán diferente destino, al igual que las anteriores técnicas (valoración mediante recuento y movilidad espermática, determinación viral mediante PCR y reproducción asistida, siempre y cuando la PCR haya sido negativa). Según Fourie et al., (2015) las TRA en combinación con el uso del lavado de semen con ProInsert™ es una opción muy segura, siempre que la PCR haya confirmado la ausencia de VIH en la muestra. Este método reduce el tiempo de preparación, aumentando el número de espermatozoides libres de VIH gracias a la efectividad y seguridad del dispositivo (Jindal et al., 2016).

FIGURA 8: Método ProInsert™ (Nidacon).



d) Múltiples gradientes de densidad + tripsina: Loskutoff et al. (2005) optimizaron el método comentado anteriormente de ProInsert mediante la adición de tripsina en el gradiente intermedio, junto con la adición de inhibidores de ésta en los gradientes superior e inferior (Figura 7). La adición de tripsina se realizó con el objetivo de evitar que las partículas del virus pudieran pasar al botón celular durante la centrifugación al adherirse a los espermatozoides móviles, ya que esta actúa rompiendo enlaces que se forman entre célula-envolturas virales. Sin embargo, la adición de tripsina puede influir de forma negativa durante la fecundación al disminuir la interacción entre espermatozoide y ovocito, por ello, fueron añadidos los inhibidores de tripsina, con el fin de evitar estos efectos deletéreos de la tripsina. Los autores concluyeron que este procedimiento es muy eficaz para inactivar el VIH del semen sin afectar la calidad de los espermatozoides.

FIGURA 7: Método de triple gradiente de densidad + tripsina (Loskutoff et al., 2005).



2.2.4. Detección del virus en la muestra lavada

Existen varios métodos comerciales para la determinación de la carga viral; HIV RNA PCR (Amplicor HIV-1 Monitor, Roche Molecular Systems), branched chain DNA o bDNA (Quantiplex HIV RNA Assay, Chiron), Nucleic acid sequence based amplification o NASBA (Nuclisense, Organon Teknika) (Galbis et al., 2012).

El método de detección más empleado es la PCR estándar, que amplifica enzimáticamente secuencias específicas del material genético, por lo que permite la cuantificación del ADN y del ARN del HIV de la muestra (carga proviral y viral). Se determina tanto si hay partículas libres ARN del virus como de la forma proviral ADN (virus integrado en el genoma de la célula infectada). Aunque las técnicas disponibles inicialmente (primera generación) detectaban sólo a partir de 10.000 copias/ml, las técnicas más utilizadas en la actualidad tienen un límite inferior de detección de 20 y 50 copias/ml (Pasquier et al., 2012). La negatividad de la prueba de detección de virus tras el lavado de la muestra, no permite excluir con total certeza la presencia de virus, cuya concentración en la muestra podría ser inferior al umbral de sensibilidad de la técnica. No obstante, no se ha descrito hasta la actualidad ningún caso de contagio, ni en las mujeres tratadas con este tipo de semen ni en los recién nacidos obtenidos, lo que nos sugiere que no es imprescindible realizar técnicas de detección de virus más complejas como la nested-PCR, que detecta hasta una copia del virus (Meseguer et al., 2002).

Diversos trabajos han puesto de manifiesto una alta variabilidad en los resultados de los test de detección de VIH en líquido seminal entre distintos laboratorios (Fiscus et al., 2000), por lo que se ha propuesto y desarrollado programas de control de calidad externo entre laboratorios que realicen estas técnicas (Bourlet et al., 2003; van Leeuwen et al., 2007; Pasquier et al., 2012). Estos programas han sido desarrollados por la asociación de Centros de Técnicas de Asistencia Reproductiva a las parejas de VIH en Europa (CREAThE), con centros en Reino Unido, Italia, Francia, Bélgica, España, Italia, Suiza e Israel (Jindal et al., 2016).

2.3. Técnicas de reproducción asistida

Las TRA además de utilizarse como tratamiento para parejas con problemas de fertilidad tienen la indicación de satisfacer los deseos reproductivos de parejas con enfermedades infecciosas transmisibles, para reducir al mínimo el riesgo de contagio del otro miembro de la pareja o de la descendencia. Una vez que la pareja ha optado por reproducción asistida, debemos decidir si realizar IA o FIV/ICSI.

2.3.1. Resultados reproductivos tras TRA en parejas con varón VIH⁺

Tradicionalmente, el lavado de semen para TRA ha sido utilizado para satisfacer las necesidades de las parejas con infertilidad o subfertilidad (Zafer et al., 2016). La inseminación artificial (IAC) ha sido el método elegido en los tratamientos de reproducción asistida en parejas serodiscordantes desde hace varias décadas, si las pruebas ginecológicas de la mujer lo han permitido, y el recuento de espermatozoides móviles era suficiente. Sin embargo, existen diversos casos en los que no está indicado el uso de la IAC, como por ejemplo, mujeres seronegativas con obstrucción de trompas de Falopio, casos de baja calidad seminal o con un bajo número de espermatozoides totales tras el lavado seminal que haga prever una baja tasa de embarazo, o incluso en fallos repetidos en las inseminaciones artificiales realizadas. En estos casos estaría recomendado el uso de ICSI o FIV (Galbis et al., 2012).

2.3.1.1. Inseminación artificial

Semprini et al., (2013) realizaron un estudio para evaluar la seguridad del lavado de semen en IAC cuando el varón es seropositivo para el VIH y la mujer seronegativa. Realizaron dos estudios simultáneos, un análisis retrospectivo y un análisis de seguimiento. En el análisis retrospectivo se analizaron 635 parejas con varón VIH⁺ que estaban inscritas en un programa de IAC con lavado de semen (2113 ciclos) y al 58% de estas parejas se les realizó el análisis de seguimiento (1365 ciclos). Todos los varones VIH⁺ estaban bajo tratamiento antirretroviral. Se realizó un lavado de semen con la técnica de gradientes de densidad/swim-up y posterior detección con PCR. En

el primer análisis obtuvieron una tasa de embarazo del 16%, con una tasa de recién nacido del 13%. La tasa acumulada de embarazo tras 3,8 ciclos de IAC tras lavado seminal fue de 48%, la tasa acumulada de recién nacido del 41% y la tasa de embarazo múltiple del 8%. En el segundo análisis obtuvieron una tasa de embarazo del 17%, con una tasa de recién nacido del 14%. La tasa acumulada de embarazo fue del 53% tras 3,4 ciclos de IAC, la tasa acumulada de recién nacido del 47% y la tasa de embarazo múltiple del 5%. No se detectó ningún caso de seroconversión.

Barnes et al., (2014) realizaron un meta-análisis en el que informaron que siempre y cuando el varón VIH⁺ sea buen candidato para IAC, el lavado seminal es el mejor método de elección por su seguridad y rentabilidad. El meta-análisis incluyó 24 estudios que comparaban los resultados de las diferentes TRA, así como la tasa de embarazo, tasa de embarazo múltiple y tasa de aborto con varón seropositivo y mujer seronegativa y varón seronegativo con mujer seropositiva. Sus resultados indicaron que tras 2393 ciclos de IAC con varón VIH⁺, la tasa de embarazo fue mayor por ciclo iniciado (17%) en comparación con la población VIH⁻, obteniendo un 10% de embarazo múltiple y un 19% de tasa de aborto espontáneo (Barnes et al., 2014). Los resultados obtenidos, coinciden con una revisión sistemática, que reportó 3900 ciclos de IAC en 1184 parejas con varón seropositivo y mujer seronegativa (Vitorino et al., 2011).

Por otro lado, Savasi et al. (2007) analizaron las tasas de embarazo clínico tras IAC con semen lavado en parejas cuyo varón VIH⁺ estaba bajo tratamiento ARV y parejas cuyo varón VIH⁺ no estaba bajo ningún tipo de tratamiento. Realizaron 2400 ciclos de IAC a 581 parejas serodiscordantes y aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, obtuvieron una tasa de embarazo clínico del 17,4% en aquellos que estaban bajo TARGA, mientras que en el otro grupo fue del 25%. No hubo ninguna seroconversión horizontal ni vertical y concluyeron que el lavado de semen es una técnica eficaz y debe de ser la técnica de primera elección cuando la mujer es menor de 40 años y no existe ningún problema de fertilidad. Por otra parte, Nicopoullou et al., (2010) recomiendan que si tras el lavado de semen se

recuperan menos de 2 millones de espermatozoides móviles, se proceda a cambiar la técnica a FIV/ICSI, ya que los parámetros seminales tienen menos impacto en el resultado.

A pesar de los buenos resultados obtenidos y la confirmación de cero casos de infección en mujeres o recién nacidos, tras más de 8000 ciclos de IAC, con semen lavado, no hay forma de garantizar que las partículas virales no estén presentes en la muestra final para IAC. Esto es debido a que la detección del virus depende de los métodos utilizados y la PCR, ya que se puede detectar el ADN-VIH, pero pueden existir partículas de ARN-VIH libres o asociadas a células (Jindal et al., 2016).

2.3.1.2. FIV/ICSI

Como ya hemos visto la calidad del semen puede estar afectada por la propia infección del VIH, por los tratamientos antirretrovirales utilizados (Politch et al., 1994; Dulioust et al., 2002; Lyerly and Anderson, 2001), y en otros casos, a pesar de ser muestras de semen aceptables, la técnica de lavado a la que se somete para eliminar el virus, hace que el semen resulte no apto para IA. Por lo que se recomienda la FIV en muchas parejas con varón VIH⁺. Por otro lado, al empeorar significativamente la calidad del semen lavado por el proceso de crioconservación, en espera del resultado de la PCR, muchos autores recomiendan realizar ICSI en vez de FIV (Lorusso et al., 2010), sin embargo, otros autores como Marina et al., (1998) recomienda hacer siempre ICSI en vez de FIV en varones VIH⁺, pues se reduce el riesgo de contagio al exponer al ovocito a un solo espermatozoide en vez de a miles como en la FIV.

Nuestro grupo (Molina et al., 2014) realizó un estudio retrospectivo donde comparaban los resultados obstétricos y neonatales tras TRA en pacientes VIH⁺, VHC y VHB, después de la técnica de lavado de semen. Las tasas de implantación, embarazo clínico y recién nacido fueron menores, aunque no significativas, en el grupo de parejas con varón VIH⁺. Informaron que esta tendencia a la baja entre parejas con varón VIH⁺ podría estar relacionada con la mala calidad embrionaria, ocasionada por el tratamiento

antirretroviral o la propia infección de VIH. Por otro lado, Melo et al., (2008) realizaron un estudio para evaluar la calidad embrionaria tras la ICSI de parejas cuyo varón es VIH⁺. Realizaron la técnica de lavado de semen con triple gradiente de densidad/swim-up y posterior congelación de la muestra, quedando a la espera del resultado de la PCR para el grupo de varones VIH⁺. El semen de varones VIH⁻ fue procesado con swim-up directo y congelado. No obtuvieron diferencias en la calidad embrionaria, salvo en el porcentaje de fragmentación, que fue mayor en las parejas cuyo varón es VIH⁺. Sin embargo, las tasas de embarazo clínico (46,7% vs 40,5%), embarazo múltiple (23,5% vs 21,8%) y aborto (14,3% vs 15,6%), fue muy similar en ambos grupos de pacientes por lo que concluyen que la calidad embrionaria no se ve afectada cuando la transferencia embrionaria es en D+3. Sin embargo, cuando estos embriones se cultivaban hasta día 5 ó 6 se observó un aumento significativo en el bloqueo embrionario del grupo de embriones procedentes de parejas serodiscordantes.

Diversos meta-análisis y revisiones sistemáticas argumentan que la ICSI cuenta con mejores resultados tras el lavado de semen que la IA (Zafer et al., 2016; Vitorino et al., 2011; Barnes et al., 2014; Savasi et al., 2013). En el meta-análisis realizado por Barnes et al. (2014) analizaron 12 estudios y 780 ciclos de FIV/ICSI en parejas con varón VIH⁺ y obtuvieron una tasa de embarazo por ciclo del 30%, una tasa de aborto del 25% y una tasa de gestación múltiple del 33%. Vitorino et al. (2011) realizaron una revisión sistemática sobre 10 estudios y 738 ciclos de FIV/ICSI y encontraron una tasa de embarazo del 38,1% y una tasa de aborto del 20,6%, resultados comparables con el estudio realizado por Sauer et al. (2009) en el que obtuvieron una tasa de embarazo del 37% tras analizar 450 ciclos de 181 parejas. En ningún estudio se encontró seroconversión de la mujer seronegativa.

Asimismo, se han analizado los resultados de la tasa acumulada de embarazo para este tipo de pacientes. Estos estudios muestran una tasa acumulada de embarazo clínico del 33%, mientras la tasa acumulada de embarazo evolutivo es del 26,8% sin ninguna seroconversión (Savasi et al., 2013).

2.4. Atención a los deseos reproductivos en nuestro medio

Como hemos comentado, las opciones reproductivas en estas parejas son varias, dependiendo estas de factores relacionados con la enfermedad y con las características clínicas de la pareja. La mayoría de Sociedades Científicas considera adecuada la atención a los deseos reproductivos de parejas con VIH⁺ (CDC, 2001; Shenfield et al., 2004; FIGO, 2006; Matorras and Hernández, 2007; ASRM, 2008). En lo que discrepan es en el abordaje terapéutico. A modo de ejemplo, en la Tabla 2, se presentan las recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) sobre este tema que coinciden con la Guía de Sistema Andaluz de Salud (Guía SAS, 2016).

TABLA 2: Protocolo de tratamiento para RHA en pacientes con VIH⁺

	Carga viral sérica (CV)	
	Negativa (paciente controlado)	Positiva
Varón Ac VIH+	Relaciones naturales en días alternos fértiles ^a (opción informada) ^{b,c}	Reproducción asistida con lavado seminal y determinación CV posterior ^e
Mujer Ac VIH+	Autoinseminación o relaciones naturales en días alternos fértiles ^a (opción informada) ^{b,d}	Desaconsejar embarazo y evaluar estado viral e inmunológico
Ambos Ac VIH+	Ambos pacientes CV sérica negativa: autoinseminación ^a (opción informada) ^{b,c}	Ambos pacientes CV sérica positiva: desaconsejar embarazo

^a Recomendación basada en consenso de expertos por ausencia de evidencia derivada de estudios de intervención.

^b Opción informada. Debe ser aceptada por la pareja.

^c En caso de rechazo de la opción informada se tratará como varón CV positiva.

^d En caso de rechazo, tratar con IAC en centro de origen, y si está indicada FIV/ICSI en la Unidad de Referencia del SSPA.

^e El EBE y la estimulación de la ovulación se realizarán en la Unidad de origen de la pareja y los procedimientos de laboratorio en la Unidad de Referencia del SSPA.

3. Tratamiento de la esterilidad y técnicas de reproducción asistida

La reproducción asistida engloba un conjunto de técnicas encaminadas a facilitar la fecundación del ovocito. Dentro de estas TRA se encuentran la inseminación artificial (IA), la fecundación in vitro (FIV) y la microinyección espermática intracitoplasmática (ICSI). En la mayoría de las técnicas de reproducción asistida es necesario realizar previamente tratamientos para la estimulación de la ovulación en la mujer, pues esto va a permitir aumentar considerablemente la tasa de éxito (ya que en vez de madurar un solo ovocito por ciclo se consigue que maduren varios). El seguimiento de la estimulación

ovárica se realiza mediante ecografía ovárica vía vaginal únicamente (inseminación artificial) o acompañado de determinación de niveles séricos de estradiol (FIV/ICSI) (Matorras and Hernández, 2007).

3.1. Inseminación artificial

Mediante la IA se depositan los espermatozoides en el tracto genital femenino. Según el tipo de semen utilizado la inseminación artificial se denomina de diferente forma:

- Inseminación artificial conyugal (IAC): inseminación artificial conyugal.
- Inseminación artificial de donante (IAD): inseminación artificial de donante.

La inseminación puede ser intracervical o intrauterina, según el lugar donde se deposite el semen. La tasa de embarazo es significativamente mayor con la inseminación intrauterina que con la inseminación intracervical, por lo que la primera es la más habitual (ESHRE Capri Workshop Group, 2009).

En la IAC la muestra de semen se obtiene por masturbación, en el mismo día en que se va a realizar la inseminación. Se recomienda al varón una abstinencia sexual previa, con el objetivo de maximizar la calidad de la muestra seminal en número y calidad de los espermatozoides. En la IAD el semen se descongela el mismo día de la inseminación, previa asignación del donante, según las características fenotípicas de la pareja (Clavero et al., 2007).

La muestra de semen se debe manipular en el laboratorio antes de la inseminación con dos objetivos. Primero, aislar un alto porcentaje de espermatozoides funcionales, con una alta movilidad y sin anomalías morfológicas de otros espermatozoides no viables, células y restos celulares presentes en el semen. Segundo, eliminar el plasma seminal (así como prostaglandinas, agentes infecciosos y otras sustancias presentes en él) que impediría la capacitación espermática (Sellés et al., 2004).

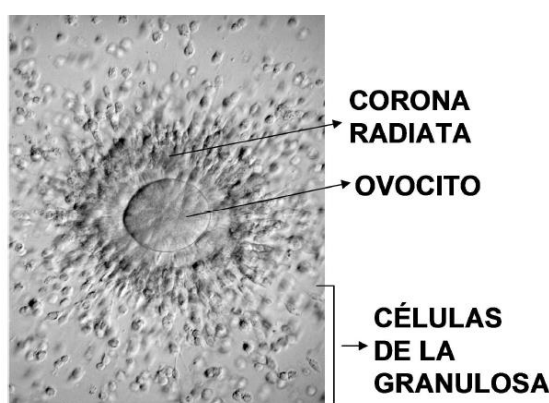
Entre las técnicas más utilizadas para seleccionar espermatozoides móviles se encuentran los gradientes de densidad y el swim-up. En pacientes con VIH⁺ se suele realizar primero la técnica de gradiente de densidad y a continuación la de swim-up, denominándose a esta combinación de ambas técnicas lavado seminal, como hemos visto anteriormente.

3.2. FIV/ICSI

La FIV hace referencia al desarrollo del embrión en el laboratorio, desde de los primeros estadios hasta el día quinto o sexto tras la fecundación. Una definición adecuada del procedimiento conocido como FIV sería: fecundación y progreso de los primeros estadios embrionarios fuera del organismo. Según el método de fecundación podemos hablar de FIV convencional o de ICSI (Galán et al., 2004).

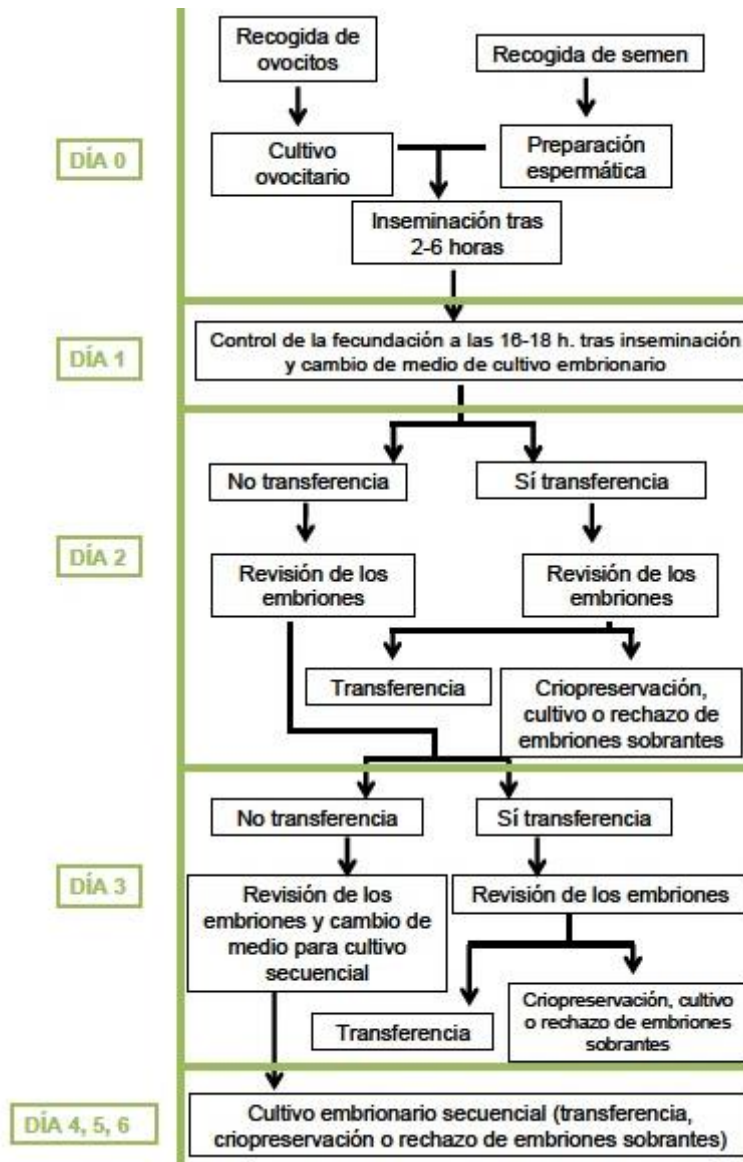
Como se ha comentado anteriormente, para llevar a cabo estas TRA es necesario realizar una estimulación de la ovulación en la mujer. Cuando, tras estimulación, los folículos ováricos ha alcanzado un tamaño de 17 mm se procede a desencadenar la ovulación mediante la hormona gonadotropina coriónica (hCG), la hormona gonadotropina luteinizante recombinante (LHR) o agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). A las 36 horas de esta inyección, mediante punción folicular ecoguiada, se procede a la aspiración de los folículos ováricos. El líquido folicular es trasladado al laboratorio de reproducción asistida, donde se realiza la identificación de los complejos cúmulo-corona-ovocito (Figura 9).

FIGURA 9: Complejo cúmulo-corona-ovocito.



En función de la técnica que se vaya a emplear, FIV o ICSI, el tratamiento del complejo cúmulo-corona-ovocito será diferente. En la FIV convencional se cultiva cada complejo con los espermatozoides a una concentración determinada, mientras que en ICSI se decumulan los complejos y cada ovocito será microinyectado con un espermatozoide. Al día siguiente se comprueba la fecundación, realizándose la transferencia de embriones al útero dos, tres o cinco días después de la punción folicular. Los embriones sobrantes se crioconservan en nitrógeno líquido. En la Figura 10 se esquematizan las diferentes etapas de laboratorio en FIV/ICSI.

FIGURA 10: Etapas de laboratorio en FIV/ICSI.



3.3. Otras técnicas

En determinadas situaciones clínicas, se ha sugerido incorporar otras técnicas de laboratorio al protocolo de FIV/ICSI clásico descrito. Entre estas tenemos la selección avanzada de espermatozoides, la eclosión asistida y el PGS (screening genético preimplantacional).

La selección de espermatozoides avanzada se realiza utilizando microscopía óptica de alta amplificación (IMSI) o mediante técnicas biológicas que seleccionan espermatozoides con determinadas características moleculares (receptores para Ac. hialurónico o aquellos que no expresen marcadores apoptóticos).

La eclosión asistida consiste en realizar una apertura en la zona pelúcida del embrión que le facilite su abandono en el proceso de eclosión. Dicha apertura puede realizarse mediante láser, mecánica o químicamente (ácido tyrode) (Aragonés et al., 2004).

El PGS consiste en biopsiar una o dos blastómeras de un embrión conseguido por ICSI en D+3, o trofoblasto en estadio de blastocisto, para determinar su contenido cromosómico mediante técnicas de CGH, o analizar su contenido génico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para obtener la biopsia se realiza una apertura en la zona pelúcida del embrión de igual modo que el indicado anteriormente para la eclosión asistida. También se puede biopsiar el primer o segundo corpúsculo polar, con el objeto de analizar su información genética (Aragonés et al., 2004).

Otra indicación de las técnicas de reproducción asistida, como ya hemos visto, es satisfacer los deseos reproductivos de parejas con enfermedades infecciosas transmisibles (VIH, hepatitis C,...) para reducir al mínimo el riesgo de contagio del otro miembro de la pareja o de la descendencia. En caso del varón seropositivo es necesario realizar una doble preparación del semen en el laboratorio (gradientes de densidad y después swim-up) y analizar la carga viral en esta muestra preparada.

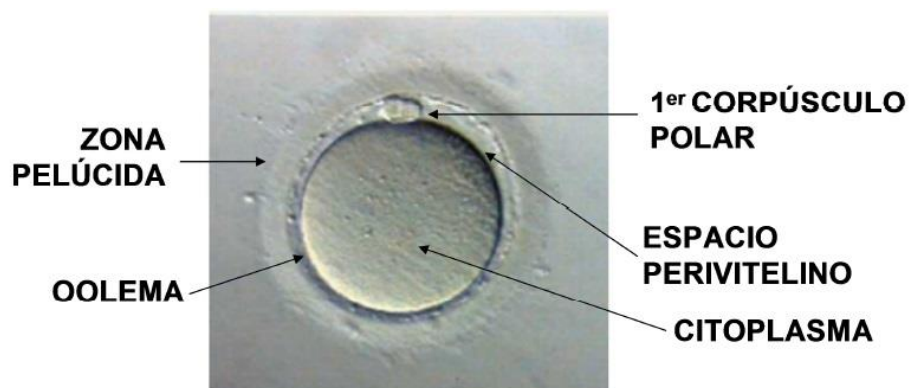
El manejo de los gametos y embriones de estas parejas debe realizarse bajo normas de seguridad biológicas adecuadas (Castilla and Magán, 2003).

3.4. Evaluación ovocitaria

La valoración de la calidad de los ovocitos obtenidos mediante punción folicular tras estimulación de la ovulación se puede realizar desde la introducción de la ICSI mediante la evaluación de aspectos morfológicos del ovocito tras su denudación y su correlación con el resultado del ciclo de tratamiento.

Los ovocitos recuperados de pacientes sometidas a tratamiento de estimulación ovárica para realizar TRA pueden encontrarse en diferentes etapas del desarrollo meiótico. Sólo los ovocitos que se encuentran en el estadio celular de metafase II (morfológicamente se observa que ha extruido el primer corpúsculo polar) son utilizados para ICSI. En cambio, los ovocitos en fase celular metafase I (morfológicamente no se observa el primer corpúsculo polar extruido) o profase I (morfológicamente muestra una vesícula germinal) no pueden ser utilizados para ICSI. Además, los ovocitos metafase II gigantes (diámetro mayor a 200 μ m) serán descartados para la ICSI, ya que suelen resultar en fecundaciones anómalas: diginia y triploidía (Balakier and Cadesky, 1997).

Los ovocitos en metafase II de buena morfología presentan un citoplasma claro, con una granulosidad moderada, un pequeño espacio perivitelino, un corpúsculo polar intacto y una zona pelúcida sin color (Figura 11).

FIGURA 11: Esquema de un ovocito en metafase II con buena morfología.

Sin embargo, más de la mitad de los ovocitos recuperados en un ciclo de FIV/ICSI muestran por lo menos una anomalía morfológica. Estas anomalías se pueden subdividir en citoplasmáticas o extracitoplasmáticas. Las primeras incluyen granulosidad o decoloración del citoplasma, agregación del retículo endoplásmico liso, vacuolización y presencia de incorporaciones en el citoplasma como cuerpos refringentes: cuerpos necróticos o picnóticos. Estas anomalías reflejarían defectos intrínsecos del ovocito en detrimento de su viabilidad. Las segundas incluyen irregularidades en la forma del ovocito, espacio perivitelino aumentado, presencia de restos en el espacio perivitelino, fragmentación del primer corpúsculo polar, así como consistencia anormal del oolema y de la zona pelúcida. Algunos de estos defectos se han asociado con una disminución de la tasa de supervivencia del ovocito tras la ICSI, pero no con la fecundación y calidad embrionaria.

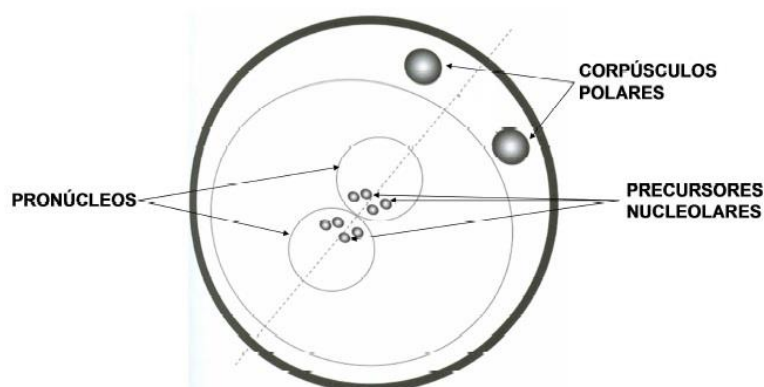
Serhal et al. (1997) y Loutradis et al. (1999) reportaron mayores tasas de embarazo en pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos normales frente a pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos con anomalías citoplasmáticas. Kahraman et al. (2000) encontraron menores tasas de embarazo a término en pacientes con ovocitos con citoplasma granuloso, y Alikani et al. (1995) observaron una disminución significativa en la pérdida preclínica de embarazo en pacientes con transferencias de embriones procedentes de ovocitos de buena morfología.

Actualmente, a excepción de los megaovocitos, no se suele considerar la calidad ovocitaria en la selección embrionaria, pues no todos los autores han observado las comentadas asociaciones entre morfología ovocitaria y embrionaria (De Sutter et al., 1996).

3.5. Evaluación del cigoto

La selección embrionaria será el resultado de la evaluación global del embrión: desde el estadio de cigoto hasta el día de la transferencia. La valoración del cigoto se realiza mediante la evaluación de parámetros morfológicos de los pronúcleos masculino y femenino, así como de sus precursores nucleolares tras 16-18 horas post inseminación mediante FIV o ICSI (Figura 12).

FIGURA 12: Esquema de un cigoto.



Los acontecimientos que se han podido observar en el ovocito tras una fecundación normal mediante ICSI se describen a continuación. Tras realizar la ICSI el ovocito muestra “ondas” circulares de granulación en el ooplasma con una periodicidad de 20 a 50 minutos. Durante esta fase de granulación la cromatina del espermatozoide se descondensa. A continuación el segundo corpúsculo polar es extruido y el pronúcleo masculino se forma en la zona central del ovocito. Acto seguido se forma el pronúcleo femenino que migra hacia la zona central del ovocito para encontrarse con el pronúcleo masculino. Ambos pronúcleos aumentan su tamaño y los precursores nucleolares se desplazan por el interior de cada pronúcleo para alinearse y quedar enfrentados.

Mientras que los pronúcleos se clasifican en base a la simetría, posición y localización de los mismos, los precursores nucleolares se evalúan en base al número, simetría y localización de los mismos. Sadowy et al. (1998) encontraron una fuerte correlación entre mosaicismo embrionario y cigoto con pronúcleos de diferente tamaño. Por otro lado, diferentes autores encuentran que el desarrollo del embrión en etapas tempranas puede verse afectado cuando se produce asincronía en la formación y polarización de los precursores nucleolares (Van Blerkom, 1990; Tesarik and Greco, 1999; Scott et al., 2000).

Otras características observadas para la clasificación del cigoto son la morfología y alineamiento de los corpúsculos polares el cual está relacionado con el eje polar de la primera división embrionaria, pudiendo producirse anomalías cromosómicas en el desarrollo embrionario si el alineamiento es incorrecto (Garello et al., 1999). Numerosos sistemas de gradación pronuclear han sido propuestos (Scott and Smith 1998; Tesarik and Greco 1999; Ludwig et al., 2000; Wittemer et al., 2000), pero actualmente no está en uso ningún sistema estandarizado para la gradación del cigoto. Ya que, como han demostrado los estudios de morfocinética embrionaria (Azzarello et al., 2012; Aguilar et al., 2014), tema que trataremos más tarde, el desarrollo pronuclear es un proceso dinámico y excluir un embrión basándose en una observación puntual puede llevar a errores (James et al., 2006).

Respecto a la morfología del citoplasma se evalúa la presencia de halo citoplasmático, la cual se produce por la redistribución de las mitocondrias alrededor de los pronúcleos, originando un anillo claro en la periferia del ooplasma. Diferentes publicaciones concluyen que la presencia de halo es una característica positiva, siempre y cuando no sea excesiva (Payne et al., 1997; Salumets et al., 2001; Zollner et al., 2002; Balaban and Urman, 2006). No obstante, esta característica corresponde a un proceso dinámico que puede no observarse en el cigoto en el momento de su evaluación, por lo que otros autores no consideran que sea un parámetro a tener en cuenta en la evaluación del mismo (Payne, 1997).

Finalmente, se puede realizar una segunda evaluación embrionaria 25-27 horas post-inseminación para evaluar la presencia o ausencia de los pronúcleos y/o la división temprana a dos células. Los estudios que evalúan la división temprana a las 25-27 horas post-inseminación, intentan correlacionar este parámetro con la morfología embrionaria en D+2 y D+3 (Lundin et al., 2001; Ciray et al., 2006), el desarrollo a blastocisto (Neuber et al., 2003), la viabilidad embrionaria (Shoukir et al., 1997; Salumets et al., 2003) y la tasa de implantación (Rienzi et al., 2005; Ciray et al., 2006), pero sus conclusiones son contradictorias. El uso de este parámetro está asociado con la calidad embrionaria en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, parece no mejorar la tasa de implantación ni la tasa de recién nacidos, por lo que se usa como un criterio adicional únicamente cuando la calidad embrionaria es subóptima (De los Santos et al., 2014).

3.6. Evaluación embrionaria: Morfología estática

La valoración morfológica del preembrión ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria. Para realizar esta valoración el embrión se observa la aparición de los pronúcleos (PN) entre las 16-22 horas post inseminación, la presencia de división temprana (DT) entre las 25-27 post ICSI o 27-29 post FIV, también se observa en el intervalo de 43-45 horas post inseminación (D+2) y 67-69 post inseminación (D+3) (Cuadros et al., 2015).

Los criterios más utilizados para seleccionar el número óptimo de embriones a transferir y reducir la incidencia de embarazo múltiple son: número de células, simetría celular y sincronía de división celular, porcentaje y tipo de fragmentación celular, visualización de núcleos y grado de multinucleación.

Número de células y ritmo de división

La cinética de división embrionaria hace referencia al número de células que se pueden observar en el embrión en sus diferentes estadios de desarrollo. Estos valores esperados quedan reflejados en la figura 13.

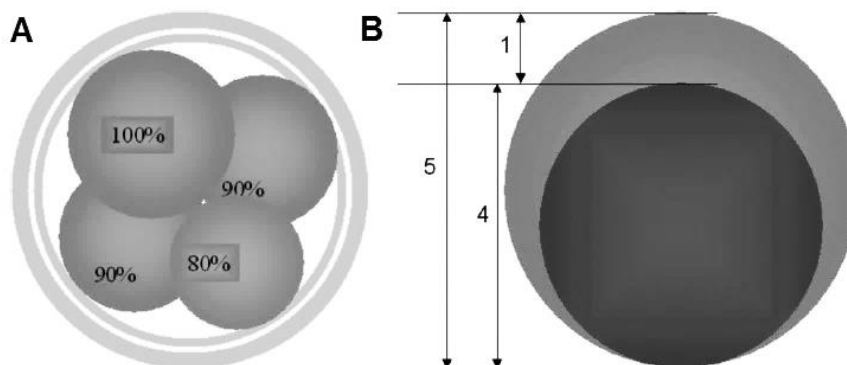
FIGURA 13: Cinética de división embrionaria esperada en FIV/ICSI usando evaluación estática.

Ovocito			
Cigoto	→	16-18 horas post-inseminación	→ 2 pronúcleos
Borrar pronúcleos	→	20-23 horas post-inseminación	→ ausencia de pronúcleos
División temprana	→	25-27 horas post-inseminación	→ 2 células iguales
día+2	→	44-47 horas post-inseminación	→ 4 células iguales
día+3	→	67-71 horas post-inseminación	→ 8 células iguales
día+4	→	94-98 horas post-inseminación	→ mórula
día+5	→	112-120 horas post-inseminación	→ blastocisto temprano
día+6	→	136-140 horas post-inseminación	→ blastocisto expandido

Simetría celular

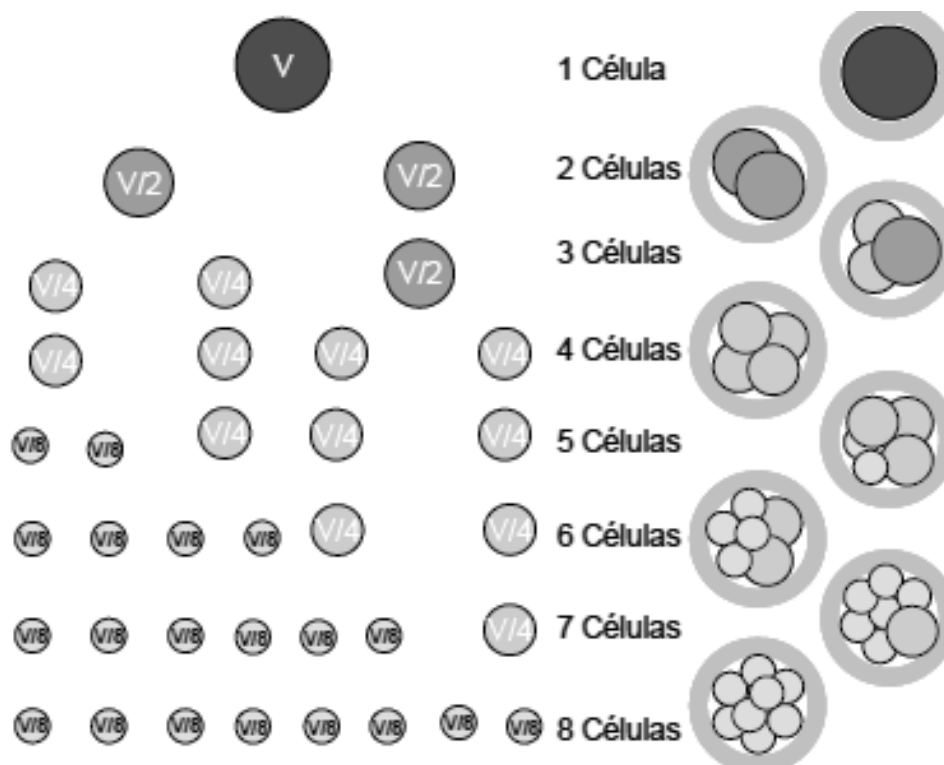
El tamaño de las blastómeras también es un factor útil para estudiar el potencial de desarrollo e implantación de los embriones (Hardarson et al., 2001). Una división desigual origina blastómeras de diferente tamaño con distinta distribución del material genético, lo cual repercute negativamente en el potencial de implantación (Steer et al., 1992; Van Blerkom et al., 2000; De Placido et al., 2002; Hnida et al., 2004). Según Hardarson et al. (2001), un preembrión de 4 células con división asimétrica es aquel en el que la diferencia entre el diámetro de las blastómeras mayor y menor supera el 20%. En la figura 14 se muestra un esquema de un embrión que presenta asimetría entre sus blastómeras.

FIGURA 14: Asimetría en la división celular embrionaria. La figura 14.A muestra un embrión en el que existe una diferencia de volumen del 20% entre sus blastómeras. En la figura 14.B se superponen 2 blastómeras con una diferencia de tamaño del 20%. (Cuadros et al., 2015).



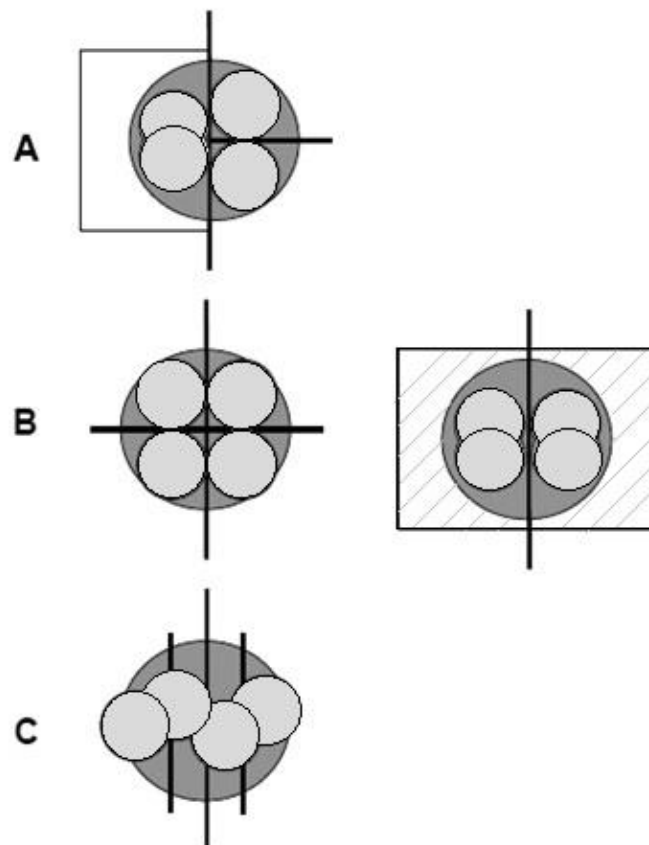
No obstante, a veces la asimetría entre blastómeras puede ser normal, pues se debe a una asincronía en la división celular. En la Figura 15 se muestra la asimetría embrionaria que corresponde con asincronía en la división celular para embriones en día+2 y día+3 (Roux et al., 1995; Holte et al., 2007).

FIGURA 15: Embriones con asimetría entre sus blastómeras por asincronía en la división celular.



Es necesario saber distinguir una blastómera de un resto citoplasmático. Johansson et al. (2003) determinó el diámetro normal de las blastómeras, resultando de 65-70µm en D+2 y algo menor en D+3 (55-60µm). El diámetro límite por debajo del cual definieron resto citoplasmático, ya que los “fragmentos” analizados no mostraron material genético, fue 45µ en D+2 y 40µ en D+3.

Otro aspecto de la división celular que se puede evaluar en el embrión en D+2 es el plano de división de las blastómeras. El embrión presentará una determinada disposición de las blastómeras en función de la orientación de los planos de división para pasar de 2 a 4 células (Figura 16).

FIGURA 16: Planos de división embrionaria.

Holte et al. (2007) encontraron mayores tasas de implantación cuando los planos de la segunda división son perpendiculares entre sí, como se muestra en la figura 16.A. En la figura 16.B y 16.C los planos de la segunda división celular son paralelos entre sí, y perpendiculares (16.B) o paralelos (16.C) al plano de la primera división celular.

Fragmentación citoplasmática

Es necesario evaluar el grado de fragmentación, el tamaño y la distribución de los fragmentos. Respecto al grado de fragmentación citoplasmática, se estima como un porcentaje, no repercutiendo en la tasa de implantación si es inferior al 20-25% (Ziebe et al., 1997; Van Royen et al., 1999; Alikani et al., 2000; Hardarson et al., 2001; Racowsky et al., 2003). En lo que respecta al tamaño y distribución de los fragmentos, son los de gran tamaño y los repartidos por todo el embrión los que mayor influencia negativa tienen sobre la tasa de implantación (Alikani and Cohen, 1995; Alikani et al., 2000).

Visualización de núcleos y grado de multinucleación

La presencia de dos o más núcleos o de micronúcleos en una célula tiene una correlación directa con el incremento en la tasa de anomalías cromosómicas embrionarias (Hardarson et al., 2001). La presencia de blastómeras multinucleadas implica bajo potencial de implantación y aumento en la tasa de aborto (Jackson et al., 1998; Pelinck et al., 1998; Van Royen et al., 2003; Meriano et al., 2004).

3.7. Sistemas de clasificación embrionaria

Numerosos sistemas de clasificación embrionaria han sido creados teniendo en cuenta diversos aspectos de los comentados anteriormente, con la finalidad de seleccionar para la transferencia los embriones con mayor potencial de implantación (Cummins et al., 1986; Hill et al., 1989; Steer et al., 1992; Giorgetti et al., 1995; Bras et al., 1996; Rijnders et al., 1998; Alikani et al., 1999; Antczak et al., 1999; Avery and Brinsden, 1999; Veeck et al., 1999; Arday et al., 2008; Cuadros et al., 2015). Sin embargo, aunque existe cierto acuerdo sobre qué es un buen preembrión y qué es un mal preembrión, la ausencia de criterios comunes afecta, tanto a los parámetros a evaluar, como a los puntos de corte entre categorías.

Con la intención de unificar criterios de evaluación embrionaria la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) ha desarrollado un sistema de gradación de la calidad embrionaria para las transferencias en día+2 y día+3 de desarrollo embrionario (Cuadros et al., 2015). En las figuras 17 y 18 se muestran los esquemas de esta clasificación morfológica para transferencias en D+2 y D+3 (basándose principalmente en número de células, simetría, porcentaje de fragmentación, multinucleación y presencia de vacuolas). Así, los embriones se clasifican en 4 categorías (A, B, C, D) que se relaciona directamente con su potencial de implantación.

FIGURA 17: Calidad embrionaria en D+2 (Cuadros et al., 2015).

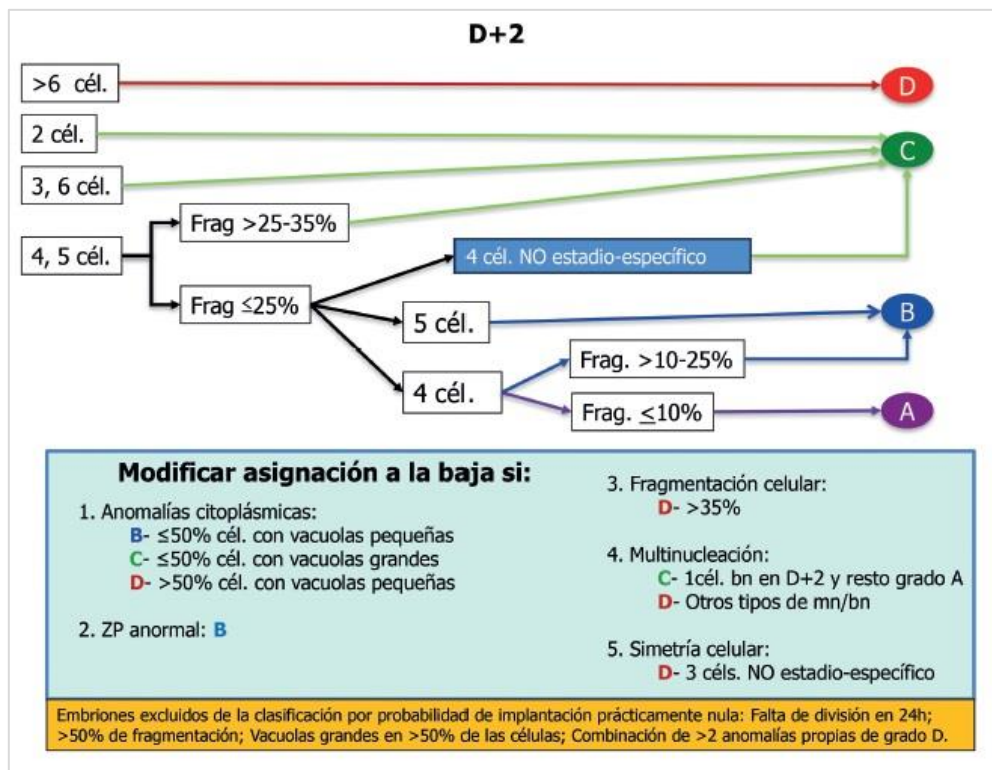
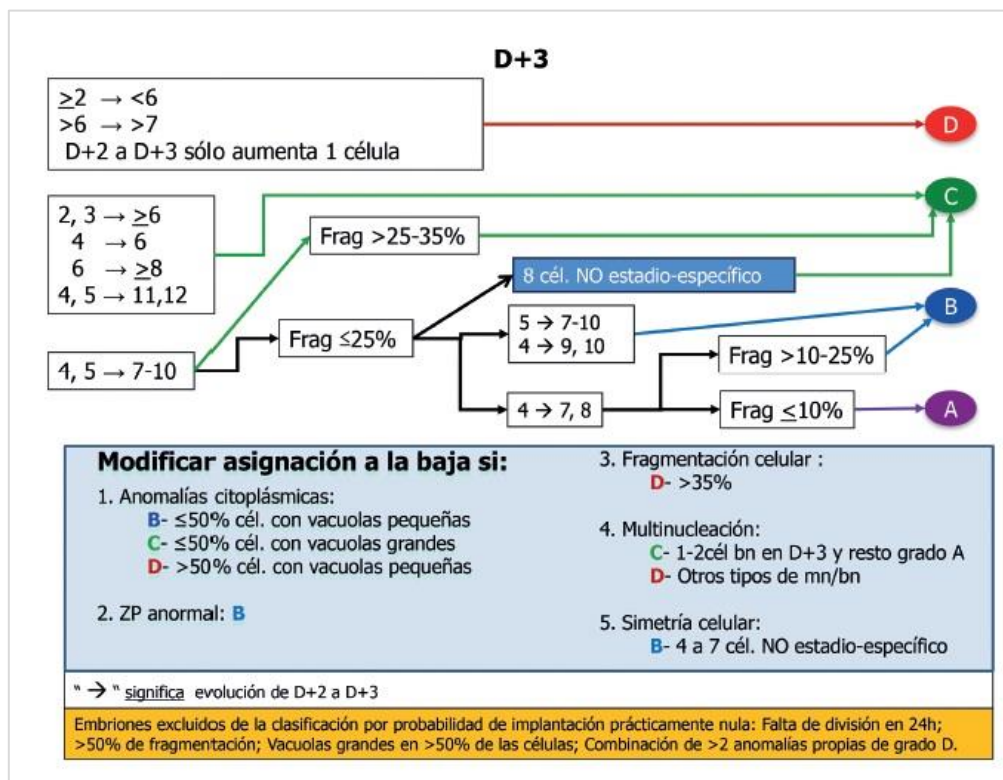


FIGURA 18: Calidad embrionaria en D+3 (Cuadros et al., 2015).



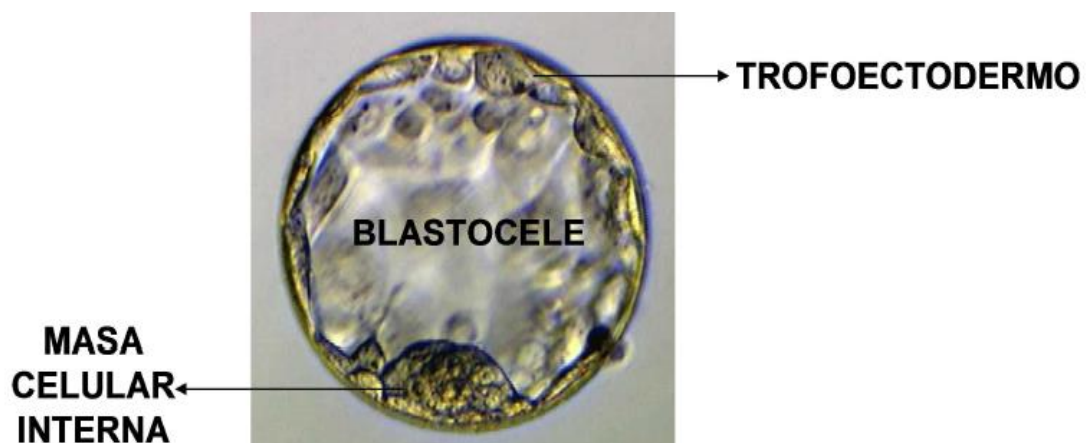
Evaluación de blastocistos

El cultivo secuencial de embriones hasta estadio de blastocisto en día+5 de desarrollo es una técnica no-invasiva de selección embrionaria que puede contribuir a una mejor selección.

El desarrollo embrionario se encuentra sujeto a los transcritos de origen materno hasta día+3, momento a partir del que se activa el genoma embrionario. Únicamente cultivando los embriones hasta estadio de blastocisto podremos identificar aquellos embriones con bloqueo de desarrollo en día+3.

El estado del embrión en día 5 ó 6 de desarrollo puede variar desde una etapa más retardada de compactación hasta una etapa más avanzada de blastocisto expandido. La calidad de este último se determina por la formación de una cavidad diferenciada rellena de líquido (blastocelo), las capas de células circulares externas que rodean a esta cavidad (trofoectodermo) y el conjunto de células internas que conforman las células de la masa interna (CMI) (Figura 19), cuyo tamaño ha sido considerado el factor más importante para una implantación exitosa (Richter et al., 2001).

FIGURA 19: Esquema del blastocisto expandido.



Al igual que para embriones en D+2 y D+3 de desarrollo, ASEBIR ha publicado un sistema de gradación de embriones en D+5 y D+6 (Figura 20 y 21).

FIGURA 20: Sistema de clasificación embrionaria en D+5 (Cuadros et al., 2015).

D+4	D+5			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Mórula compacta	Desde: "Iniciando la expansión" Hasta: "Eclosionando"	A	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		B	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		C	A	A
			B	B
C	C			
D	D			
D	A,B,C o D	D		
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)				C
Mórula no compacta	Mórula			D

FIGURA 21: Sistema de clasificación embrionaria en D+6 (Cuadros et al., 2015).

D+5	D+6			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)	Desde: "Iniciando la expansión" Hasta: "Eclosionando"	A	A	B
			B	C
			C	D
			D	D
		B	A	B
			B	C
			C	D
			D	D
		C	A	B
			B	C
C	D			
D	D			
D	A,B,C o D	D		
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)				D
Mórula no compacta	Mórula		Excluidos de la Clasificación	

Además, ASEBIR ha realizado una clasificación de los blastocistos en función de la calidad de la MCI y el trofoectodermo (Figura 22).

FIGURA 22: Sistema de clasificación embrionaria en función a la MCI y el trofoectodermo (Cuadros et al., 2015).

		TROFOECTODERMO			
		A	B	C	D
MASA CELULAR INTERNA	A				
	B				
	C				
	D				

3.8. Nuevas técnicas de selección embrionaria: Morfocinética

Se trata de una técnica no invasiva que minimiza la manipulación de los embriones durante su cultivo, y se basa en el uso de la tecnología time-lapse. La captura de imágenes se realiza en múltiples planos focales e intervalos de tiempo preprogramables. La suma de fotogramas de cada embrión genera una grabación que permite visualizar el desarrollo embrionario de manera continua, en forma de video. De este modo se registra cada uno de los eventos que suceden durante el desarrollo embrionario aportando certeza y objetividad al criterio, además de poder determinar con precisión el momento exacto en que éstos han ocurrido (Lemmen et al., 2008). De esta forma, la clasificación morfológica clásica se aúna con la cinética de división celular, en una nueva selección morfocinética.

3.8.1. Plataformas de morfocinética: Tecnología time-lapse

Existen diferentes plataformas de morfocinética embrionaria, entre las que podemos encontrar:

- Primo-vision™ (Cryoinnovations, Vitrolife): Presenta una cámara integrada diseñada para obtener imágenes automáticas en los puntos de tiempo definidos. Tiene capacidad de albergar hasta 16 embriones al mismo tiempo.
- Eeva (Merck Serono): Mediante imagen de campo oscuro captura las imágenes para analizar cuantitativamente la información del potencial de desarrollo del embrión de D+2, y seleccionar directamente los embriones de mejor pronóstico, basándose en los trabajos de Wong (Wong et al., 2010).
- Embryoscope™ (Unisense Fertilitech, Dinamarca): Designado para uso clínico. Tiene capacidad para adquirir datos de hasta 72 embriones al mismo tiempo, y utiliza un software de análisis de imagen en el que todos los eventos embrionarios considerados se pueden interpretar fácilmente.
- Geri® (Genea Biomedx): Es un incubador que tiene incorporadas seis cámaras individuales de alta resolución con enfoque modular. Puede albergar hasta 96 embriones.
- Miri® (Esco Medical): Se trata de un incubador con seis cámaras incorporadas. Los pequeños volúmenes de la cámara y la regulación de calor directo se traducen a una recuperación rápida de la temperatura y del gas.

3.8.2. Ventajas y limitaciones de la tecnología time-lapse

La clasificación morfológica estática sigue siendo el método básico para la evaluación embrionaria. Los parámetros más utilizados son: número de células, simetría, multinucleación y fragmentación, como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, este tipo de clasificación es invariable, ya que corresponde con momentos puntuales del desarrollo embrionario, lo que conlleva una mayor subjetividad, ya que depende del evaluador en gran medida. Con la morfocinética, la cantidad de información que se obtiene es

mucho mayor y más objetiva, ya que se pueden cuantificar todos los eventos celulares como la formación y desaparición de los PN, tiempo exacto de cada división celular y duración de las diferentes citocinesis (Payne et al., 1997; Wong et al., 2010; Meseguer et al., 2011; Aparicio et al., 2013; Aguilar et al., 2014).

Entre las ventajas del time-lapse embrionario podemos encontrar:

- Capacidad de mantener las condiciones de cultivo estables, ya que no hay que sacar a los embriones del incubador para poder evaluarlos, evitando de tal manera, las variaciones de temperatura y pH.
- Reducción de la manipulación de los embriones.
- Optimización del tiempo y recursos del laboratorio.

En cuanto a las limitaciones podemos definir dos tipos, las técnicas y las metodológicas.

- Limitaciones técnicas: Durante el cultivo embrionario, los embriones pueden moverse. Además se pueden generar burbujas de aire, debido a los medios de cultivo utilizados, que hacen que se pierda la imagen durante algún tiempo si se sitúan encima del embrión.
- Limitaciones metodológicas: En cuanto a los tiempos de división, no son absolutos, sino que oscilan en un rango. Esto es debido a que el tiempo de la microinyección, denominado tiempo cero (t_0), no es el momento exacto en el que se microinyecta cada ovocito, sino la media de tiempo en el que se ha realizado la ICSI. Para evitar esta limitación, autores como Liu et al. (2015) han considerado denominar t_0 como el momento de la desaparición de los PN. Además existen muchos factores (medio de cultivo, estimulación ovárica, etiología de la esterilidad, edad materna, etc.) que pueden hacer variar la cinética embrionaria, lo que dificulta su interpretación (Ciray et al., 2012; Kirkegaard et al., 2013). Existen estudios que indican que las variables cinéticas que más se influyen por el medio de cultivo empleado son los tiempos de división celular (parámetros morfocinéticos directos), y no los intervalos de tiempo que duran estas divisiones celulares (parámetros morfocinéticos indirectos) (Basile et al., 2013).

3.8.3. Parámetros cinéticos embrionarios

Una de las estrategias más desarrolladas en el establecimiento de nuevos marcadores de selección, es la observación de los tiempos de división embrionaria. Dado su facilidad de aplicación y su mayor objetividad, gran parte de la investigación reciente se centra en explorar la utilidad de parámetros morfocinéticos como marcadores de competencia embrionaria (Basile et al., 2013; Meseguer et al., 2012).

Los parámetros cinéticos hacen que la selección embrionaria sea mucho más fiable (Dal Canto et al., 2012), ya que si comparamos dos embriones de 4 células de un mismo ciclo, pueden parecer similares en una observación puntual, pero en una evaluación dinámica pueden ser muy diferentes, dependiendo de cómo y cuándo han sido sus divisiones celulares.

En la figura 23 se muestra un resumen de los eventos cinéticos analizados por Kaser y Racowsky (2014). Se trata de un esquema del desarrollo embrionario con los intervalos de tiempo de las variables morfocinéticas predictoras de la llegada a blastocisto e implantación en 9 de los 13 estudios que evalúan durante su meta-análisis.

Los parámetros cinéticos identificados por time-lapse se dividen en parámetros morfocinéticos directos (Tabla 3) e indirectos (Tabla 4).

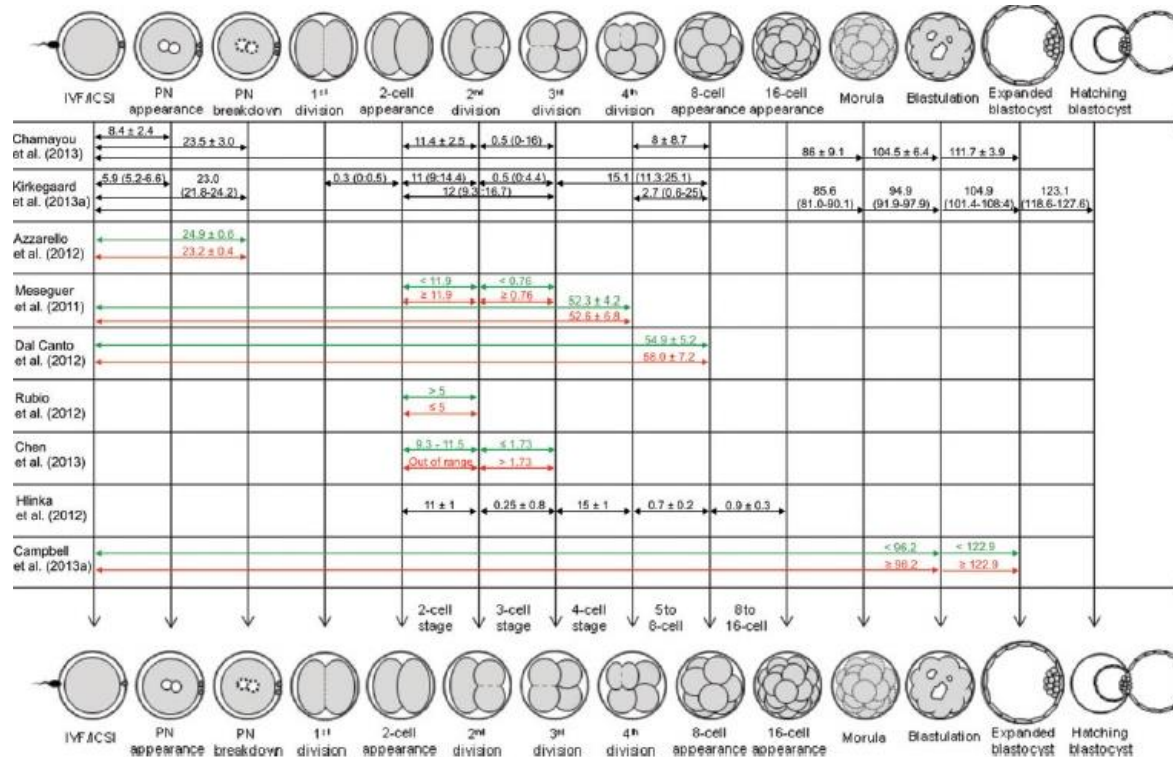
a) Parámetros morfocinéticos directos:

Payne et al., (1997) informaron que los embriones de buena calidad parecían proceder de ovocitos con un tiempo similar desde la ICSI hasta la desaparición de pronúcleos (PN) y que, además, tendían a manifestar ondas en el citoplasma más prolongadas. Más tarde, diferentes estudios evaluaron la aparición, singamia y desaparición de los PN (Chamayou et al., 2013; Kirkegaard et al., 2013) pero no encontraron diferencias entre los embriones que implantan y los que no. Sin embargo, Azzarello et al., (2012) mostraron que el tiempo de desaparición de los PN es significativamente mayor en aquellos embriones en los que se obtiene un recién nacido (24,9 vs 23,3 h) y

que la desaparición de los mismos antes de 20,45 h implica no implantación o aborto (Azzarello et al., 2012). Otros autores han encontrado que la capacidad de implantación disminuye en aquellos cigotos en los que los PN desaparecen antes de 22,2 h o después de 25,9 h tras la ICSI, así como cuando ocurre una rápida extrusión del 2º corpúsculo polar (CP) (1-3,2h) (Aguilar et al., 2014).

Gracias a la tecnología time-lapse se ha podido correlacionar la división temprana (DT) de forma positiva, definiéndose ésta como la primera división mitótica que se da entre las 25-27 h post microinyección. Cuando un embrión presenta DT está relacionado con un mayor número de células en D+2 (4 células o más), así como con mejores tasas de implantación si la aparición de los núcleos del embrión de 2 células es sincrónica (Lemmen et al., 2008). Al igual que la desaparición temprana de PN, parece ser que cuando el cigoto se divide a 2 células antes de 24,3 h, presenta menores tasas de implantación (Meseguer et al., 2011).

FIGURA 23: Parámetros cinéticos identificados por time-lapse como predictores de desarrollo embrionario e implantación según Kaser y Racowsky (2014).



Por otro lado, con los sistemas time-lapse se abre un nuevo método de evaluación de los embriones, ya que se puede medir en que momento ocurren las distintas divisiones celulares, así como la duración de cada ciclo celular.

Algunos estudios han analizado los tiempos de división tempranos, encontrando que un desarrollo rápido favorece el desarrollo óptimo a D+5 (Hashimoto et al, 2012; Chamayou et al., 2013; Herrero et al., 2013; Desai et al., 2014). Todo indica que las divisiones lentas en estadios tempranos compromete el desarrollo hasta D+3, mientras que tiempos demasiado rápidos a 8 células favorecen el bloqueo embrionario posterior. Los autores concluyen que parámetros tempranos (t_2 , t_3 , t_4) están relacionados con el desarrollo hasta D+3, y se necesitan además t_5 y t_8 para predecir la formación de blastocisto (Herrero et al., 2013). Otros autores concluyen que embriones que se bloquean en estadios avanzados se dividen hasta 6 células con una cinética similar a embriones que se desarrollan a blastocisto, pero se produce un retraso significativo en t_8 (Dal Canto et al., 2012).

TABLA 3. Parámetros morfocinéticos directos. Cada tiempo define el primer intervalo de tiempo en el que el evento esperado es observado (Ciray et al., 2014).

TIEMPO (horas)	DEFINICIÓN DE EVENTOS
tPB2	Extrusión del 2º corpúsculo polar.
tPNa	Aparición de pronúcleos.
tPNf	Desaparición de pronúcleos.
it2	Inicio de t_2 .
t_2	Tiempo en el que embrión presenta 2 células.
t_3	Tiempo en el que embrión presenta 3 células.
t_4	Tiempo en el que embrión presenta 4 células.
t_5	Tiempo en el que embrión presenta 5 células.
t_6	Tiempo en el que embrión presenta 6 células.
t_7	Tiempo en el que embrión presenta 7 células.
t_8	Tiempo en el que embrión presenta 8 células.

b) Parámetros morfocinéticos indirectos:

Otros parámetros dinámicos que se han estudiado son los tiempos de duración de cada división mitótica, especialmente el intervalo de 2 a 3 células, 3 a 4 células, 4 a 5 células y 5 a 8 células. A lo largo de la división embrionaria temprana, se pueden definir dos tipos de ciclos: el que corresponde a un ciclo celular de división, como $ECC2=t_4-t_2$ y $ECC3=t_8-t_4$; y los ciclos que reflejan la sincronía entre células, como transición de 2 a 4 células ($s_2= t_4-t_3$) o de 4 a 8 ($s_3=t_8-t_5$) (Ciray et al., 2014) (Tabla 4).

TABLA 4. Parámetros morfocinéticos indirectos (Ciray et al., 2014).

TIEMPO (horas)	CÁLCULO DEL EVENTO	DEFINICIÓN DE EVENTOS
VP	$t_{PNf} - t_{PNa}$	Duración de los PN
ECC1	$t_2 - t_{PB2}$	Duración del primer ciclo celular
ECC2	$t_4 - t_2$	Duración del segundo ciclo celular
- ECC2a	$t_3 - t_2$	
- ECC2b	$t_4 - t_2$	
ECC3	$t_8 - t_4$	Duración del tercer ciclo celular
- ECC3a	$t_5 - t_4$	
- ECC3b	$t_6 - t_4$	
- ECC3c	$t_7 - t_4$	
- ECC3d	$t_8 - t_4$	
S2	$t_4 - t_3$	Sincronización de divisiones celulares
S3	$t_8 - t_5$	Sincronización del patrón de división

La duración de ECC2 es ligeramente menor (11,6h) que la de ECC3 (13,6h). Sin embargo, s_2 (t_4-t_3) es mucho más corta (0,75h) que s_3 (t_8-t_5) (7,02h) (Herrero et al., 2013). Los autores atribuyen este hecho a las posibles diferencias acumuladas en la duración de los ciclos celulares entre embriones, o al resultado de las diferencias en términos de competencia de gametos que pueden influir en los mecanismos de control del ciclo celular y en los genes responsables de la citocinesis (Wong et al., 2010).

3.8.4. Morfocinética y viabilidad embrionaria

Actualmente, se han realizado varios estudios y revisiones (Meseguer et al., 2011; Rubio et al., 2012; Hlinka et al., 2012; Azzarello et al., 2012; Chen et al., 2013; Campbell et al., 2013; Kaser and Racowsky, 2014) sobre qué parámetros morfocinéticos se relacionan con el desarrollo hasta blastocisto, la tasa de implantación o gestación clínica. Todos han presentado resultados dispares pues los parámetros morfocinéticos incluidos en los algoritmos diagnósticos son muy diferentes entre los distintos autores, ya sea en predicción de formación de blastocistos (Wong et al., 2010; Cruz et al., 2012; Kirkegaard et al., 2013; Milewski et al., 2015) como en tasa de implantación (Dal Canto et al., 2012; Hashimoto et al., 2012; Chamayou et al., 2013; Desai et al., 2014). Además, otros autores como Kirkegaard et al. (2013) o Desai et al. (2014) no encuentran relación entre morfocinética embrionaria y resultados reproductivos.

3.9. Vitrificación embrionaria

Actualmente, la crioconservación embrionaria ha mejorado notablemente sus resultados, debido a que la vitrificación proporciona mejores tasas de supervivencia embrionaria y gestación que la congelación lenta tradicional (Loutradi et al., 2008). Además, los datos que se desprenden de diferentes estudios sobre el huso meiótico de ovocitos descarioconservados con diferentes protocolos de crioconservación sugieren que la vitrificación es el método menos perjudicial (Larman et al., 2007; Cobo et al., 2008; Martínez-Burgos et al., 2011).

La principal ventaja de la vitrificación es la ausencia de formación de cristales de hielo. Este método se basa en la solidificación de los solutos a baja temperatura, mediante el aumento extremo de la viscosidad durante el enfriamiento rápido. Los protocolos lentos de congelación se basan en disminuciones graduales de temperatura ($-0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) para que exista una formación de cristales de hielo fuera de la célula. Sin embargo, esto sólo reduce la cantidad de agua del interior de la célula de un 70% a un 30%, con lo que aún se forman cristales en su interior.

En cambio, la vitrificación depende de una tasa rápida de congelación 23.000°C/minuto, y una alta viscosidad de los crioprotectores, con lo que evita la formación de cristales en el interior de la célula (Al-Hasani et al., 2007; Cobo et al., 2007). La alta osmolaridad del medio de vitrificación deshidrata rápidamente la célula y su inmersión en el nitrógeno líquido solidifica la célula antes de que el agua intracelular restante tenga tiempo de formar cristales de hielo perjudiciales. El resultado es que la célula solidifica adquiriendo una consistencia similar al vidrio.

Dos aspectos importantes de esta técnica son los elevados niveles de toxicidad del crioprotector a temperatura ambiente (Shaw et al., 1992) y su habilidad para vitrificarse y desvitrificarse lo suficientemente rápido para evitar la formación de cristales (Vajta et al., 1998). Ya se han comunicado estudios de seguimiento de niños nacidos de embriones vitrificados por diversos métodos (Liu et al., 2013), demostrando la seguridad de esta técnica.

4. Efectos adversos relacionados con la esterilidad y las TRA

El desarrollo de las TRA ha sido fundamental para incrementar las posibilidades de embarazo de las parejas estériles. Gracias a la eficacia de las TRA se han resuelto numerosos casos de esterilidad, sin embargo, no hay que olvidar que estas técnicas no están exentas de posibles riesgos y complicaciones. Estos hacen necesario la creación de protocolos estandarizados que garanticen la seguridad de los pacientes sometidos a TRA y los recién nacidos, evitando en lo posible los efectos adversos asociados. Actualmente, las condiciones bajo las cuales se realizan las técnicas de reproducción asistida y los controles que se efectúan han reducido de forma sustancial las complicaciones, y puede decirse que las más severas son muy poco frecuentes.

4.1. Efectos adversos generales asociados con procedimientos invasivos

En la fecundación in vitro, los ovocitos son extraídos del ovario mediante una punción realizada a través de la vagina con la ayuda de un ecógrafo. Es un procedimiento seguro, con una frecuencia de complicaciones muy baja, sin embargo, se pueden producir infecciones o hemorragias debido a los múltiples pinchazos en la bóveda vaginal, pudiendo dañar o desgarrar la mucosa de la vagina, los ovarios u órganos de la cavidad abdominal (vejiga, intestino, uréteres o torsión del ovario), dando lugar a sangrados internos y externos (Mashiach et al., 2013). Normalmente, la hemorragia aparece en <1% de los casos de TRA, ocasionando sangrados intra o extraperitonealmente, que suelen ocurrir entre 2-6 horas tras la punción folicular. A menos que se resuelvan por sí solos, ambas formas de sangrado pueden requerir exploración y corrección quirúrgica (de Ziegler et al., 2013; Wdowiak et al., 2016).

4.2. Efectos adversos específicos de los tratamientos utilizados en reproducción asistida

El principal riesgo es el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), este síndrome es una condición iatrógena que consiste en una respuesta exagerada al tratamiento de estimulación ovárica o de inducción de la ovulación. Se distingue por el aumento en el volumen ovárico, elevación considerable de estradiol en sangre, acumulación del volumen extravascular y, en consecuencia, disminución del volumen intravascular, alteraciones electrolíticas, insuficiencia renal y fenómenos tromboembólicos que pueden poner en riesgo la vida de la paciente (Gaona Arreola et al., 2010; de Ziegler et al., 2013). Otras posibles consecuencias graves de la hiperestimulación severa, son la torsión o rotura de los ovarios hiperestimulados, que pueden hacer necesaria una intervención quirúrgica en la que, en ocasiones, no se logra preservar los ovarios. Las hiperestimulaciones ováricas son más frecuentes cuando se produce un embarazo, ya que éste potencia el efecto de los fármacos administrados. En casos de embarazo que cursen con hiperestimulación ovárica grave, la probabilidad de que se produzca un aborto

aumenta sensiblemente. Los estrictos protocolos de control que se aplican a las pacientes minimizan los riesgos de hiperestimulación severa, para lo cual resulta imprescindible cancelar el ciclo o posponer la transferencia embrionaria o desencadenar la ovulación con agonistas si el ciclo se ha frenado con antagonistas.

Una de las complicaciones más importantes asociadas a las TRA es la gestación múltiple, dada su elevada frecuencia y las complicaciones asociadas para los recién nacidos. Es necesario adoptar medidas para reducir su incidencia. Según datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), en los últimos 30 años, la tasa de partos múltiples ha ido en aumento, siendo las TRA un factor decisivo (Tur et al., 2006). Actualmente, la transferencia de dos embriones lleva una tasa de embarazo gemelar del 30%-50%. Optar por la transferencia electiva de un único embrión (eSET) cuando todos los parámetros son altamente favorables minimiza las tasas de embarazo gemelar, aunque disminuye la probabilidad de gestación (Grady et al., 2012). El conocimiento de que factores favorecen el éxito del eSET permite ofrecer a la paciente la transferencia más adecuada, considerando su edad y los embriones de los que dispone, con el doble objetivo de ofrecer las mayores probabilidades de éxito y de reducir al máximo el riesgo de gestación múltiple. La reflexión sobre las graves consecuencias maternas y fetales del embarazo múltiple (incremento de la patología del embarazo, prematuridad, bajo peso al nacimiento, complicaciones neonatales severas) y la constante mejora de la técnica de cultivo y crioconservación embrionaria están favoreciendo que médicos y pacientes opten cada vez más por el eSET. Existen estudios que demuestran que en casos de buen pronóstico, la tasa acumulada de embarazo en transferencia de un embrión en fresco más la transferencia posterior de un embrión crioconservado es la misma que si se transfieren dos embriones juntos a la vez, pero con una menor probabilidad de embarazo múltiple en la primera opción (López-Regalado et al., 2014).

4.3. Efectos adversos asociados a las características particulares de la mujer sometida a técnicas de reproducción asistida

Los efectos adversos asociados a este tipo de pacientes son aquellos ocasionados por los riesgos o predisposición personal que cada mujer pueda tener al someterse a TRA. Estas condiciones deben de ser identificadas para mitigar cualquier riesgo previamente.

Existen mujeres que están predispuestas a sufrir eventos adversos vasculares. Se pueden identificar gracias a los antecedentes personales y/o familiares con eventos trombóticos, y requieren profilaxis con heparina de bajo peso molecular (HBPM) durante la TRA. El estudio sistemático de las mutaciones relacionadas con la hemostasia no está justificada en las mujeres que se van a someter a TRA. Pero cuando existe un SHO, la presencia de estas mutaciones aumenta hasta en 100 veces el riesgo de sufrir un evento trombótico (de Ziegler et al., 2013).

Por otro lado, existen mujeres estériles con anomalías cromosómicas o genéticas que aumentan las posibilidades de complicaciones al someterse a TRA (Milà and Mallolas, 2001), como por ejemplo, el síndrome de Turner, que puede exponer a la paciente a una ruptura de la aorta durante el embarazo (Doğer et al., 2015).

Por último, las malformaciones uterinas también ocasionan un riesgo importante. Los miomas uterinos o las cicatrices anteriores, pueden suponer un mayor riesgo de complicaciones obstétricas, por ello, se debe valorar adecuadamente las alteraciones uterinas antes de someterse a TRA (de Ziegler et al., 2013).

4.4. Errores médicos asociados a las TRA

El error médico se define, generalmente, como un efecto adverso prevenible de la atención médica, independientemente si es perjudicial o no para un paciente (de Ziegler et al., 2013). La mayor parte de los factores que afectan a la seguridad en TRA suelen implicar errores humanos. Un equipo

puede romperse, o un lote de medios de cultivo puede dañarse, incluso habiendo pasado todos los controles de calidad (Scott Jr and De Ziegler, 2013).

Los errores no pueden ser ignorados y deben ser tratados. Existen tres modos principales de notificar errores: automático, obligatorio y voluntario. Los tres métodos aplicados a las TRA deben de ser confidenciales y no punitivos. La notificación automática de errores ha sido decisiva para mejorar la seguridad ya que contrarresta la tendencia humana a ignorar o a culpar, independientemente del resultado. Es importante saber qué es lo que pasó exactamente, para que se pueda remediar de forma individual o colectiva. La información obtenida mediante la notificación automática de errores es compartida, de forma confidencial, para que todos puedan aprender de los errores. Este tipo de información automática tiene como objetivo proponer mejoras útiles en lugar de sanciones. Por ejemplo, los programas que tienen una inusual tasa de gestación de alto orden, han de ser identificados de tal manera que se puedan tomar medidas que permitan mejorar la seguridad de las pacientes (de Ziegler et al., 2013).

Por otro lado, la notificación obligatoria ha de ser informada y analizada, aunque no sea debida a errores médicos. Por ejemplo, cuando en TRA no se recuperan ovocitos tras la punción ovárica o tras un fallo de fecundación. Ambos eventos pueden no ser debido a un error médico, sino más bien a las características de la propia paciente. Sin embargo, cuando alguna de las dos ocurre, se deben revisar los procesos clínicos y de laboratorio (de Ziegler et al., 2013).

Por último, las notificaciones voluntarias son cruciales. Una cultura que favorece las notificaciones permite el descubrimiento previo de errores médicos y efectos adversos, permitiendo rediseñar las acciones que se realizan cuando es necesario (de Ziegler et al., 2013).

4.5. Aspectos psicológicos

El estrés está íntimamente relacionado con la experiencia de la esterilidad e infertilidad, ya que se manifiesta como resultado de la dificultad para concebir un hijo, de no saber cuál es la causa, de no saber si se va a lograr una gestación algún día, y de la presión que se siente desde el mundo exterior.

Los trastornos psicológicos producidos por la incertidumbre y la imposibilidad de prever si finalmente se logrará una gestación en las parejas, suele asociarse a fuertes estados de ansiedad, con una sintomatología muy característica: dificultad para respirar, cansancio, mareos, fuertes dolores de cabeza, etc. Por otro lado, la depresión es muy frecuente en pacientes con problemas reproductivos. El propio concepto de esterilidad resulta en muchas ocasiones intolerable para quienes la padecen. La prevalencia de depresión en pacientes con problemas reproductivos es equiparable a aquellos pacientes con diagnóstico de cáncer, dolor crónico o enfermedades cardiovasculares. Diversos autores relacionaron hace tiempo estas alteraciones psicológicas con malos resultados reproductivos (Klonoff-Cohen et al., 2001; Gallinelli et al., 2001).

4.6. Seguridad en las TRA

Uno de los grandes retos en medicina reproductiva es desarrollar técnicas de laboratorio y protocolos de tratamiento que incrementen las posibilidades de embarazo, disminuyendo al máximo las complicaciones en las mujeres y recién nacidos tras TRA.

El avance de las TRA ha llevado a realizar estudios para demostrar la seguridad y la eficacia de estas técnicas en los niños nacidos a causa de éstas. Son muchos los trabajos que alertan de una mayor tasa de complicaciones en embarazos de TRA que en los espontáneos. Recientemente han aparecido varios estudios que comparando embarazos únicos de FVI/ICSI con embarazos únicos espontáneos, observan una mayor probabilidad de complicaciones obstétricas y de anomalías en recién nacidos por TRA (Pandey et al., 2012; Qin

et al., 2016a; Qin et al., 2017). La enfermedad inherente a las parejas que se han realizado TRA puede llevar a complicaciones obstétricas, que están relacionadas más con la esterilidad que con la técnica utilizada (Sebastiani et al., 2009). Varias publicaciones han demostrado que la infertilidad en si está asociada a una disminución de peso de los recién nacidos, incluso cuando los embarazos son espontáneos (Williams et al., 1991; Jackson et al., 2004). Si el origen de estas complicaciones son debidas a la patología subyacente de los propios pacientes estériles, a la edad materna o a la manipulación de los gametos todavía no está claro (Allen et al., 2006; Vulleimoz et al., 2012; Pandey et al., 2012; Hansen et al., 2013).

Estas evidencias han llevado a que instituciones científicas como la Sociedad Canadiense de Obstetricia y Ginecología afirmen que “hay evidencia creciente de que la infertilidad o subfertilidad es un factor de riesgo independiente para las complicaciones perinatales. El riesgo relativo de tener un recién nacido afecto de una alteración epigenética se incrementa tras TRA, pero el riesgo real es muy bajo de 1 en 5000. El embarazo múltiple es el más poderoso factor predictivo de resultados maternos, obstétricos y perinatales adversos. Entre los embarazos únicos, la tecnología de reproducción asistida se asocia con un mayor riesgo de parto prematuro y de bajo peso al nacer. Las parejas que consideran las TRA deben ser informadas de que en los embarazos únicos la ICSI no parece conferir un mayor riesgo perinatal o materno sobre la FIV estándar. Las TRA deben ir precedidas por una información sobre el ligero incremento en el riesgo de anomalías estructurales congénitas. Los embarazos concebidos por ICSI pueden tener mayor riesgo de alteraciones cromosómicas” (Okun et al., 2014).

4.6.1. Inseminación artificial

En cuanto a los resultados obstétricos y neonatales de los recién nacidos tras IA, son pocos los estudios realizados. En 2006, Allen et al. realizaron una revisión sistemática sobre malformaciones congénitas en relación a la IA y no encontraron un aumento del riesgo. Pero tras ajustar por edad materna, hallaron que la propia estimulación ovárica estaba relacionada

con el riesgo de bajo peso al nacer y el parto pretérmino entre las gestaciones únicas. Sin embargo, un estudio realizado por Ricciarelli et al., (2013) en los recién nacidos españoles tras IA indicó que las malformaciones congénitas observadas en embarazos únicos eran del 0,4% mientras que en gestaciones gemelares del 1,1% sin alcanzar la significación estadística al comparar las diferentes TRA.

Un meta-análisis realizado por Pinborg et al., (2013) analizó los resultados perinatales de embarazos únicos entre las diferentes TRA y los comparó con los embarazos únicos de gestaciones espontáneas. Los resultados obtenidos en cuanto a la IA, indicaron que con un nivel moderado de evidencia, existe un mayor riesgo de parto pretérmino en embarazos únicos procedentes de IA en comparación con los embarazos únicos de la población fértil.

Un estudio realizado por Malchau et al., 2014 analiza los resultados perinatales de gestaciones únicas tras IA en comparación con los recién nacidos de gestaciones únicas espontáneas. Los resultados indicaron que los recién nacidos tras IA tuvieron mayor riesgo de parto pretérmino, bajo peso al nacer y menor edad gestacional. Concluyen que los resultados obtenidos son menos favorables en el grupo de IA y pueden estar relacionados con la esterilidad *per se*. Además encuentran un ligero aumento de los trastornos hipertensivos y placenta previa durante el embarazo, que pueden afectar en el resultado perinatal de los recién nacidos.

Entre los autores que describen las malformaciones de los recién nacidos de IA se encuentra el trabajo realizado por Bendsorp et al., (2015), el cual notifica 5 casos de malformación en el grupo de IA: un caso de foramen oval (Q.21), un caso de sordera congénita (H.90), un caso de hernia umbilical (K.42), un caso de síndrome de Down (Q.90) y un caso de atresia esofágica (Q.39) que corresponde con una tasa de malformaciones del 4%.

4.6.2. FIV/ICSI

La mayoría de los embarazos tras FIV/ICSI terminan con el nacimiento de niños sanos, pero existen algunos autores que han puesto de manifiesto una cierta preocupación por el aumento de complicaciones obstétricas, perinatales y malformaciones congénitas asociadas a los tratamientos (Bonduelle et al., 2002; Wen et al., 2012; Pinborg et al., 2013; Ricciarelli et al., 2013; Henningsen et al., 2014; Henningsen et al., 2015; Levi et al., 2016).

Las principales preocupaciones sobre los problemas de salud en los recién nacidos como resultado de estos tratamientos se han atribuido a las gestaciones múltiples y la mayor incidencia de parto prematuro y bajo peso al nacer asociada a este tipo de gestaciones. Sin embargo, recientes estudios también han informado de un aumento del riesgo parto prematuro y bajo peso al nacer en embarazos únicos tras FIV/ICSI comparados con embarazos concebidos espontáneamente (Sunkara et al., 2017). El seguimiento a largo plazo de los niños de FIV/ICSI es necesario para aportar luz sobre aspectos como el mayor riesgo de neoplasias o anomalías cromosómicas y para corroborar la falta de efectos adversos en el neurodesarrollo o cardiovasculares (Porta Ribera et al, 2009). Los estudios existentes hasta ahora (Bonduelle et al., 2002; Wen et al., 2012; Pinborg et al., 2013; Ricciarelli et al., 2013; Henningsen et al., 2014; Henningsen et al., 2015; Levi et al., 2016) aportan datos tranquilizadores pero no parecen suficientes. La complejidad y las dificultades que supone realizar controles periódicos a cohortes de niños en su mayoría sanos complican el diseño de estudios de seguimiento.

Ciertas revisiones sistemáticas y meta-análisis realizados han demostrado que las gestaciones únicas obtenidas mediante FIV/ICSI tienen un mayor riesgo de complicaciones perinatales (Palomba et al., 2016). En 2004, una revisión sistemática encontró un mayor riesgo para el parto pretérmino (<32 semanas de gestación) en gestaciones únicas tras FIV/ICSI, presentando además peores resultados obstétricos, con un aumento de la mortalidad perinatal, bajo peso al nacer y menores para la edad gestacional (Helmerhorst et al., 2004). En 2012, un meta-análisis concluyó que los embarazos únicos de

FIV/ICSI están asociados con mayor riesgo de hemorragia anteparto, diabetes gestacional, preeclampsia, cesárea, parto pretérmino, bajo peso al nacer, edad gestacional menor y mortalidad perinatal (Pandey et al., 2012).

Recientemente Qin et al., (2016b) realizó un meta-análisis que incluyó 50 estudios de cohortes, sobre las complicaciones y riesgos perinatales asociados con los embarazos únicos obtenidos mediante FIV/ICSI. Comparó un total de 161.370 embarazos únicos procedentes de FIV/ICSI con 2.280.241 embarazos únicos procedentes de gestaciones espontáneas. El meta-análisis reveló que los embarazos únicos tras FIV/ICSI sufren un riesgo significativamente mayor de placenta previa, desprendimiento placentario, hemorragia anteparto y hemorragia postparto. Cabe destacar que el parto pretérmino y el muy bajo peso al nacer fue dos veces mayor en las parejas sometidas a FIV/ICSI en comparación con las que obtuvieron gestaciones únicas espontáneas.

En cuanto a los efectos adversos de los embarazos gemelares tras FIV/ICSI, debemos distinguir entre embarazos monocigóticos (MZT del inglés *monozygotic twinning*) y dicigóticos (DZT del inglés *dizygotic twin*). Los tratamientos de FIV/ICSI incrementan la incidencia de MZT de tres a veinte veces, ya que mediante concepción natural alcanza un valor de 0,42% mientras que si son concebidos mediante FIV esta cifra oscila entre 1,2% y 8,9% (Chang et al., 2009). Knopman et al. (2014) realizaron un estudio sobre los resultados obstétricos y perinatales asociados con los MZT tras FIV/ICSI. Analizaron 6223 gestaciones, con una incidencia del 2,1% de MZT y al evaluar los factores asociados con la placentación, encontraron que la TE en D+3 estaba relacionada con mayor porcentaje de DZT mientras que la TE en estadio de blastocisto se relacionaba con mayor porcentaje de MZT. Encontraron resultados obstétricos y perinatales significativamente peores en el caso de MZT concretamente para la edad gestacional, así como peores resultados en cuanto a bajo peso al nacer y parto pretérmino, en comparación con DZT.

Por otro lado, Bendsorp et al. (2016) comparó los resultados obstétricos y perinatales de DZT procedentes de FIV/ICSI con los DZT tras concepción natural y concluyeron que el riesgo obstétrico en ambos grupos es bastante similar. Además no encontraron diferencias en cuanto a los resultados perinatales entre ambos grupos. Sin embargo, existe controversia sobre estos resultados, ya que algunos estudios obtienen resultados perinatales similares al de Bendsorp et al. (2016) (Pinborg et al., 2004; Weghofer et al., 2009; Vasario et al., 2010; Suzuki and Miyake, 2010) mientras que otros informan de un mayor riesgo perinatal (Adler-Levy et al., 2007; Hansen et al., 2009; Daskalakis et al., 2009; Moini et al., 2012), incluso otros estudios encuentran mejores resultados perinatales tras TRA (Boulet et al., 2008; Wen et al., 2010).

En cuanto a estas diferencias, cabe destacar que las principales razones ante estos resultados incongruentes es que no se tiene claro si la monocorionicidad fue considerada como un factor de riesgo para definir los efectos adversos (Qin et al., 2016b). El meta-análisis realizado por Qin et al. (2016b) examinaba las complicaciones obstétricas y neonatales de DZT procedentes de TRA con los gestados espontáneamente. El estudio reveló que en cuanto a las complicaciones obstétricas (hipertensión arterial, preeclampsia, placenta previa, RPM, hemorragia ante y postparto y cesáreas), no hubo diferencias entre ambos grupos. Respecto a los riesgos neonatales indicó que existía mayor riesgo de parto prematuro, bajo peso al nacer y malformaciones congénitas en el grupo de DZT tras FIV/ICSI, esta última sin evidencia de heterogeneidad. En cuanto a la mortalidad perinatal y la edad gestacional no encontraron diferencias. Por otro lado, informaron que, aunque la tasa de MZT constituye hasta un tercio de todas las gestaciones gemelares tras TRA, es muy difícil hacer una comparación con los MZT de gestaciones espontáneas debido al bajo porcentaje en el que se encuentra. En cuanto a la comparación entre DZT y MZT, estos últimos tienen un mayor riesgo de morbilidad perinatal, debido a que comparten la placenta, incluyendo diferencias en el crecimiento, síndrome de transfusión feto-fetal, prematuridad, déficit neurológico y muerte perinatal (Pinborg et al., 2004; Davies et al., 2012; Carter et al., 2015). Por lo que la corionicidad debe ser considerada a la hora de predecir los resultados perinatales en embarazos gemelares.

Por otro lado, se conoce que algunos casos de esterilidad pueden tener un origen genético, por lo que el propio tratamiento puede facilitar la transmisión intergeneracional de anomalías genéticas. Existe una mayor prevalencia de anomalías cromosómicas estructurales en hombres y mujeres estériles (Clementini et al, 2005). Se ha encontrado un aumento significativo del riesgo de anomalías cromosómicas en niños concebidos mediante ICSI (1,4% - 3,5%) en comparación con los concebidos de forma espontánea (0,3% - 0,4%). Este aumento parece ser debido a la patología subyacente en el varón y no a la técnica en sí, ya que cuando los resultados se reanalizan en niños de ICSI de parejas estériles sin factor masculino, el riesgo de padecer anomalías cromosómicas disminuye a valores próximos a los encontrados tras FIV o embarazos espontáneos (0,24% - 0,9%) (Bonduelle et al, 2002).

El riesgo de anomalías congénitas se vincula tanto a embarazos únicos como gemelares. Aunque algunos trabajos asocian un mayor riesgo de anomalías a los embarazos múltiples (Bonduelle et al, 2002), otros no encuentran diferencias significativas entre únicos y múltiples (Ricciarelli et al, 2013). Aunque se desconocen las causas del comentado aumento de malformaciones congénitas, éstas se pueden, en parte, atribuir a la patología subyacente a la infertilidad de la pareja, ya que aquellas que tardan más de un año en concebir espontáneamente presentan un riesgo mayor que la población general (Zhu et al, 2006). Las principales anomalías incluyen las gastrointestinales, cardiovasculares, y musculoesqueléticas (El-Chaar et al, 2009). Es importante destacar que aunque el riesgo relativo de anomalías tras FIV/ICSI es 30-40% mayor que en concepciones espontáneas, el riesgo absoluto es muy pequeño ya que las anomalías son poco frecuentes.

En resumen, diversos estudios indican que la propia esterilidad, con o sin TRA, es una condición que conduce a un mayor riesgo de anomalías congénitas en comparación con las concepciones espontáneas (Levi et al., 2016; Bonduelle et al., 2005).

4.6.3. Crioconservación de embriones

La introducción de la crioconservación de embriones fue una revolución en los TRA. La transferencia de embriones crioconservados (FET del inglés *frozen embryo transfer*) se ha utilizado cada vez más, ya que tiene varias ventajas, entre ellas, una similar o incluso mayor tasa de gestación en comparación con las transferencias en fresco (Roque et al., 2013). Además, la FET es un método muy útil para preservar los embriones sobrantes de buena calidad en mujeres con buena respuesta ovárica, pudiendo aumentar las transferencias únicas electivas y evitando las gestaciones múltiples, así como el SHO (Aflatoonian et al., 2016). Independientemente de las mejoras en la técnica de crioconservación, los aspectos de seguridad y su impacto en la salud de los recién nacidos son aun tema de debate (Shavit et al., 2017).

En cuanto a los resultados obstétricos y perinatales de la FET existen estudios que sugieren que son similares a los de las transferencias en fresco, mientras otros estudios indican que son incluso mejores (Zhao et al., 2016). Un meta-análisis realizado por Maheshwari et al. (2012) confirma que los resultados obstétricos tras FET son mejores que tras la transferencia en fresco, en términos de hemorragia anteparto, placenta previa y desprendimiento placentario. Sugieren que estos peores resultados tras TE en fresco, son debidos al efecto deletéreo de las gonadotropinas durante la estimulación ovárica que implica una asincronía entre el desarrollo del embrión y la receptividad endometrial, debido a los niveles suprafisiológicos de estradiol y progesterona, que altera la angiogénesis del endometrio y puede afectar a la implantación embrionaria y placentación. Por el contrario, al realizar la FET el ambiente uterino es más favorable, ya que los niveles de estradiol y progesterona que se utilizan imitan los ciclos naturales, por lo que puede verse favorecida la placentación temprana. En cuanto a los resultados perinatales en gestaciones únicas, encontraron una tendencia a una menor probabilidad de parto prematuro en FET en comparación con TE en fresco, recién nacidos más grandes para la edad gestacional, y mayor peso al nacer (Pinborg et al., 2014). Esto puede deberse a que el proceso de crioconservación puede seleccionar a los embriones más débiles, permitiendo que solo los de buena calidad

sobrevivan, lo que sugiere un mejor crecimiento fetal. Confirmando que la crioconservación embrionaria no afecta de forma negativa en el resultado perinatal (Pinborg et al., 2010; Maheshwari et al., 2012).

Por otro lado, Wennerholm et al., (2013) analizaron los efectos adversos de los recién nacidos únicos tras FET comparándolos con los recién nacidos tras TE en fresco y los concebidos de forma espontánea. El principal hallazgo de este estudio reveló que los recién nacidos tras FET tienen mejor resultado en cuanto a parto pretérmino, mayor peso al nacer y son mayores para la edad gestacional al compararlos con los recién nacidos tras TE en fresco, pero no con los concebidos espontáneamente. Indicaron un aumento leve del riesgo de mortalidad perinatal, así como un aumento de la tasa de macrosomía en el grupo de recién nacidos tras FET ocasionado por la mayor edad gestacional en este grupo.

En cuanto a las anomalías congénitas encontradas en recién nacidos tras FET, la literatura actual no ha mostrado ninguna diferencia significativa en comparación a los recién nacidos tras transferencias en fresco (4,2% vs 4,5) (Pelkonen et al., 2014). Sin embargo, un estudio mostró una mayor tasa de anomalías congénitas en los recién nacidos de FET-ICSI en comparación con los recién nacidos de ICSI y FET-IVF a los 2 meses de edad (Belva et al., 2008).

Ricciarelli et al., (2013) realizó un estudio en que analizó las malformaciones congénitas, prematuridad y aborto en embarazos únicos y múltiples derivados de las diferentes TRA en España. Analizó 1.404 recién nacidos procedentes de FET y obtuvo una tasa de malformaciones congénitas en embarazos únicos del 0,2% mientras que en embarazos múltiples obtuvo 1,5%. No encontraron diferencias significativas entre las distintas TRA y la tasa de malformaciones congénitas, tanto en embarazos únicos como múltiples en FET.

4.6.4. Día de la transferencia embrionaria

Durante los tres primeros días del desarrollo embrionario, el embrión se encuentra en la trompa de Falopio, para posteriormente entrar en la cavidad uterina tras la compactación. La implantación ocurre a partir de entonces, entre los días 5 y 7 tras la fecundación (Croxatto et al., 1978). Tradicionalmente en los ciclos de FIV/ICSI los embriones son transferidos al útero en D+3, sin embargo, gracias al conocimiento sobre los requerimientos metabólicos del embrión y las condiciones del cultivo in vitro se han desarrollado medios específicos que permiten el cultivo hasta D+5 (Blake et al., 2007). La TE en D+5 o blastocisto, tiene varias ventajas teóricas, ya que es más fisiológica y el potencial del embrión es mayor debido a que únicamente los embriones más viables sobreviven para llegar a este estadio. Por tanto, existe mejor sincronía entre el embrión y el endometrio y permite la selección de embriones de mejor calidad. Además, está demostrada que la contractibilidad uterina disminuye a medida que avanzan los días y que el endometrio 5 días post-punción parece ser el óptimo para la implantación embrionaria, con una ventana de implantación similar en tiempo a la concepción natural (Fanchin et al., 2001).

Varios estudios indican que los embarazos únicos con TE en estadio de blastocisto se asocian con un mayor riesgo de parto pretérmino en comparación con los embarazos únicos con TE en D+3, además, no observan ninguna diferencia adicional en los resultados perinatales ni neonatales (Kalra et al., 2012; Maheshwari et al., 2013; Dar et al., 2014; Pinborg et al., 2013). Ginström et al. (2016) realizaron un estudio en el que comparaban los resultados obstétricos y neonatales de recién nacidos tras TE en D+3, en estadio de blastocisto y a través de concepciones espontáneas en embarazos únicos. Encontraron un mayor riesgo de placenta previa y desprendimiento placentario en el grupo de TE de blastocistos, que puede ser debido a que el cultivo largo puede afectar al espesor del endometrio causando que la implantación del embrión se produzca en la parte baja de la cavidad uterina y por tanto, causando complicaciones placentarias. En cuanto a los resultados neonatales sugieren un mayor riesgo de mortalidad perinatal y parto pretérmino en el grupo de TE de blastocistos, que puede ser ocasionado por las

complicaciones placentarias. Por otro lado, diversos meta-análisis encuentran una mayor proporción de recién nacidos grandes para la edad gestacional tras TE de blastocistos que puede estar relacionado con una disminución del riesgo del retraso del crecimiento intrauterino en este tipo de TE (Maheshwari and Bhattacharya, 2013; Maheshwari et al., 2013). Por estos resultados se ha sugerido que los medios de cultivo usados en el cultivo largo podrían ser los responsables de este aumento de la edad gestacional, sin embargo, un estudio realizado en 2015 indicó que los medios de cultivo embrionario no tiene ningún efecto sobre este aumento de la edad gestacional (De Vos et al., 2015).

De forma contradictoria a lo anteriormente descrito, existen estudios que indican que los recién nacidos tras TE de blastocistos no están asociados con un peor resultado obstétrico y perinatal en comparación con las TE en estadio de división (Oron et al., 2014; Oron et al., 2015).

Respecto a la relación hombre/mujer o *sex ratio* (n° de hombres/ n° de mujeres) existen estudios que indican que la TE de blastocistos produce una alteración a favor del sexo masculino. Este desequilibrio en la proporción de sexos puede estar relacionado con la observación de que los embriones masculinos se desarrollan más rápidamente que los embriones femeninos (Chang et al., 2009; Maalouf et al., 2014; Ginström et al., 2016)

En cuanto a las anomalías congénitas un meta-análisis indica que en los recién nacidos tras TE de blastocistos aumentan de forma significativa en comparación con las TE en estadio de división (Dar et al., 2014). Sin embargo, estudios recientes contradicen estas conclusiones (Ginström et al., 2016).

4.6.5. DGP

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se utiliza para seleccionar embriones que no estén afectados por un trastorno genético o cromosómico. A pesar del número relativamente grande de estudios sobre los resultados neonatales después de la FIV/ICSI, estos datos y conclusiones no pueden ser extrapolados y utilizados para el DGP ya que éste se realiza

analizando material biológico (corpúsculo polar, una o dos células, trofoblasto) de ovocitos, cigotos, embriones o blastocistos, lo que añade una manipulación invasiva adicional (Eldar-Geva et al., 2014).

El primer éxito tras DGP se describió por primera vez en 1990, para prevenir la transmisión de una enfermedad ligada al cromosoma X. Desde entonces el DGP se ha implementado en parejas que portan desequilibrios cromosómicos estructurales o numéricos o enfermedades monosómicas y evitar su transmisión a la descendencia. (Bay et al., 2016).

La Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) informó que los embarazos y recién nacidos tras DGP no son diferentes de los obtenidos tras ICSI (Harper et al., 2012). Del mismo modo, la edad gestacional, el peso al nacer y la muerte perinatal no fueron diferentes en un estudio que comparó 995 recién nacidos tras DGP con 1.507 recién nacidos tras ICSI. Curiosamente, un menor número de recién nacidos tras DGP presentó bajo peso al nacer en comparación con la ICSI. En cuanto a las malformaciones congénitas, obtuvieron malformaciones mayores en el 2,3% de los recién nacidos tras DGP y 2,7% en los recién nacidos tras ICSI (Desmyttere et al., 2012).

Un estudio reciente comparó los resultados perinatales de 242 recién nacidos tras DGP con 242 recién nacidos de ICSI y 733 recién nacidos de gestaciones espontáneas de parejas según la edad materna, paridad e índice de masa corporal (IMC). La incidencia de complicaciones en el embarazo tras DGP fue baja y similar a la de los grupos control. En los embarazos únicos el peso de los recién nacidos de DGP y el parto pretérmino no fueron diferentes al grupo de recién nacidos mediante gestaciones espontáneas, pero fue mayor en comparación con los recién nacidos tras ICSI. La mayor edad gestacional fue más frecuente en el grupo de DGP después del grupo de las gestaciones espontáneas. En los embarazos gemelares no se detectó diferencias entre el bajo peso al nacer entre los recién nacidos tras DGP y mediante gestaciones espontáneas, sin embargo, en el grupo de ICSI fue significativamente menor. Además, analizaron las transferencias en fresco y tras FET, además del tipo de

biopsia y no encontraron diferencias entre los grupos. En cuanto a las malformaciones congénitas encontraron un 1,7% en el grupo de embarazos múltiples tras DGP no estando disponibles los datos en los demás grupos. Concluyen que no es el procedimiento de la ICSI, lo que pueda ocasionar los resultados adversos encontrados, sino más bien la infertilidad en sí, ya que la mayoría de las parejas que hacen uso del DGP no tienen problemas de fertilidad (Eldar-Geva et al., 2014).

4.6.6. Inhibidores de la fosfodiesterasa

El desarrollo de la ICSI ha sido un gran avance en el tratamiento de la infertilidad. Esta técnica permite el acceso a estas técnicas a los pacientes con un factor masculino grave, como aquellos que presentan exclusivamente espermatozoides inmóviles, condición conocida como “astenozoospermia absoluta” (Ortega et al., 2011; Rubino et al., 2016). Ésta representa una condición poco frecuente, ya que suele ser debida a la muerte del espermatozoide (necrozoospermia) o a defectos en el espermatozoide relacionados con trastornos moleculares específicos como la discinesia ciliar primaria o la displasia de la vaina fibrosa (Dávila Garza and Patrizio, 2013; Nagy, 2000). Por otra parte, dado que la motilidad espermática suele mejorar durante la maduración en el epidídimo, los gametos recuperados por biopsia testicular (TESE) o aspiración testicular (TESA) también se caracterizan por la ausencia de motilidad espermática, especialmente tras un procedimiento de congelación/descongelación. Los espermatozoides testiculares son mayoritariamente inmóviles inmediatamente después de la biopsia, y si esta muestra se congela, aún se acentuará más la inmovilidad espermática. Tras la descongelación, es frecuente encontrar una baja tasa de movilidad espermática, de modo que una pauta habitual en el laboratorio de embriología es dejar la muestra de biopsia un tiempo en cultivo para facilitar la recuperación de movilidad. Sin embargo, a pesar del tiempo de cultivo, hay una serie de muestras que no recuperan ninguna movilidad (Blanes Zamora et al., 2008).

Para realizar una ICSI en estas condiciones de astenozoospermia severa o absoluta es fundamental distinguir los espermatozoides inmóviles viables de los no viables (Rubino et al., 2016). Se han desarrollado tres estrategias principales para mejorar los resultados de la ICSI cuando no es posible obtener espermatozoides móviles o identificar espermatozoides inmóviles vivos en el eyaculado o TESE: a) prueba hipoosmótica; b) prueba de flexibilidad de la cola; y c) uso de agentes farmacológicos como la cafeína (Garbers et al., 1971) o derivados de la xantina tales como la teofilina (Loughlin and Agarwal, 1992) o pentoxifilina (PTX) (Griveau et al., 2006; Kovacic et al., 2006; Sharma and Agarwal, 1997). La PTX es un inhibidor de la fosfodiesterasa del grupo de las metilxantinas, que inhibe la rotura del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc activa la proteína quinasa, la cual regula la fosforilación de la tirosina que es una importante vía reguladora en la modulación de los eventos asociados a la capacitación espermática (Guasti et al., 2017).

Más específicamente, el uso de PTX se utiliza ampliamente en la rutina diaria de laboratorio como un método de selección para identificar espermatozoides viables. Puede ser fácilmente añadido a la muestra de semen antes de la ICSI con el fin de impulsar el movimiento flagelar en espermatozoides vivos a través de la inhibición de la 3' - 5' nucleotidasa fosfodiesterasa que resulta en un aumento de la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos (Nassar et al., 1999; Yovich, 1993).

La eficacia de la PTX para estimular la motilidad y mejorar los resultados de la ICSI se ha descrito previamente (Hurtado de Mendoza et al., 2000, Rubino et al., 2016). Sin embargo, su uso no es universalmente aceptado por sus efectos nocivos en los ovocitos (activación artificial y cambios morfológicos), embriones (retraso o arresto del desarrollo) o recién nacidos (efectos teratogénicos) (Fisher and Gunaga, 1975; Scott and Smith, 1995; Tournaye et al., 1993). De hecho, hace tres décadas, que se informó que la metilxantina causa malformaciones en modelos animales tales como ratón, *xenopus* y pollo (Bruyere et al., 1983; Dawson and Bantle, 1987; Nakatsuk et al., 1983; York et al., 1986). Cabe destacar que todos estos efectos negativos

se derivaron de la exposición directa de ovocitos o embriones a concentraciones experimentalmente altas de derivados de xantina. Por el contrario, cuando se utiliza PTX para la selección de espermatozoides durante la ICSI, su concentración en la gota de cultivo es insignificante y la exposición de ovocitos/embriones está virtualmente ausente. La Agencia Francesa de la Biomedicina incluyó en 2013 la selección de espermatozoides vivos antes de la ICSI utilizando inhibidores de la fosfodiesterasa en la lista oficial de técnicas permitidas para el mejoramiento de los procedimientos de técnicas de reproducción asistida (Agence de BioMédecine, 2013). Sin embargo, sorprendentemente a este respecto, los datos publicados sobre su seguridad en seres humanos son nulos.

JUSTIFICACIÓN

Ya que la monoterapia es un tratamiento cada vez más extendido dada su eficacia, es necesario aclarar si este tipo de terapia es igual de segura que la triterapia, en cuanto a carga viral en semen se refiere, para poder aconsejar este tipo de terapia a aquellas parejas con deseos reproductivos. Además, la calidad seminal en los pacientes adscritos a triterapia no es buena, por lo que al cambiar a monoterapia podría mejorar la calidad seminal, aumentando la fertilidad de las parejas con varones VIH⁺ con este tipo de tratamiento.

La calidad embrionaria es clave para el éxito de las TRA y ésta ha sido cuestionada en varones VIH⁺. Los sistemas de evaluación embrionaria de time-lapse permiten detectar eventos del desarrollo embrionario que normalmente no son detectados por evaluación morfológica estática, ya que ocurrirían entre las observaciones puntuales realizadas durante la evaluación morfológica estática. Por lo que el estudio morfocinético de embriones de varones VIH⁺ permite evaluar la calidad de éstos de manera mas precisa que la descrita hasta ahora.

En cuanto a la seguridad de las TRA, el uso de la PTX no está totalmente aceptado ya que hace tres décadas, se informó que la metilxantina causa malformaciones en modelos animales tales como ratón, *xenopus* y pollo. A pesar de que la Agencia Francesa de Biomedicina incluyó en 2013 la selección de espermatozoides vivos durante la ICSI utilizando inhibidores de la fosfodiesterasa, como la PTX, en la lista oficial de técnicas permitidas para la mejora de los procedimientos de TRA, los datos publicados sobre su seguridad en humanos son nulos.

OBJETIVOS

Como hemos visto en la Introducción, los cambios en las expectativas de vida en pacientes con VIH, han hecho que exista una creciente demanda de consejo reproductivo por estas parejas. Siendo la seguridad de estas técnicas un elemento determinante en su evaluación.

Por todo lo anterior en este estudio nos proponemos analizar los avances en los diferentes aspectos sobre la atención a los deseos reproductivos de parejas con varón VIH⁺, así como en la seguridad de las TRA:

1°. Evaluar la efectividad de las nuevas terapias frente a VIH (monoterapia) en cuanto a calidad y carga viral seminal se refiere.

2°. Profundizar en la influencia de la infección VIH⁺ en varones sobre la calidad embrionaria en programas de FIV/ICSI.

3°. Analizar los resultados obstétricos y neonatales, incluyendo malformaciones congénitas, de las gestaciones y recién nacidos obtenidos mediante ICSI-PTX.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Efecto de la monoterapia con DRV/r sobre la calidad y carga viral seminal

1.1. Diseño experimental

Se realizó un estudio experimental prospectivo para analizar este efecto. Se analizaron la carga viral y calidad seminal en varones VIH⁺ en tratamiento con triterapia, y, en los mismos varones, tras cambiar dicho tratamiento a monoterapia con Darunavir/Ritonavir durante 48 semanas. Se realizó una determinación al inicio del estudio (V0) y otra tras 48 semanas (V1) de tratamiento con monoterapia con Darunavir/Ritonavir. Se incluyeron pacientes que acudieron regularmente a la consulta en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN) de Granada para su seguimiento, entre Mayo de 2012 y Septiembre de 2015. Todos los pacientes fueron informados de la naturaleza del estudio y firmaron el consentimiento informado para poder participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del CHU de Granada. Los datos de los pacientes fueron codificados para mantener el anonimato.

Las visitas de los pacientes a consulta fueron programadas, para cada uno de los pacientes, cada cuatro meses. La adherencia a la medicación se evaluó mediante la comprobación en farmacia hospitalaria, del expediente de prescripción de cada paciente.

1.2. Selección de pacientes

Pacientes que estaban recibiendo tratamiento antirretroviral estable, que incluía dos análogos de nucleós(t)idos y un tercer fármaco. Todos tenían una carga viral indetectable en plasma sanguíneo (< 20 copias/ml).

1.2.1. Criterios de inclusión

- Hombres infectados con VIH-1, con una carga viral indetectable en plasma (<20 copias/ml) durante al menos seis meses.
- Al menos 18 años de edad.

1.2.2. Criterios de exclusión

- Pacientes no adherentes a consultas programadas.
- Pacientes con antecedentes de tratamiento o enfermedades endocrinológicas o genitales que podrían afectar a la calidad del semen.

1.3. Características sociodemográficas, clínicas y de laboratorio en pacientes VIH⁺

Las variables analizadas fueron: edad, consumo de alcohol y tabaco, historia androgénica, historia reproductiva, recuento de linfocitos CD4⁺ y CD4⁺ nadir, tipo de antirretrovirales, carga viral en plasma sanguíneo y carga viral en plasma seminal.

1.4. Características de parámetros seminales

Los parámetros considerados en el análisis de la calidad del semen fueron: licuefacción, viscosidad, aspecto, volumen, pH, concentración de espermatozoides y células redondas, número total de espermatozoides, motilidad progresiva y total, morfología y vitalidad espermática. Además se calculó el índice de teratozoospermia.

1.4.1. Análisis de semen

Todas las muestras de semen fueron obtenidas mediante masturbación tras 3 - 4 días de abstinencia sexual. La mayor parte de las muestras fueron recogidas en el laboratorio de la Unidad de Reproducción del HUVN de Granada. Menos del 5% de todas las muestras fueron recogidas por los participantes del estudio en sus domicilios. En este último caso, la muestra de semen se mantuvo a temperatura corporal y se entregó en el laboratorio antes de que transcurrieran 45 minutos tras la recogida. Durante la recepción de la muestra en el laboratorio, se registraron los siguientes datos: periodo de abstinencia sexual, pérdida de alguna fracción del eyaculado durante la recogida, consumo de drogas, presencia de fiebre en los últimos meses, índice de masa corporal y participación reciente en algún deporte extremo.

Todas las muestras fueron analizadas dentro de la primera hora tras la recogida y analizadas por una única persona para minimizar la variabilidad analítica y maximizar la precisión del estudio.

Cada participante proporcionó un total de cuatro muestras de semen: dos antes de iniciar la monoterapia y otras dos después de 48 semanas de tratamiento con monoterapia. El intervalo de tiempo entre la primera muestra y la segunda de cada par de muestras recogidas fue de 15 días.

Todas las muestras de semen fueron manejadas y evaluadas siguiendo las recomendaciones de la OMS (WHO, 2010). El manejo de las muestras de semen de varones VIH⁺ fue realizado en una cabina de seguridad biológica Clase II.

La concentración espermática y de células redondas fue determinada usando un hemocitómetro Neubauer Improved, pipeta de desplazamiento positivo y conteo por duplicado. El número total de espermatozoides se calculó multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen del líquido seminal, que se midió mediante pesada de la muestra. Para la evaluación de la motilidad, el campo microscópico fue valorado visualmente y expresado como porcentaje. Se utilizaron cubreobjetos de 22mm x 22mm y se analizó una alícuota de 10 µl de semen. Para la evaluación morfológica se realizaron extensiones seminales que fueron teñidas mediante la tinción rápida Diff-Quick. Se contaron 200 espermatozoides. La vitalidad espermática se evaluó mediante test de eosina/nigrosina. Además se calculó el porcentaje de aquellos participantes cuyos valores se encontraban por debajo del límite inferior de los valores de referencia de la OMS 2010 para los parámetros seminales (WHO, 2010).

1.4.2. Detección de carga viral en plasma seminal

Se generaron dos fracciones mediante centrifugación (300 g, 15 minutos). El plasma seminal se analizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

La técnica utilizada para cuantificar ARN VIH-1, fue un ensayo adaptado de VIH-1 COBAS Ampliprep/Taqman assay (Roche Diagnostics).

En cada muestra de semen se determinó la carga viral, por tanto, se realizaron dos determinaciones en plasma seminal, con 15 días de diferencia entre la recogida de la primera muestra y la siguiente, antes de comenzar el tratamiento con monoterapia. Y otras dos determinaciones tras 48 semanas desde el inicio con monoterapia, separadas por el mismo intervalo. Se recogieron cuatro muestras en total por paciente.

2. Evaluación de la calidad embrionaria en parejas con varón VIH⁺

2.1. Diseño experimental

Se diseñó un estudio retrospectivo observacional de casos y controles, en el que se analizaron las características morfológicas y morfocinéticas de embriones procedentes de parejas con varón VIH⁺ frente a las de parejas con varón VIH⁻. La población control consistió en parejas estériles por factor tubárico o factor masculino leve con varones VIH⁻ con características clínicas similares: edad, número de ciclos previos, índice de masa corporal (IMC) y FSH basal en la mujer, que acudieron a la Unidad de Reproducción de HUVN de Granada, entre enero de 2013 y julio de 2016.

El varón VIH⁺ debía estar bajo seguimiento por un médico especialista en enfermedades infecciosas y proveer un informe médico donde se especificase un estudio serológico reciente, recuento de linfocitos CD4⁺ y carga viral con antigüedad máxima de 4 meses, tratamiento recibido y evolución de la enfermedad durante los últimos 12 meses, y en su caso, la presencia de infecciones oportunistas o complicaciones graves asociadas a la infección por VIH (Guía de Reproducción Humana Asistida SAS, 2016).

El estudio básico de esterilidad de la pareja consistió en: anamnesis, evaluación física general y ginecológica, ecografía vaginal de útero y anejos. También se hizo determinación de hormonas basales en sangre el día 3 del ciclo. Los varones fueron evaluados mediante análisis seminal según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2010). El laboratorio de TRA utilizado para todos los procedimientos estaba separado del laboratorio utilizado para el resto de parejas seronegativas para VIH.

2.2. Lavado de semen en varones VIH⁺ que se someten a TRA

2.2.1. Lavado de semen

Todas las muestras de semen de varones VIH⁺ con deseos reproductivos fueron manipuladas y evaluadas según las recomendaciones de la OMS (WHO, 2010). Todo el manejo de las muestras se realizó en una cabina de seguridad biológica Clase II.

El protocolo de lavado de semen está basado en la publicación inicial de Semprini et al. (1992). La muestra de semen fue procesada mediante la técnica de gradiente de densidad 80%-40% (PureSperm 100 y PureSperm Buffer, Nidacon, Mölndal Sweden), cada capa de 1 mL. El semen era pipeteado directamente encima de la capa superior. Tras centrifugación (20 min a 180 g) se eliminaron los restos de plasma, semen y los gradientes de densidad, a continuación se recogió el botón celular con un nueva pipeta. Este botón celular fue resuspendido 1:2 (vol:vol) con PureSperm Wash (Nidacon, Mölndal Sweden) y centrifugado durante 8 min a 180 g. Posteriormente esta muestra era decantada y se le añadía 1 mL de PureSperm Wash lentamente, dejándolo

caer por las paredes del tubo, para la realización de swim-up. Se centrifugaba la muestra unos segundos a 300 g y se dejaba en la incubadora a 37°C y 6,3% de CO₂ durante 45 minutos con una inclinación de 45°. Pasado este tiempo se aspiraba cuidadosamente el sobrenadante (1 mL). La muestra de espermatozoides obtenida se dividió en varias partes: una parte se usó para la valoración de la muestra mediante recuento y movilidad espermática, otra para la determinación viral mediante PCR y una última fracción fue congelada y almacenada hasta su utilización tras descartar la presencia de partículas víricas en la muestra lavada.

2.2.2. Detección de la carga viral

La técnica utilizada para cuantificar ARN VIH-1 en la muestra final procesada fue PCR a tiempo real, un ensayo adaptado de VIH-1 COBAS Ampliprep/Taqman assay Ampliprep/Taqman (Roche Diagnostics). Esta técnica fue validada a través de la participación en un control de calidad externo organizada por la red CREAThE (Centres for Reproductive Assisted Techniques for HIV in Europe). Se trata de una asociación europea de centros sin ánimo de lucro que tiene como objetivo principal mejorar la asistencia reproductiva que se ofrece a parejas serodiscordantes para VIH (Pasquier et al., 2012).

2.2.3. Congelación de semen

La congelación se realizó mezclando la muestra de semen lavada con el crioprotector Sperm Freezing Medium (Irvine Scientific, Waalwijk, Netherlands) en relación 1:1, este crioprotector era añadido gota a gota en un tiempo medio de 15 minutos. La mezcla fue cargada en pajuelas termosellables de alta seguridad biológica (Cryo Bio System, París, Francia) de 0,5 mL correctamente identificadas. Se realizaba mediante un embudo (punta amarilla) y una jeringa de 1 mL, para evitar el contacto entre el semen y el exterior de la pajuela. Estas pajuelas eran termoselladas (Cryo Bio System, París, Francia) y congeladas utilizando un congelador vertical (Nicool LM10, Labortechnik, Marne la Vallee, France).

Para la utilización de las muestras, se descongelaba el número de pajuelas que previamente se habían estimado necesarias. Estas eran descongeladas a 37° C en estufa durante 10 minutos. A continuación se añadía el mismo volumen de MOPS Plus suplementado con HSA (Vitrolife, Göteborg Sweden) que de semen (1:1), y se centrifugaba durante 8 minutos a 180 g. Posteriormente se realizaba un swim-up, que consistía en descartar el sobrenadante y añadir 0,5 mL de MOPS Plus (Vitrolife, Göteborg Sweden). La muestra era centrifugada de nuevo durante un minuto a 180 g y se incubaba 45 minutos a 37°C y con una inclinación de 45° (Mortimer, 1994). Pasado este tiempo se aspiraba cuidadosamente la capa superficial del medio de cultivo con una pipeta Pasteur.

2.2.4. Protocolos de estimulación ovárica

Las pacientes siguieron un tratamiento de estimulación de la ovulación, con el propósito de conseguir un desarrollo folicular múltiple. Se utilizaron protocolos de agonistas de la GnRH en la pauta de “Análogo largo” y de “Antagonista”.

Ambos tratamientos siguieron los protocolos descritos a continuación:

- Análogo largo: Se utilizó un protocolo con agonistas de la GnRH que consiste en administrar desde el día 22 del ciclo 0,1 mg/día de análogo de la GnRH (Decapeptyl® 0.1; Lasa, Barcelona, España) hasta el día en que se inicia la administración de gonadotrofina, en el que se reduce la dosis al 50% hasta el día de la hCG. Tras 10-14 días de administración del agonista se procede a comprobar la frenación hipofisaria mediante ecografía vaginal ovárica (ausencia de folículos y quistes). Si se confirma dicha hipofisectomía médica se comienza a administrar 300 UI de FSH (Gonal F®, Merck-Serono, Madrid, España y/o Menopur®, Ferring Pharmaceuticals, España) durante dos días, y 150 UI de FSH desde el 3º al 7º día. En este día se realiza control ecográfico del desarrollo folicular y determinación sérica de estradiol con el fin de ajustar nuevamente la dosis de FSH a cada paciente. Una vez que la

respuesta folicular es adecuada (más de 3 folículos ováricos mayores de 18 mm de diámetro) se procede a desencadenar la ovulación mediante 250 µg de coriogonadotropina alfa (hCGr, Ovitrelle®, Merck-Serono, Madrid, España).

- Antagonista: El tratamiento comienza el día 2 del ciclo con 225 UI/día vía subcutánea de FSH (Gonal F®, Merck-Serono, Madrid, España y/o Menopur®, Ferring Pharmaceuticals, España) con pauta descendente dependiendo de los controles ecográficos cada 2 días a partir del octavo día del ciclo. Se instaura tratamiento con antagonistas de la GnRH (Orgalutran®, Merck Sharp & Dohme, España) a dosis de 0.25mg/día vía subcutánea cuando se observa algún folículo con diámetro mayor de 14mm o más por ecografía. Cuando se visualizan folículos de 18mm o más de diámetro se desencadena la ovulación del mismo modo siguiendo el protocolo anterior.

2.2.5. Punción folicular y laboratorio de FIV-ICSI

La recuperación ovocitaria se realizó por punción folicular ecoguiada vía transvaginal 36 horas después de la inyección de hCG-r, anticipándose al proceso ovulatorio. Utilizando una aguja de punción ovárica (Labotect Labor-Technik- Göttingen, Göttingen, Germany) puncionamos uno a uno los folículos mayores de 17 mm aspirando su contenido en tubos de recogida de líquido folicular (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) con un sistema de vacío a 150 mm de Hg de presión. El contenido del folículo aspirado se transportó rápidamente al laboratorio de reproducción en un contenedor previamente calentado a 37°C para comprobar de inmediato la presencia del complejo cúmulo-corona-ovocito en el líquido folicular. No se realiza de forma habitual profilaxis antibiótica, y tan sólo en los casos en que la punción ofrezca mayor dificultad se administró vía intravenosa una dosis única de 1.500 mg de cefuroxima sódica (Cefuroxima Normon EGF, Madrid, España) o de 1.000 mg de lactobionato de eritromicina (Pantomicina Abbot, Madrid, España) en pacientes alérgicas a betalactámicos.

Una vez que los líquidos foliculares llegaban al laboratorio, se inició la búsqueda e identificación del ovocito. Para ello se depositaban en una placa de Petri de 100x15 mm y bajo visión estereomicroscópica se observaban para localizar el complejo cúmulo-corona-ovocito. Identificado éste, mediante una pipeta Pasteur se colocaba en una nueva placa de Petri de 35x10 mm en el interior de unas gotas de medio de cultivo MOPS Vitrolife (MOPS Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) previamente calentado a 37°C, para eliminar los restos de LF. Se depositaron los cúmulos en medio de cultivo de maduración IVF Vitrolife (IVF Science Scandinavia, Gotheburg, Sweden) hasta la realización de la ICSI.

Para realizar la microinseminación espermática (ICSI) es necesario eliminar el cúmulo y la corona radiada del ovocito. Para decumular se sumerguía el complejo cúmulo-corona-ovocito en una solución con 80 UI/mL de hialuronidasa (HYASE, Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) en medio de lavado MOPS Vitrolife (MOPS Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) durante 10-20 segundos aspirando varias veces el complejo mediante pipeta pasteur. La actuación sobre la corona radiada se realizó mecánicamente haciendo pasar al ovocito varias veces por un capilar con un diámetro adecuado (125µm).

Las micropipetas utilizadas para la microinyección son la de sujeción y la de inyección o ICSI (Origio, Humagen Pipets). La placa en la que se realizó la ICSI estaba cubierta de aceite mineral (OVOIL, Science Scandinavia, Gotheburg, Sweden) para mantener la osmolaridad y temperatura del medio (aunque la placa estaba además colocada sobre una superficie calefactora del microscopio). En dicha placa se colocaron gotas de polivinilpirrolidona (PVP Science Scandinavia, Gotheburg, Sweden) ya que ralentiza el movimiento de los espermatozoides y facilita la selección del espermatozoide. También se colocaron varias gotas de medio MOPS. En la gota de PVP se depositaba un volumen de espermatozoides dependiendo de la concentración. Los ovocitos a microinyectar se colocaban en las gotas de MOPS, donde no permanecían más de 15 minutos.

Tras comprobar el correcto funcionamiento de la pipeta de inyección se seleccionaron los espermatozoides según morfología y movilidad; el espermatozoide seleccionado se inmovilizó por presión mecánica de la cola. Con esto se facilita la activación ovocitaria por permeabilización de membranas ya que se liberan factores citosólicos que activan al ovocito y facilitarán la posterior formación del pronúcleo masculino. Tras la inmovilización, se aspiró por la cola para asegurarnos de que al inyectarlo no se quedaba fuera la cabeza.

Una vez fijado el ovocito con la pipeta de sujeción, se colocó la pipeta de inyección con el espermatozoide frente al ovocito, se presionó para atravesar la zona pelúcida y la membrana plasmática, se aspiró primero suavemente para asegurarnos de haber penetrado la membrana y finalmente se depositó la pequeña fracción de citoplasma aspirado junto con el espermatozoide en el interior del ovocito.

2.2.6. Cultivo embrionario

Una vez microinyectados, los ovocitos se colocaron en las placas diseñadas para el sistema Primo Vision (Primo Vision EVO, Vitrolife, EMB), preparadas con 80 µl de medio de cultivo G1 (G1, Sciende Scandinavia, Gotheburg, Sweden) cubiertas por 5 ml de aceite mineral (OVOIL, Sciende Scandinavia, Gotheburg, Sweden) en un incubador a 37°C y a 6% de CO₂, durante 2 – 3 días.

El sistema Primo Vision es una plataforma para el estudio de la morfocinética embrionaria. Presenta una cámara integrada diseñada para obtener imágenes automáticas en los puntos de tiempo definidos.

La fecundación fue evaluada entre las 17-20 horas post ICSI, siendo desechados los cigotos con fecundación anómala. Para determinar el tiempo exacto de las divisiones celulares y otras características morfológicas, las imágenes de los embriones se tomaron cada 5 minutos y la frecuencia del escaneado fue cada 20 minutos el primer día y de 60 minutos el resto de días

hasta la transferencia embrionaria, con una resolución de 2560 x 1920 píxeles en 11 planos focales. La morfología y cinética embrionarias fueron evaluadas en un ordenador externo al incubador, con un software desarrollado específicamente para analizar imágenes por time-lapse (Primo Vision Capture Software, versión 4.3.1.6).

2.4. Clasificación embrionaria mediante análisis de time-lapse. Parámetros morfológicos y morfocinéticos.

Los videos time-lapse para la plataforma Primo Vision™, se generaron a partir de imágenes que constan de siete planos focales de 200 µm y son capturadas cada 5 minutos durante las primeras 24 horas y cada 20 minutos hasta el día de la transferencia embrionaria.

2.4.1. Parámetros morfológicos

Los embriones fueron clasificados morfológicamente en D+2 y D+3 en función de:

- Número de células.
- Porcentaje de fragmentación.
- Presencia de multinucleación.
- Presencia de vacuolas.
- Simetría de las blastómeras.

La clasificación embrionaria se basó en los criterios de clasificación de ASEBIR (Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, Tercera Edición, 2015).

2.4.2. Parámetros morfocinéticos

2.4.2.1. Parámetros morfocinéticos directos

Las series de imágenes se analizaron en tiempo real mediante el software incorporado en el sistema Primo Vision. En cuanto a los parámetros cinéticos, se anotaron de dos formas diferentes, según el t0 considerado. Si se

considera como t_0 la hora media de la ICSI, los parámetros cinéticos anotados fueron:

- t_{PB2} (h): Extrusión del 2º corpúsculo polar.
- t_{PNa} (h): Aparición de pronúcleos.
- t_{PNf} (h): Desaparición de pronúcleos.
- it_2 (h): Inicio de t_2 .
- t_2 (h): tiempo en el que embrión presenta 2 células.
- t_3 (h): tiempo en el que embrión presenta 3 células.
- t_4 (h): tiempo en el que embrión presenta 4 células.
- t_5 (h): tiempo en el que embrión presenta 5 células.
- t_6 (h): tiempo en el que embrión presenta 6 células.
- t_7 (h): tiempo en el que embrión presenta 7 células.
- t_8 (h): tiempo en el que embrión presenta 8 células.

Por otro lado, si se considera como t_0 la desaparición de PN (Ahlstrom et al., 2016), los tiempos registrados fueron:

- it_{2d} (h): tiempo en el que el embrión comienza la primera división desde la desaparición de los PN.
- t_{2d} (h): tiempo en el que embrión presenta 2 células desde de la desaparición de los PN.
- t_{3d} (h): tiempo en el que embrión presenta 3 células desde de la desaparición de los PN.
- t_{4d} (h): tiempo en el que embrión presenta 4 células desde de la desaparición de los PN.
- t_{5d} (h): tiempo en el que embrión presenta 5 células desde de la desaparición de los PN.
- t_{6d} (h): tiempo en el que embrión presenta 6 células desde de la desaparición de los PN.
- t_{7d} (h): tiempo en el que embrión presenta 7 células desde de la desaparición de los PN.
- t_{8d} (h): tiempo en el que embrión presenta 8 células desde de la desaparición de los PN.

2.4.2.2. Parámetros morfocinéticos indirectos

A partir de los parámetros morfocinéticos directos se obtuvieron una serie de valores derivados relacionados con la duración de los ciclos celulares (Ciray et al., 2014):

- VP: Duración de los PN ($t_{PNf} - t_{PNa}$).
- ECC1: Duración del primer ciclo celular ($t_2 - t_{PB2}$).
- ECC2: Duración del segundo ciclo celular ($t_4 - t_2$).
 - ECC2a: $t_3 - t_2$.
 - ECC2b: $t_4 - t_2$.
- ECC3: Duración del tercer ciclo celular ($t_8 - t_4$).
 - ECC3a: $t_4 - t_8$.
 - ECC3b: $t_5 - t_8$.
 - ECC3c: $t_6 - t_8$.
 - ECC3d: $t_7 - t_8$.
- S2: Sincronización de las divisiones celulares ($t_4 - t_3$).
- S3: Sincronización del patrón de división ($t_8 - t_5$).

2.5. Transferencia embrionaria

La selección de los embriones a transferir se realizó en base a: tiempos de morfocinética (Meseguer et al., 2011; Basile et al., 2013), clasificación de ASEBIR (embriones tipo A, B, C y D) y ausencia de criterios de exclusión (división directa de cigoto a 3 células, división directa de 3 a 5 células, multinucleación en 2, 3 y 4 células, falsa división y presencia de vacuolas).

La transferencia embrionaria en fresco se realizó el segundo o tercer día (D+2 o D+3) tras la punción folicular. La transferencia embrionaria se lleva a cabo por ecoguía a través del cuello uterino, mediante catéter de transferencia (Labotect Labor-Technik-Göttingen, Göttingen, Germany) en el que se cargaron 1 o 2 embriones.

2.6. Ciclos de criotransferencia

Los embriones sobrantes fueron crioconservados en D+3 mediante vitrificación. Se utilizaron medios comerciales de vitrificación (Medicult Vitrification, Denmark) y desvitrificación (Medicult Vitrification Thaw, Denmark). El dispositivo de almacenamiento utilizado fue el Cryoleaf (McGill Cryoleaf, Origio, Denmark). Todos los embriones crioconservados se almacenaron en nitrógeno líquido a -196°C en bombonas de almacenamiento (Air Liquide, Francia).

Protocolo de vitrificación

Los embriones se vitrificaron mediante los medios de equilibrado y vitrificación de MediCult Vitrification que contienen etilen-glicol y 1,2-propandiol en HTF, en concentraciones crecientes.

En primer lugar se atempera el Equilibration Medium (EQ) y Vitrification Medium (VT) durante 30 minutos. Una vez atemperados podemos depositar una microgota de EQ (100 μl) y otra de VT (100 μl) en una placa de petri mediana (Falcon®). Éstas deben quedar visualmente cerca bajo la lupa. Además se añaden 2 microgotas de medio de lavado MOPS de 100 μl /microgota. El embrión a vitrificar se lava en las dos gotas de MOPS y se depositan en la gota de EQ durante al menos 6 minutos con la lupa apagada. Transcurridos los 6 min el embrión debe haberse reexpandido al 80%, momento en el que se deposita en la gota de VT (100 μl). Se carga el embrión en el capilar y se deposita en el extremo de la lengüeta del Cryoleaf (previamente identificado con el código de la paciente) con el mínimo medio posible. Este paso debe durar el menor tiempo posible, nunca más de 1 minuto. Rápidamente se sumerge el Cryoleaf en el contenedor de nitrógeno líquido y se agita vigorosamente en zig-zag, con cuidado de no tocar con la lengüeta el fondo del barreño. Seguidamente, y antes de que se congele el Cryoleaf, se baja el pestillo de seguridad del mismo. Con ayuda de la pinzas se introduce el Cryoleaf en el visotubo, previamente sumergido en el contenedor de N₂ líquido, con las pinzas asegurándose de que no flote y se pasa a un termo para ser transportado al contenedor de nitrógeno líquido.

Protocolo de desvitrificación

Para la desvitrificación embrionaria utilizamos los medios MediCult Vitrification Thaw que incluye un medio de descongelación con sacarosa listo para usar (Warming), medios de disolución 1 & 2, ambos con decrecientes concentraciones de sacarosa y dos viales para lavar el medio con HSA.

La desvitrificación embrionaria se realiza el día anterior a la criotransferencia. Para ello, se calientan los medios, Warming Medium a 37°C y Dilution Medium 1, Dilution Medium 2 y Washing Medium a temperatura ambiente durante una hora. Se prepara un depósito con suficiente nitrógeno líquido como para poder sumergir por completo el visotubo con el Cryoleaf dentro. Se extrae el Cryoleaf del visotubo y se deja en el fondo, sacamos el visotubo y comprobamos la identidad. En placas de Petri medianas se deposita una microgota de 100 µl de DM1 y una microgota de 200 µl de Warming medium en otra placa de petri. Es muy importante que éste medio esté a 37 °C durante todo el proceso, por lo que se dispone sobre una placa termocalefactada. Posteriormente se saca el Cryoleaf del barreño de nitrógeno líquido con la cara del embrión mirando hacia arriba y se sumerge rápidamente en la microgota de Warming medium. Rescatamos el embrión y lo llevamos a la gota de DM1 donde se esperan 3 min. En este tiempo se deposita al lado de esta microgota la de DM2, donde se depositará el embrión posteriormente durante 3 minutos. Durante este tiempo depositamos en esta placa 4 microgotas de 50 µl de Washing medium. Una vez transcurridos los 3 minutos se rescata el embrión de DM2 y se lava progresivamente de una gota a otra de dicho medio. En una placa de petri se realizan 4 microgotas de 50 µl de medio de cultivo embrionario G2 previamente gasificado.

Cargamos G2 de una microgota y lavamos progresivamente de una gota a otra de dicho medio. Al finalizar se lava el embrión en medio G2, dejándolos en cultivo, 37°C y 6%CO₂, hasta el día siguiente, previa valoración de la calidad embrionaria y de la criosupervivencia (porcentaje de células lisadas), en caso de que la supervivencia sea $\geq 50\%$ de las blastómeras. El día de la criotransferencia (D+4) se valora de nuevo la calidad embrionaria, haciendo hincapié en la división embrionaria. La criotransferencia se realiza de la misma manera que la transferencia en fresco.

Protocolo de sustitución para Criotransferencia

El día de la menstruación se inicia pauta ascendente con Valerianato de estradiol (Meriestra®, Noveartis Farmaceutica, España), administrándose 2mg/24h durante 8 días, después durante 3 días (9-11 del ciclo) se administra 2mg/12h y a partir del día 12 se aumenta a 2mg/8h. Se realizan revisiones ecográficas a los 14 días de iniciar el tratamiento para valorar el endometrio y cuando el espesor es ≥ 7 mm de espesor, se indica para criotransferencia. Además se administra tres días antes de la criotransferencia progesterona natural micronizada vía vaginal 200mg/8h (Progeffik®, Laboratorios EFFIK, España).

2.7. Evaluación de la gestación

La gestación fue confirmada a los 15 días tras la transferencia embrionaria, el embarazo clínico se definió como la presencia de un saco gestacional con latido cardiaco a las 7 semanas por ecografía de ultrasonidos y el embarazo evolutivo se determinó a las 12 semanas de gestación.

3. Resultados obstétricos y neonatales en ciclos de ICSI realizados con pentoxifilina para identificar espermatozoides viables

3.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio multicéntrico observacional de cohorte retrospectivo para analizar la evolución y resultados de los embarazos obtenidos tras ciclos de ICSI con pentoxifilina (ICSI-PTX). Se incluyeron parejas de cuatro unidades de reproducción humana asistida distintas: Complejo Hospitalario Universitario de Granada (Granada, España), Clínica Masvida - CEIFER Biobanco (Sevilla, España), Infertility Unit (Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Milán, Italia) y Centro Scienze Natalità (IRCCS San Raffaele Hospital, Milán, Italia), entre Enero de 2005 y Diciembre de 2015.

A todas las parejas se les solicitó, de manera rutinaria, un consentimiento informado para que sus datos fueran utilizados con fines de investigación. El estudio fue aprobado por el comité de ética del IRCCS San Raffaele Hospital, Milán, Italia.

3.2. Selección de pacientes

Parejas cuyo varón presenta únicamente espermatozoides inmóviles, en muestras procedentes de eyaculado o testículo. Se excluyeron del estudio ciclos de donación de ovocitos y edad materna avanzada (mayor a 45 años).

Los tratamientos de infertilidad, que incluyen la estimulación hormonal, recuperación de ovocitos, congelación de ovocitos, cultivo embrionario, vitrificación y desvitrificación embrionaria y métodos de transferencia se llevaron a cabo de manera estándar siguiendo los protocolos de cada centro.

3.3. Preparación de las muestras con pentoxifilina

La solución de pentoxifilina (Trental, Sanofi, Origgio, Italy o Hemovàs, Ferrer, Barcelona, Spain) se preparó a una concentración de 3 o 5 mmol en un medio tamponado con HEPES y fue almacenada a una temperatura de -20°C. Tras la centrifugación de la muestra de semen, se tomó un volumen de 1 o 2 µl de espermatozoides lavados y se les añadió 5 µl de solución de pentoxifilina en una placa de Petri diseñada para realizar la ICSI, cubierta con aceite mineral precalentado. La muestra fue incubada durante un intervalo de 10 a 20 minutos a 37°C. Posteriormente, en un microscopio invertido, se seleccionaron los espermatozoides móviles para microinyección. Estos fueron aspirados con una micropipeta de ICSI y lavados en una gota de PVP.

3.4. Transferencia embrionaria

Los embriones resultantes fueron transferidos en fresco entre el D+2 y D+6 del cultivo embrionario. Los embriones descritoconservados se transfirieron entre 3 y 5 días de inicio de la administración de progesterona.

3.5. Evaluación y seguimiento de la gestación

En el análisis se incluyeron los embarazos clínicos obtenidos tras la transferencia tanto de embriones procedentes de ciclos en fresco como de embriones desvitrificados.

Para confirmar el embarazo se usó la determinación de la hCG dos semanas después de la transferencia embrionaria. El embarazo clínico se definió como la presencia de saco gestacional con actividad cardíaca tras 7 semanas. El nacimiento se definió como el parto tras 22 semanas de gestación completas. La muerte fetal fue definida como la muerte en ≥ 22 semanas completas de gestación.

De acuerdo con la rutina clínica, se realizó un seguimiento activo y pasivo de todos los resultados de la gestación a todas las mujeres embarazadas. Tras un periodo de uno a tres meses después del parto, se les hizo un seguimiento telefónico. En caso de no tenerlo realizado se contactó durante el periodo de análisis de los datos (2015). Posteriormente se analizaron todos los datos con el fin de obtener los resultados obstétricos y neonatales.

3.6. Malformaciones neonatales

Las malformaciones neonatales fueron clasificadas de acuerdo a la ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision, 2010) que incluye malformaciones congénitas y anomalías cromosómicas con una gama de codificación Q00-Q99.

4. Análisis estadístico

Se utilizó el software IBM SPSS Statistics versión 19 (Chicago, IL., EE.UU.)

4.1. Efecto de la monoterapia con Darunavir/Ritonavir sobre la calidad y carga viral seminal

Debida a la falta de información en la literatura consultada en cuanto a la calidad del semen en este tipo de pacientes, no se determinó un tamaño muestral mínimo a reclutar. Se incluyó en el estudio a todos los pacientes que cumplían los criterios de inclusión, durante el periodo de estudio y aceptaron participar.

Se siguieron las recomendaciones internacionales para el diseño y evaluación de estudios de calidad seminal (SEMQUA) (Sánchez-Pozo et al., 2013). Se realizó un análisis descriptivo sobre las principales variables recogidas. Para las variables cuantitativas, se utilizó la mediana y primer y tercer cuartil. En caso de distribución normal de los datos se usó la prueba t de

Student y en los casos donde no seguían una distribución normal se realizó la prueba de Wilcoxon. Para las variables cualitativas, se calcularon frecuencias absolutas y relativas. Las diferencias entre los valores pre y post monoterapia y la relación con la calidad seminal se evaluaron mediante la prueba McNemar. La concentración y número total de espermatozoides presentó una distribución no normal (no Gausiana), por lo que fueron transformados mediante log para aproximarse a una distribución normal. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

4.2. Evaluación de la calidad embrionaria en parejas con varón VIH⁺

Para el objetivo de contraste de la hipótesis nula que recoge la igualdad de velocidad de desarrollo embrionario en el grupo de embriones procedentes de varones VIH⁻ y VIH⁺, se realizó una prueba de t de Student para dos muestras independientes (potencia del 80% y nivel de significación del 5%), y asumiendo que el tiempo medio de desarrollo a t4 es 39 h en los VIH⁻ y de 42h en los VIH⁺ con una desviación estándar de 5h (Cruz et al., 2012) será necesario incluir 44 embriones en cada grupo, totalizando 88 unidades experimentales en el estudio.

Las variables cualitativas se describen mediante su valor absoluto (n) y valor relativo (%). Para su comparación se utilizó el Test de la Chi-Cuadrado. El tamaño del efecto se estimó mediante el calculado de la Odds Ratio y su intervalo de confianza al 95%.

Las variables cuantitativas se describen mediante media, desviación estándar y máximo y mínimo. Para la comparación de ambos grupos se realizó una t de Student para grupos independientes, comprobándose la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. En el caso de ser significativo se realizaba el test de Welch, y si el test de Levene resultaba no significativo se calculaba la t de Student clásica.

El tamaño del efecto se calculó mediante la diferencia de medias y su intervalo de confianza al 95%.

Dado el elevado número de comparaciones se aplicó la corrección de Bonferroni asumiendo como significativas solo aquellas que lo fueran por debajo de un $p < (0,05/n^{\circ}$ de comparaciones).

4.3. Resultados obstétricos y neonatales en ciclos de ICSI realizados con pentoxifilina para identificar espermatozoides viables

La tasa de malformaciones neonatales en recién nacidos vivos tras ICSI-PTX se calculó como el número de nacidos vivos afectados dividido entre el número total de nacidos vivos.

La tasa de malformación total se obtuvo de la siguiente fórmula: (recién nacidos afectados + mortinatos + abortos inducidos por malformación) dividido entre (número total de gestaciones clínicas) (Guía de EUROCAT 1.4 y los documentos de referencia, 2013).

Todas las tasas obtenidas fueron comparadas con los datos publicados anteriormente de niños concebidos mediante ICSI con una frecuencia de anomalías según el ICD-10 = 4,4% (114/2612) (Bonduelle et al., 2002).

Esta incidencia se utilizó para calcular el intervalo de confianza previsto para toda la cohorte de niños nacidos mediante ICSI-PTX. Se estimó un tamaño muestral de 100 recién nacidos para demostrar una frecuencia dos veces más alta en malformaciones neonatales (proporción de anomalías ICD-10) en el grupo de ICSI-PTX, en comparación con los datos publicados anteriormente por Bonduelle et al., 2002 (errores tipo I y II en 0,05 y 0,20, respectivamente).

Las variables categóricas se presentan como frecuencia absoluta y relativa, y se calculó el intervalo de confianza del 95% de la frecuencia relativa. Se compararon mediante el test exacto de Fisher. Las variables cuantitativas se describen mediante media y DS, y se compararon mediante t de Student.

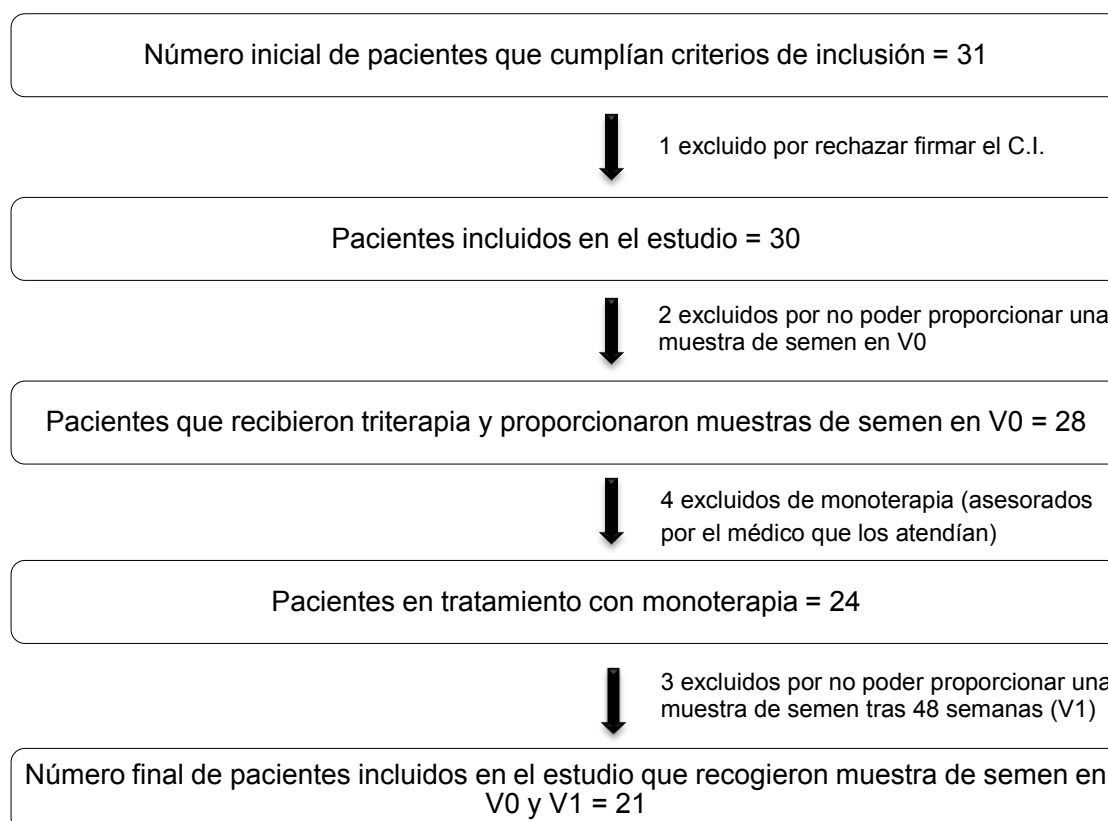
RESULTADOS

1. Efecto de la monoterapia con Darunavir/Ritonavir sobre la calidad y carga viral seminal

1.1. Selección de pacientes

De los 31 pacientes seleccionados inicialmente, se excluyeron 3 (uno rechazó firmar el consentimiento y dos no pudieron recoger la muestra de semen). De los 28 pacientes restantes, 4 no alcanzaron la fase de monoterapia (por criterio del médico que lo atendía), aunque si proporcionaron muestras de semen en la fase basal del estudio (V0). Otros 3 pacientes, no recogieron muestras de semen tras 48 semanas de tratamiento con monoterapia (V1). Por tanto, 21 pacientes completaron el seguimiento tras las 48 semanas de tratamiento con monoterapia (Figura 24).

FIGURA 24: Diagrama de flujo de los pacientes participantes en el estudio de monoterapia con DRV/r sobre calidad seminal y carga viral seminal.



1.2. Características sociodemográficas, clínicas y de laboratorio

De los 28 pacientes que recogieron muestra de semen en V0, incluidos en el estudio, la media de edad fue de $41 \pm 9,3$ años, la prevalencia de consumo de alcohol y tabaco fue del 61,9% y 66,7%, respectivamente. El 19% de los pacientes presentaba descendencia. Por otro lado, el valor medio de $CD4^+$ en V0 fue de 659 células/mm^3 (rango: $230 - 1242 \text{ células/mm}^3$) y en V1 fue de 641 células/mm^3 (rango: $532 - 1198 \text{ células/mm}^3$). El valor medio de $CD4^+$ nadir de su historia clínica fue de 270 células/mm^3 (rango: $10 - 634 \text{ células/mm}^3$). El tratamiento con antirretrovirales en la fase basal (V0) se resume en la Tabla 5.

TABLA 5. Esquema de la terapia antiretroviral en V0 tanto en pacientes que proporcionaron muestra en V0 (28 pacientes), como los que lo hicieron en V1 (21 pacientes).

Tipo de tratamiento inicial	Tratamiento inicial: Pacientes V0	Tratamiento inicial: Pacientes V1
TNF + FTC + efavirenz	12 ^a	10
TNF + FTC + etravirine	1	-
TNF + FTC + raltegravir	2	2
TNF + FTC + DRN/r	3	2
TNF + FTC + atazanavir	1	1
TNF + FTC + nevirapine	1	-
TNF + FTC + atazanavir/r	2	2
ABC + 3TC + atazanavir/r	1	1
ABC + 3TC + DRV/r	3	2
ABC + 3TC + Lopinavir/r	2	1
Total	28	21

^a Los números representan el número de pacientes para cada tipo de tratamiento inicial antes de la monoterapia. TNF: tenofovir; FTC: emtricitabina; DRN/r: darunavir/ritonavir; ABC: abacavir; 3TC: lamivudina.

1.3. Características de parámetros seminales

Los datos sobre la calidad del semen de los pacientes en tratamiento antirretroviral en la fase basal del estudio (V0) y tras 48 semanas de tratamiento con monoterapia (V1) se resumen en la Tabla 2 y 3. Sólo 16 de las 28 muestras analizadas en V0 (57,1%) presentaron valores más altos que el límite inferior de los valores de referencia de la OMS 2010. Las alteraciones observadas con mayor frecuencia fueron oligozoospermia y teratozoospermia. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de pacientes con valores seminales superiores al límite inferior de referencia de la OMS 2010 entre V0 y V1. Como muestra la tabla 3 no hubo diferencias significativas entre los parámetros seminales en V0 y V1 (Figuras 25-30). Todos los MarTest realizados, en V0 y V1, resultaron negativos.

TABLA 6. Calidad seminal en pacientes que reciben terapia antirretroviral y monoterapia con DRV/r.

Calidad seminal: ART	V0 (n=28)		V1 (n=21)		p
	n	%	n	%	
Normal	16	(57,1)	13	(61,9)	P=0,755
Oligoteratozoospermia	2	(7,1)	2	(9,6)	
Oligoastenozoospermia	2	(7,1)	1	(4,8)	
Oligoteratoasterozoospermia	3	(10,7)	1	(4,8)	
Teratozoospermia	4	(14,3)	1	(4,8)	
Astenozoospermia	0	(0)	2	(9,6)	
Oligozoospermia	1	(3,6)	1	(4,8)	

TABLA 7. Valores del seminograma de los 21 pacientes que completaron el estudio.

	V0		V1		p
	^a Mediana (Q1 – Q3)	Rango	^b Mediana (Q1 – Q3)	Rango	
Volumen (mL)	2,3	1,5 - 3,4	1,9	1,5 - 3,4	0,15
pH	7,5	7,2 - 7,5	7,5	7,2 - 7,7	0,98
Concentración (x10⁶/mL)	59	20,5 - 141,5	39	14 - 109,5	0,07
Células redondas	3	1 - 8	2	1,2 - 3,8	0,18
Número total de espermatozoides (x10⁶)	154	42 - 319,5	132	31,8 - 259,5	0,12
Motilidad progresiva (%)	45	32,5 - 62,5	52,5	40 - 65	0,75
Motilidad total (%)	60	42 - 70	60	45 - 70,9	0,66
Morfología	5	3 - 6	4	4 - 7,5	0,39
Vitalidad	88	79,5 - 90,5	86,5	80,5 - 90,8	0,18
Índice de teratozoospermia	1,3	1,2 - 1,4	1,3	1,2 - 1,4	0,95

^a Media de los valores entre las dos muestras analizadas en V0.

^b Media de los valores entre las dos muestras analizadas en V1.

* (Máximo – mínimo)

FIGURA 25: Concentración de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$) en V0 y V1 de los 21 pacientes incluidos en el estudio.

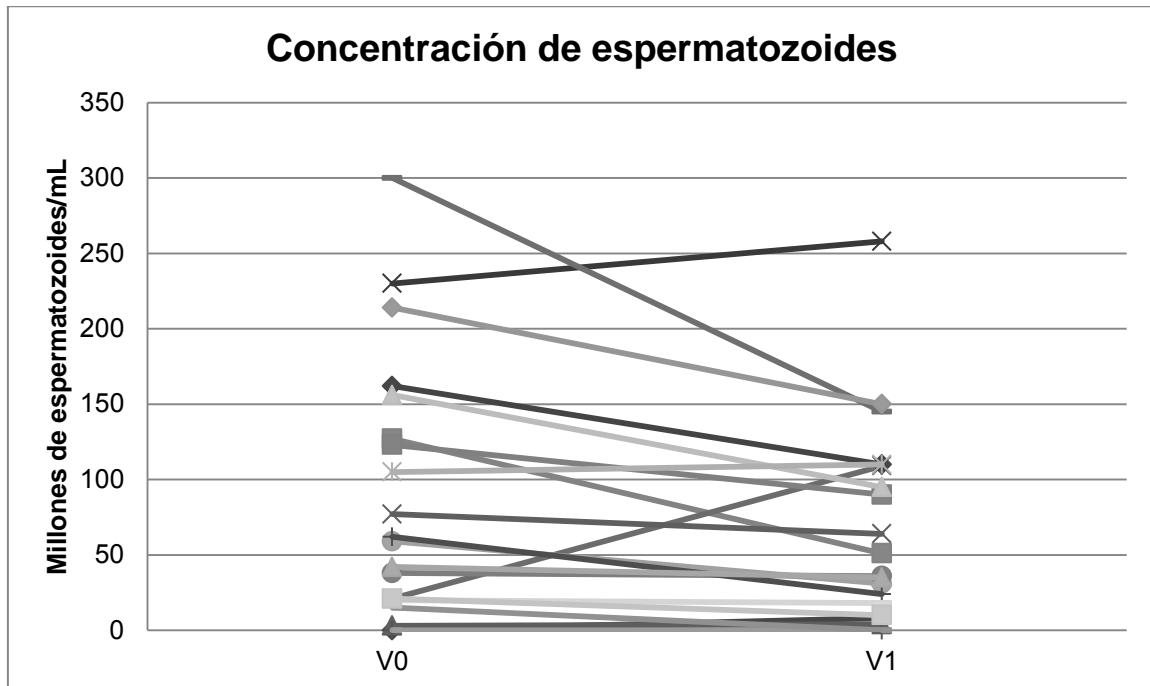


FIGURA 26: Volumen de semen (mL) en V0 y V1 de los 21 pacientes incluidos en el estudio.

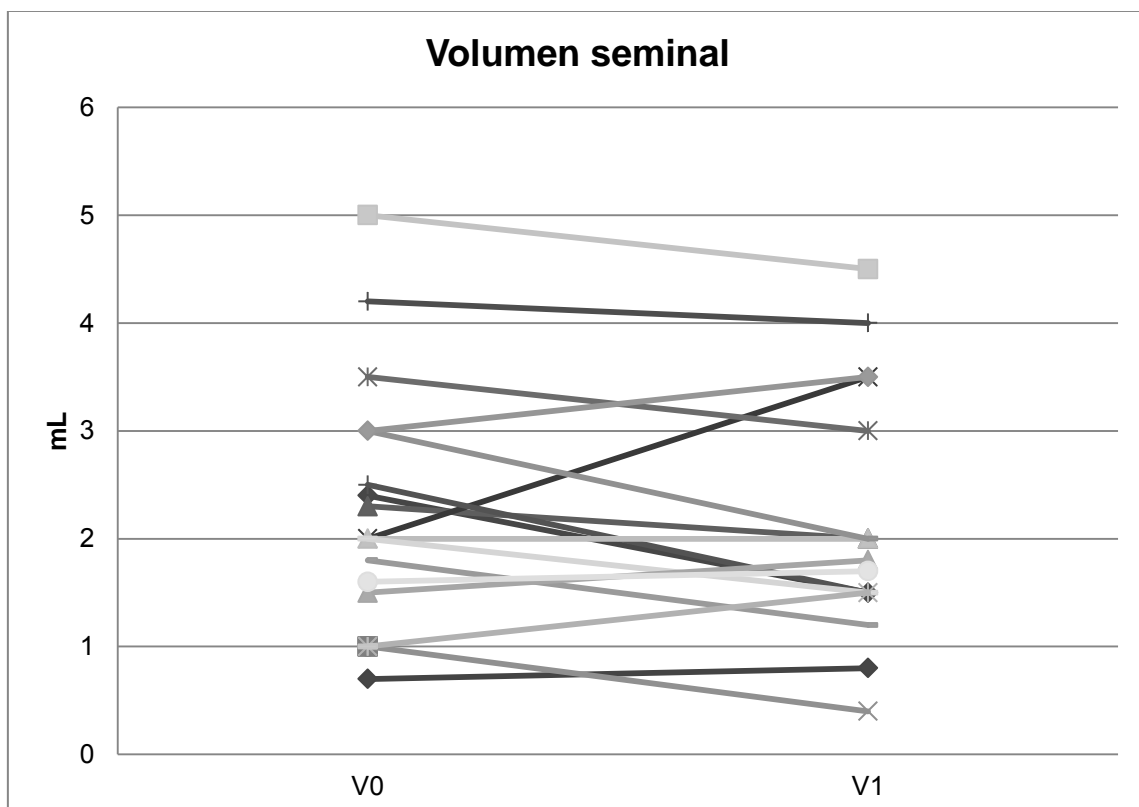


FIGURA 27: Número total de espermatozoides en el eyaculado en V0 y V1 de los 21 pacientes incluidos en el estudio.

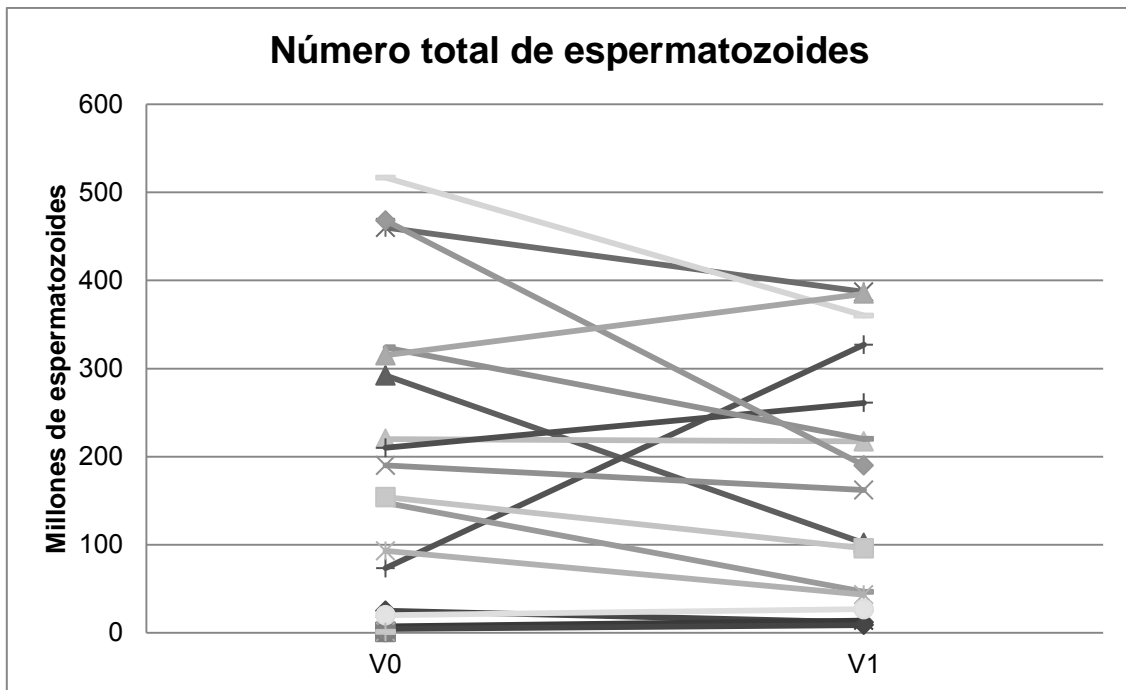


FIGURA 28: Movilidad total de espermatozoides en V0 y V1 de los 21 pacientes incluidos en el estudio.

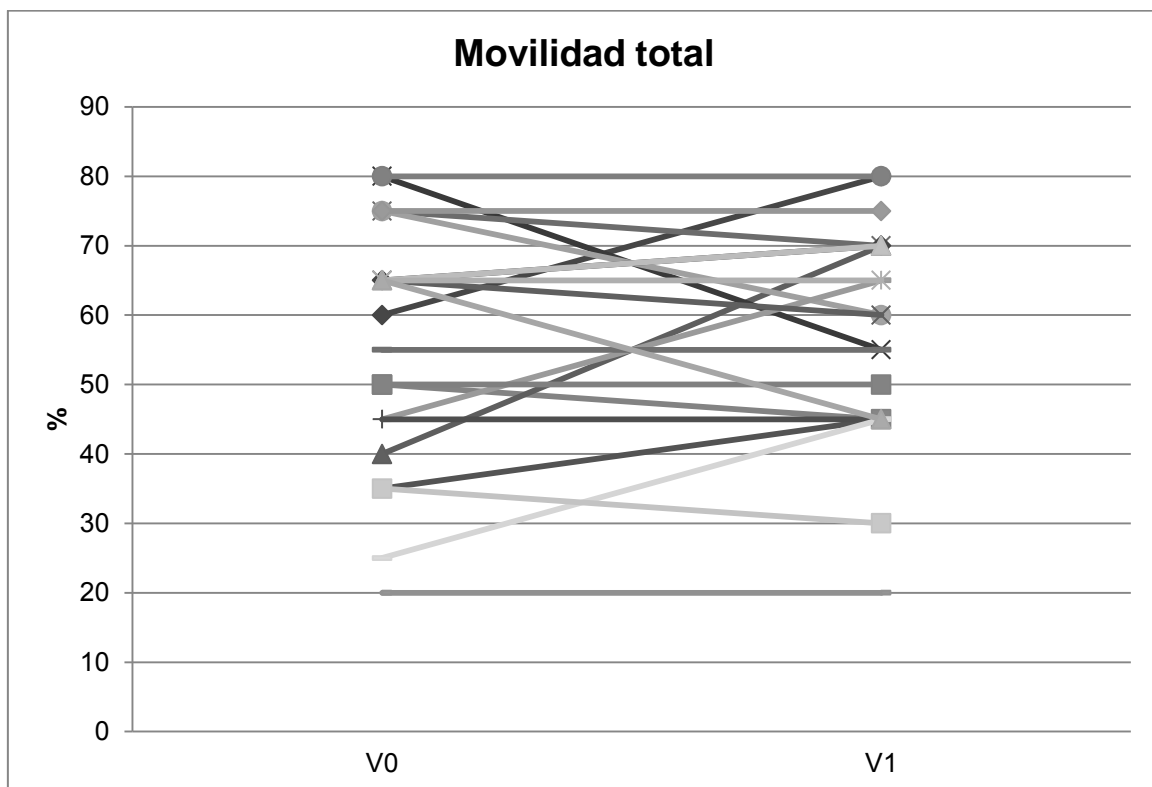


FIGURA 29: Morfología en V0 y V1 de los 21 pacientes incluidos en el estudio.

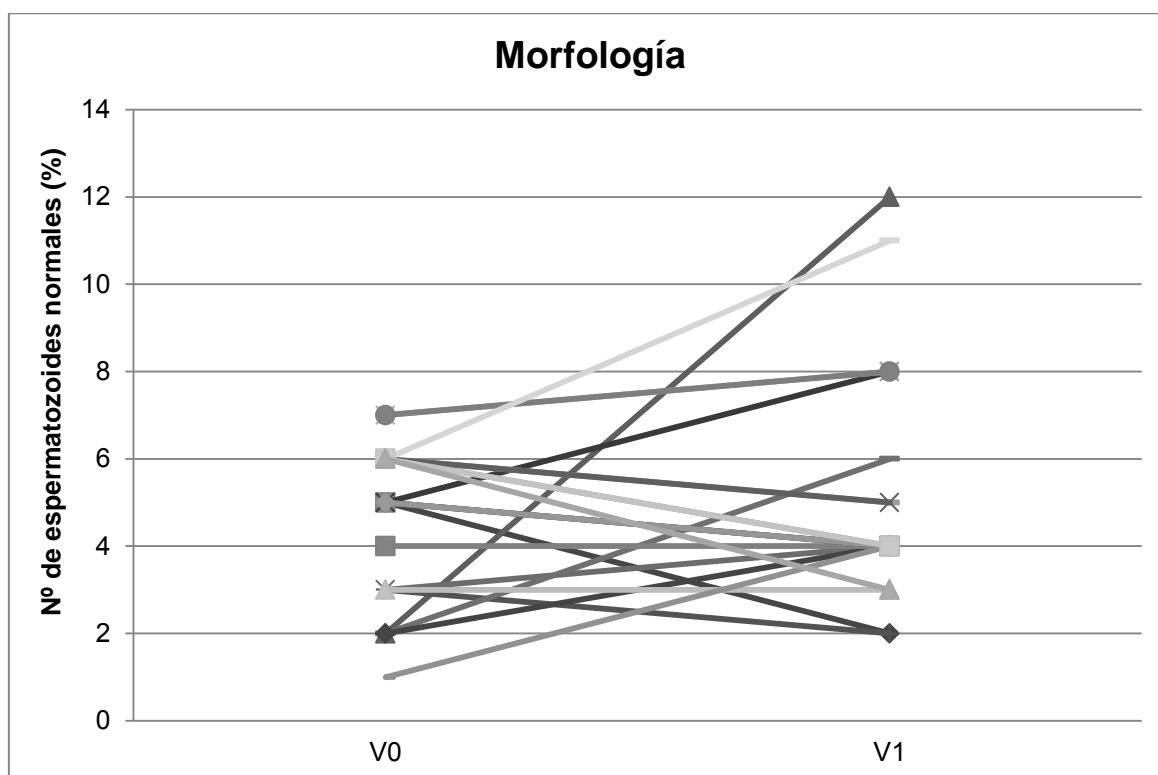
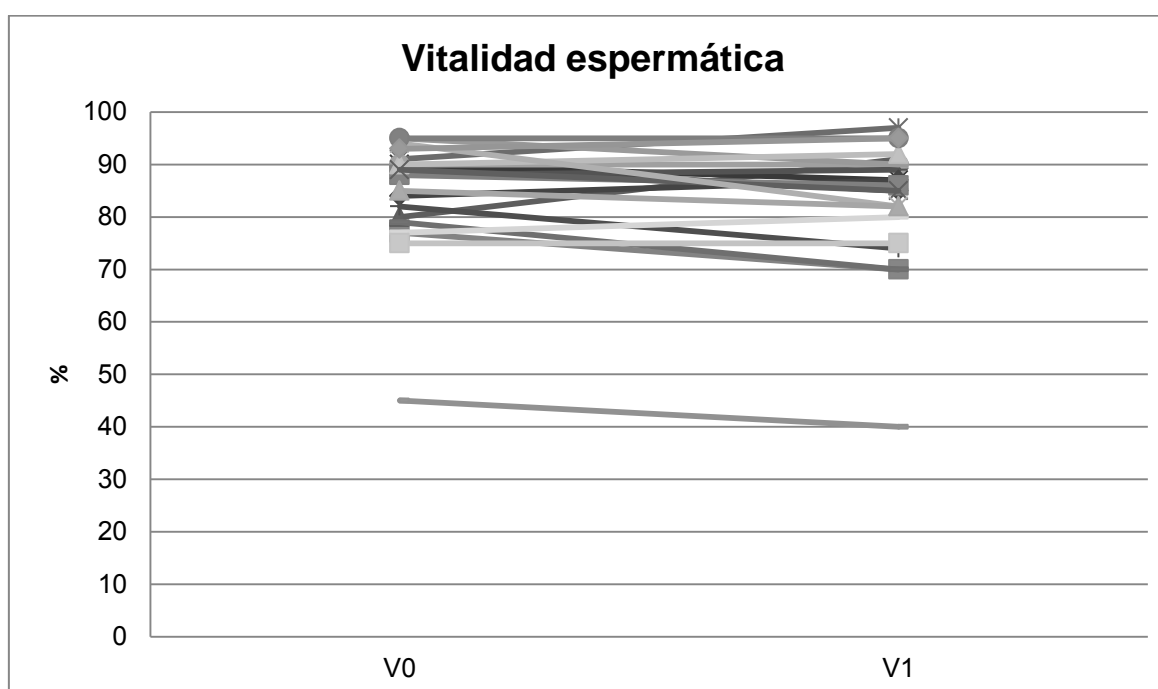


FIGURA 30: Vitalidad espermática en V0 y V1 de los 21 pacientes incluidos en el estudio.



1.4. Detección de carga viral en plasma seminal

La determinación de VIH por PCR en el plasma seminal fue analizada en las **primeras** 27 muestras de V0 proporcionadas por 28 pacientes (una no fue procesada debido a la inhibición de la PCR); cuatro de ellas (15%) fueron positivas (> 20 copias/mL), con un rango de 35 – 1210 copias/mL. La segunda determinación de VIH-PCR en plasma seminal de la **segunda** muestra de semen en V0 se realizó a 22 muestras de 28 pacientes (seis no tuvieron resultado debido a la inhibición de la PCR); una de ellas (5%) fue positiva con 399 copias/mL. En total en V0, 5 de las 49 muestras (10%) presentaron carga viral positiva en el plasma seminal.

En la primera muestra de líquido seminal en V1, sólo 1 de 17 pacientes (6%) tuvieron una carga viral positiva (139 copias/mL). No se obtuvieron resultados de 4 pacientes debido a la inhibición de la PCR. Con respecto a la segunda muestra de semen aportada en V1, ninguno de los 15 pacientes analizados presentó carga viral positiva (de los 21 pacientes, no se obtuvieron resultados de 6, debido a la inhibición de la PCR). De las 32 muestras analizadas con resultado en pacientes con monoterapia, solo una (3%) fue positiva. Este paciente también obtuvo carga viral positiva en V0. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,39$) en el porcentaje de muestras de semen con carga viral positiva en triterapia y monoterapia (10% frente 3%) (Tabla 4).

TABLA 8. Detección de la carga viral en plasma seminal en la 1ª y 2ª muestra de V0 y V1.

	V0		V1	
	(%)	n	(%)	n
1ª Muestra de semen	15%	4/27	6%	1/17
2ª Muestra de semen	5%	1/22	0%	0/15
Total	10%	5/49	3%	1/32

NS

2. Evaluación de la calidad embrionaria en parejas con varón VIH⁺

Se seleccionaron un total de 15 ciclos de FIV/ICSI en el grupo de estudio, correspondientes a 11 pacientes. En el grupo control se seleccionaron 15 ciclos, correspondientes a 15 pacientes, con características clínicas similares. La edad media, el IMC y la FSH basal de las mujeres fue similar en ambos grupos, sin embargo, la edad media de los varones VIH⁺ fue significativamente mayor, como se puede observar en la Tabla 9.

TABLA 9. Características descriptivas de las parejas con varón VIH⁻ y VIH⁺.

	CONTROL VIH ⁻ (n=15)				ESTUDIO VIH ⁺ (n=15)				Media de las diferencias (95% CI)
	Media	±	SD	Rango	Media	±	SD	Rango	
Edad Mujer	33,4	±	2,8	28 - 39	34,2	±	4,7	27 - 40	-0,8 (-3,69 ; 2,09)
Edad Hombre	35,0	±	4,4	28 - 47	41,3	±	3,6	34 - 49	-6,3 (-9,31 ; -3,29)
IMC	24,1	±	3,5	18,2 - 31,5	24,9	±	5,3	19 - 36,7	-0,8 (-4,16 ; 2,56)
FSH basal	6,7	±	1,6	3,1 - 9,1	5,8	±	2,2	2,8 - 9,1	0,9 (-0,54 ; 2,34)

2.1. Resultados de estimulación ovárica e ICSI en parejas VIH⁻ y VIH⁺

En la Tabla 10 están reflejados los resultados de la estimulación ovárica en ambos grupos. El protocolo de estimulación más utilizado fue el de Análogo de la GnRH. No se observaron diferencias en los protocolos utilizados entre ambos grupos. La dosis total empleada de FSH en el grupo VIH⁺ fue significativamente inferior, mientras que los días de estimulación y el número de ovocitos obtenidos, fueron similares en ambos grupos.

TABLA 10. Resultados de la estimulación ovárica de parejas VIH⁻ y VIH⁺.

	CONTROL VIH ⁻ (n=15)			ESTUDIO VIH ⁺ (n=15)			Media de las diferencias (95% CI)
	Media	± SD	Rango	Media	± SD		
Dosis total FSH	2488	± 620	1700 - 3900	1993	± 560	1150 - 3150	495 (53,07 ; 936,93)
Días de estimulación	11,1	± 1,2	10 - 15	10,5	± 1,9	8 - 15	0,6 (-0,59 ; 1,79)
Número de ovocitos obtenidos	10,1	± 3,6	3 - 15	8,7	± 4,7	3 - 20	1,4 (-1,73 ; 4,53)
Protocolo estimulación							
▪ Análogo GnRH			9 (60%)			9 (60%)	
▪ Antagonista GnRH			6 (40%)			6 (40%)	

No hubo diferencias en cuanto al número de ovocitos obtenidos, número de ovocitos en metafase II, número de embriones disponibles de buena calidad (según la clasificación ASEBIR), ni número de embriones transferidos en ambos grupos. Se obtuvo un número significativamente menor de ovocitos fecundados en el grupo VIH⁺ ($3,2 \pm 2,1$) frente al grupo VIH⁻ ($5,7 \pm 3,1$), así como menor número de embriones crioconservados en varones VIH⁺ ($0,4 \pm 0,7$ vs $2 \pm 2,1$; $p < 0,05$) (Tabla 11).

TABLA 11. Resultados de laboratorio.

	CONTROL VIH ⁻ (n=15)			ESTUDIO VIH ⁺ (n=15)			OR (95% CI)	Media de las diferencias (95% CI)
	Media	± SD	Rango	Media	± SD	Rango		
Número de ovocitos MII	8,6	± 3	3 - 15	6,5	± 2,7	3 - 11		2,1 (-0,03 ; 4,23)
Porcentaje de ovocitos MII	86,8	± 11,6	60 - 100	81,8	± 18,3	50 - 100	1,06 (0,70 ; 1,60)	
Número de ovocitos fecundados	5,7	± 3,1	1 - 12	3,2	± 2,1	0 - 6		2,5 (0,55 ; 4,45)
Porcentaje de ovocitos fecundados	66,4	± 25,4	11,1 - 100	51,8	± 27,1	0 - 100	0,54 (0,30 ; 0,96)	
Calidad embrionaria								
▪ % Tipo A	28,4	± 31,6		21,9	± 30,2		0,71 (0,37 ; 1,34)	
▪ % Tipo B	10,5	± 15		19,5	± 29,8		2,06 (0,92 ; 4,63)	
▪ % Tipo C	29,4	± 19		35,5	± 22,6		1,31 (0,72 ; 2,37)	
▪ % Tipo D	31,6	± 25,3		23,1	± 29,9		0,65 (0,34 ; 1,21)	
Día de la transferencia								
▪ D+2	4	(26,7%)		7	(50%)			
▪ D+3	11	(73,3%)		7	(50%)			
Tasa de transferencia única	4	(26,6%)		2	(14,2%)		0,45 (0,06 ; 3,01)	
Número de embriones transferidos	1,73	± 0,45		1,86	± 0,36			-0,13 (-0,44 ; 0,18)
Número de embriones crioconservados	2	± 2,1	0 - 7	0,4	± 0,7	0 - 2		1,6 (0,42 ; 2,78)
Porcentaje de embriones crioconservados	28,2	± 28,1		7,3	± 13,6		0,2 (0,08 ; 0,47)	

2.2. Evaluación embrionaria mediante análisis de time-lapse. Parámetros morfocinéticos directos e indirectos.

Se analizaron un total de 71 embriones procedentes de varones VIH⁻ y 49 procedentes de varones VIH⁺ mediante tecnología time-lapse. El análisis comparativo de las variables morfocinéticas directas (utilizando como t0 el tiempo medio de la ICSI) e indirectas mostró unos resultados similares entre los dos grupos (Tablas 12 y 13).

TABLA 12. Variables morfocinéticas directas.

	CONTROL VIH ⁻ (n=71)			ESTUDIO VIH ⁺ (n=49)			Media de las diferencias (95% CI)
	Media	± SD	Rango	Media	± SD	Rango	
tPB2	4,3	± 1,8	1,4 - 11,3	4,4	± 1,8	1,4 - 10,1	-0,08 (-0,63 ; 0,47)
tPNa	9,8	± 2,7	5,2 - 18,1	10,4	± 4,5	6,5 - 28,9	-0,63 (-1,92 ; 0,66)
tPNf	25,1	± 4	17,2 - 35,5	26,1	± 4,2	17,3 - 38,6	-0,94 (-2,44 ; 0,56)
it2	27,2	± 4,1	19,5 - 38,0	28,4	± 4,2	21,6 - 40,9	-0,86 (-2,40 ; 0,68)
t2	28,3	± 4,1	19,9 - 38,1	29,3	± 4,4	21,9 - 41,8	-1,08 (-2,65 ; 0,49)
t3	38,8	± 5,2	25,9 - 50,8	40,7	± 5,4	29,3 - 53,5	-2,02 (-4,05 ; 0,01)
t4	41,8	± 5,7	31,1 - 55,7	43,6	± 6,4	31,1 - 60,9	-1,83 (-4,16 ; 0,50)
t5	51,3	± 7,9	34,4 - 64,3	52,1	± 6,8	39,9 - 65,3	-0,8 (-4,08 ; 2,48)
t6	55,5	± 6,1	40,9 - 68,1	58,1	± 7,1	46,9 - 71,5	-2,64 (-5,69 ; 0,41)
t7	57,3	± 6,5	41,5 - 68,5	56,8	± 5,3	47,9 - 64,2	0,48 (-3,15 ; 4,11)
t8	60,6	± 6,1	47,1 - 68,2	60,7	± 3,7	56,2 - 65,7	-0,2 (-4,31 ; 3,91)

NS

TABLA 13. Variables morfocinéticas indirectas.

	CONTROL VIH ⁻ (n=71)			ESTUDIO VIH ⁺ (n=49)			Media de las diferencias (95% CI)
	Media	± SD	Rango	Media	± SD	Rango	
VP	15,4	± 4,4	5,3 - 26	15,6	± 4,2	7,8 - 24,3	-0,22 (-1,80 ; 1,36)
ECC1	23,9	± 4,1	17,4 - 36,4	24,9	± 4,2	16,6 - 33,9	-1 (-2,53 ; 0,53)
ECC2	13,9	± 4,8	1,8 - 28,4	14,2	± 4,8	2,4 - 32,8	-0,39 (-2,25 ; 1,47)
ECC2a	10,2	± 4,6	0,3 - 19,9	11,2	± 3,6	0,7 - 19,9	-0,98 (-2,61 ; 0,65)
ECC2b	13,9	± 4,8	1,8 - 28,4	14,2	± 4,8	2,4 - 32,8	-0,39 (-2,25 ; 1,47)
ECC3	22,4	± 6,3	13,4 - 35,6	20,4	± 4,3	16,1 - 28,5	2,04 (-2,28 ; 6,36)
ECC3a	10,1	± 6,1	0,3 - 21,2	9,2	± 5,9	0,3 - 16,7	0,92 (-1,71 ; 3,55)
ECC3b	14,4	± 4,4	3,1 - 21,1	15	± 3,6	5,3 - 21,1	-0,62 (-2,57 ; 1,33)
ECC3c	17,2	± 4,9	9,7 - 30,3	17,3	± 3,6	12,2 - 23,6	-0,02 (-2,69 ; 2,65)
ECC3d	22,4	± 6,3	13,4 - 35,6	20,4	± 4,3	16,1 - 28,5	2,04 (-2,28 ; 6,36)
S2	4,1	± 5,9	0,3 - 35,9	3,1	± 4,1	0,1 - 18,8	1,07 (-0,97 ; 3,11)
S3	13,7	8,3	2,3 - 27,8	8,9	7,3	1,5 - 20,4	4,83 (-1,19 ; 10,85)

NS

FIGURA 31: Gráfico de las variables morfocinéticas directas.

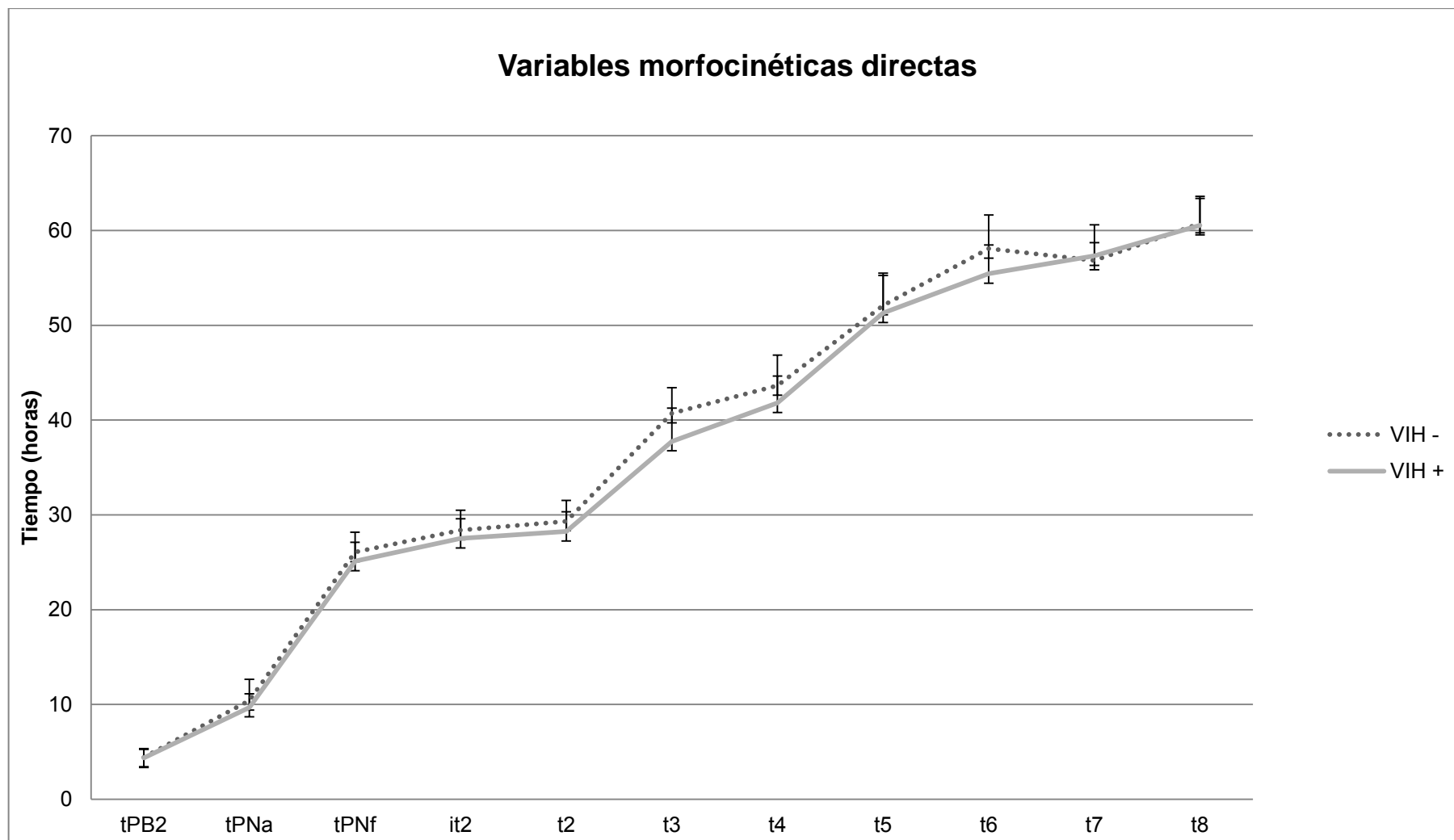
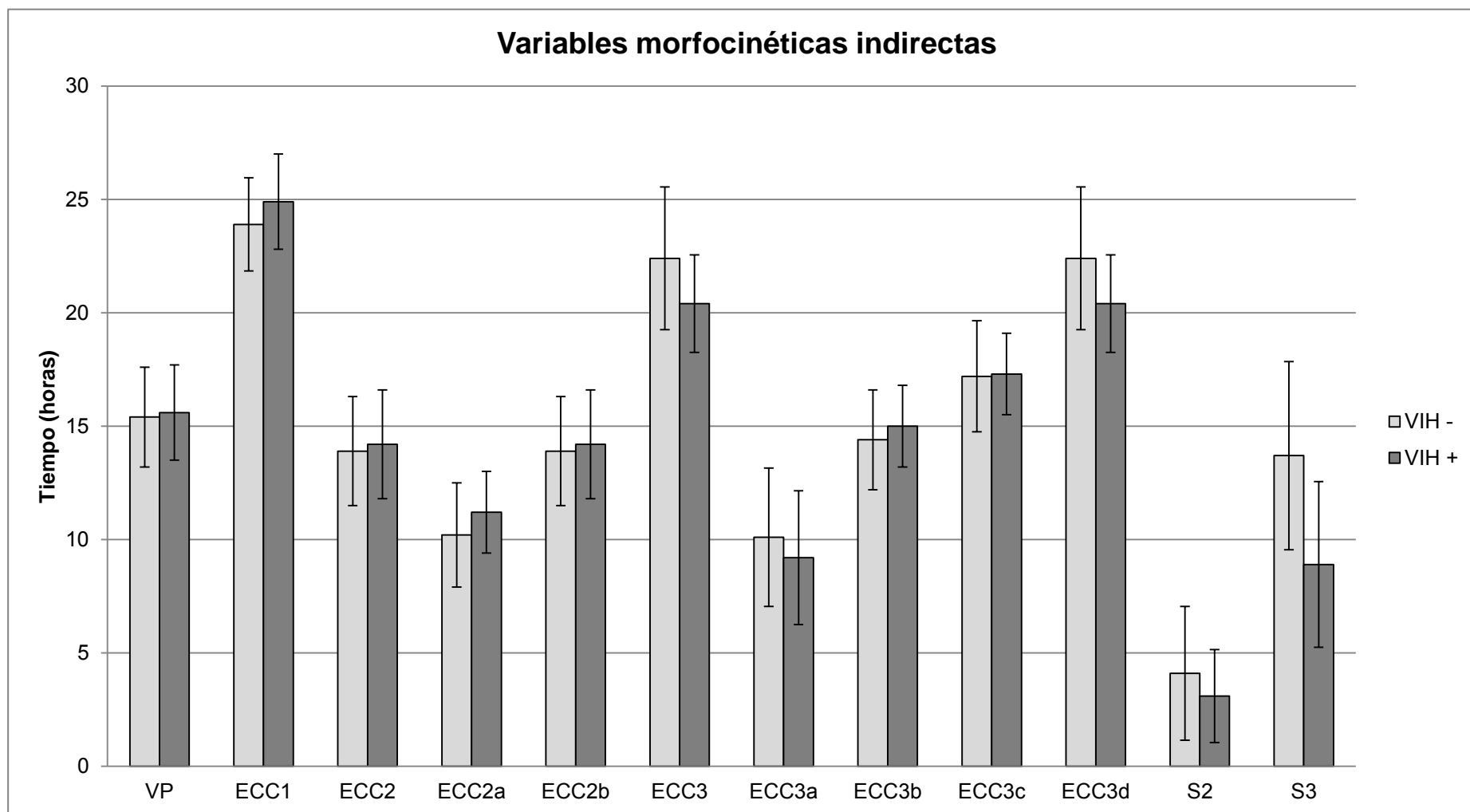


FIGURA 32: Gráfico de las variables morfocinéticas indirectas.



También se analizó la cinética del desarrollo embrionario considerando t0 como la desaparición de los PN. Ninguno de los parámetros considerados mostró diferencias significativas en ambos grupos como se aprecia en la Tabla 14.

TABLA 14. Cinética del desarrollo embrionario a partir de t0 considerando este como la desaparición de PN.

	CONTROL VIH ⁻ (n=71)				ESTUDIO VIH ⁺ (n=49)				Media de las diferencias (95% CI)
	Media	±	SD	Rango	Media	±	SD	Rango	
t2 _d	3,1	±	2,3	0,7 - 20,4	3,3	±	1,2	1,6 - 7,2	-0,20 (-0,92 ; 0,52)
t3 _d	13,3	±	4,5	3,3 - 22,7	14,4	±	3,6	3,8 - 22,7	-1,13 (-2,73 ; 0,47)
t4 _d	16,9	±	4,8	4,9 - 31,3	17,4	±	4,6	6 - 36	-0,52 (-2,36 ; 1,32)
t5 _d	26,3	±	7,1	8,6 - 37,6	25,8	±	6	15,8 - 33,6	0,45 (-2,48 ; 3,38)
t6 _d	30,3	±	5,5	14,5 - 38	31,7	±	3,2	26,9 - 37,4	-1,4 (-3,71 ; 0,91)
t7 _d	32,5	±	5,8	15,1 - 41,4	33,2	±	3,8	28,4 - 40	-0,62 (-3,73 ; 2,49)
t8 _d	36,8	±	6,5	24,1 - 46,7	36,3	±	4,1	31,4 - 42,4	0,49 (-3,90 ; 4,88)

NS

2.3. Resultados de la gestación en parejas con varón VIH⁻ y VIH⁺

No se observaron diferencias significativas en cuanto a las tasas de implantación, gestación clínica y tasa de aborto en ambos grupos. (Tabla 15).

TABLA 15. Resultados de la gestación en parejas con varón VIH⁻ y VIH⁺ tras transferencia embrionaria en fresco.

	CONTROL VIH ⁻			ESTUDIO VIH ⁺			Odd Ratio (95% CI)
	n	%		n	%		
Tasa de implantación	11	42,3	(11/26)	12	46,1	(12/26)	0,85 (0,28 ; 2,55)
Tasa de gestación clínica por punción	9	60	(9/15)	8	53,3	(8/15)	0,76 (0,17 ; 3,24)
Tasa de aborto	3	33,3	3/9	3	37,5	(3/8)	1,20 (0,16 ; 8,79)

2.4. Resultados de la técnica de vitrificación embrionaria en embriones procedentes de varones VIH⁻ y VIH⁺

A pesar del reducido número de embriones desvitrificados se muestran los resultados obtenidos de supervivencia, implantación y gestación.

El porcentaje de supervivencia, fue del 86,6% (13/30) en el grupo control, mientras que en el grupo de estudio fue del 66,7% (2/6). Tras 24 horas de cultivo observamos que la tasa de división embrionaria fue del 61,5% y 66,7%, respectivamente (Tabla 16).

TABLA 16. Resultados de vitrificación, implantación y gestación en varones VIH⁻ y VIH⁺ tras criotransferencia embrionaria.

	CONTROL VIH ⁻ (n=30)			ESTUDIO VIH ⁺ (n=6)			Odd Ratio (95% CI)
	n	%		n	%		
Nº de embriones desvitrificados	15			3			
Criotransferencias	9			1			
Porcentaje de supervivencia	13	86,6	(13/15)	2	66,7	(2/3)	0,30 (0,01; 5,18)
Embriones divididos	8	61,5	(8/13)	2	66,7	(2/3)	0,61 (0,07 ; 5,27)
Tasa de implantación	2	22,2	(2/9)	0	0	(0/0)	0,78 (0,02 ; 25,90)
Tasa de gestación clínica por criotransferencia	2	22,2	(2/9)	0	0	(0/0)	0,78 (0,02 ; 25,90)
Tasa de aborto	1	50	(1/2)	0	0	(0/0)	0,60 (0,01 ; 49,45)

2.5. Resultados de gestación acumulada en varones VIH⁻ y VIH⁺

En cuanto a las tasas de implantación, gestación clínica y aborto, acumulados, los resultados observados indican que fueron similares para ambos grupos (Tabla 17).

TABLA 17. Resultados de gestación acumulada en varones VIH⁻ y VIH⁺.

	CONTROL VIH ⁻ (n=15)		ESTUDIO VIH ⁺ (n=15)		Odd Ratio (95% CI)
	n	%	n	%	
Tasa de implantación acumulada	13	33,3 (13/39)	12	42,8 (12/28)	1,50 (0,55 ; 4,08)
Tasa de gestación clínica acumulada	11	73,3 (11/15)	8	53,3 (8/15)	0,42 (0,09 ; 1,91)
Tasa de aborto acumulada	4	36,6 (4/11)	3	37,5 (3/8)	1,05 (0,16 ; 6,92)

2.6. Resultados obstétricos y neonatales en parejas con varones VIH⁻ y VIH⁺

En total, tuvieron lugar 7 partos en el grupo control mientras que en el grupo de estudio se registraron 5 partos. En el grupo de embriones procedentes de varones VIH⁻, de los 7 partos, se registraron 5 partos únicos (71,4%) y 2 múltiples (28,6%) mientras que en el grupo de embriones procedentes de varones VIH⁺, de los 5 partos, se registraron 2 partos únicos (40%) y 3 gemelares (60%). No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en el tipo de parto, como se observa en la Tabla 18.

TABLA 18. Resultados obstétricos en parejas con varón VIH⁻ y VIH⁺.

	CONTROL VIH ⁻ (n=15)		ESTUDIO VIH ⁺ (n=15)		Odd Ratio (95% CI)
	n	%	n	%	
Nº total de recién nacidos	9		8		
Nº total de partos	7		5		
▪ Únicos	5	71,4 (5/7)	2	40 (2/5)	0,26 (0,02 ; 3,02)
▪ Múltiples	2	28,6 (2/7)	3	60 (3/5)	3,75 (0,32 ; 42,46)
Tipo de parto					
▪ Vaginal	5	71,4 (5/7)	3	60 (3/5)	0,60 (0,05 ; 6,79)
▪ Cesárea	2	28,6 (2/7)	2	40 (2/5)	1,66 (0,14 ; 18,87)

En lo que se refiere a los datos neonatales se observó un menor peso medio en los recién nacidos del grupo de varones VIH⁺, frente a los del grupo de varones VIH⁻ (2790 ± 339 vs 2914 ± 480 gr.) sin alcanzar significación estadística.

No encontramos diferencias significativas en la semana gestacional media en el momento del parto (Tabla 19).

TABLA 19. Resultados neonatales en parejas con varón VIH⁻ y VIH⁺.

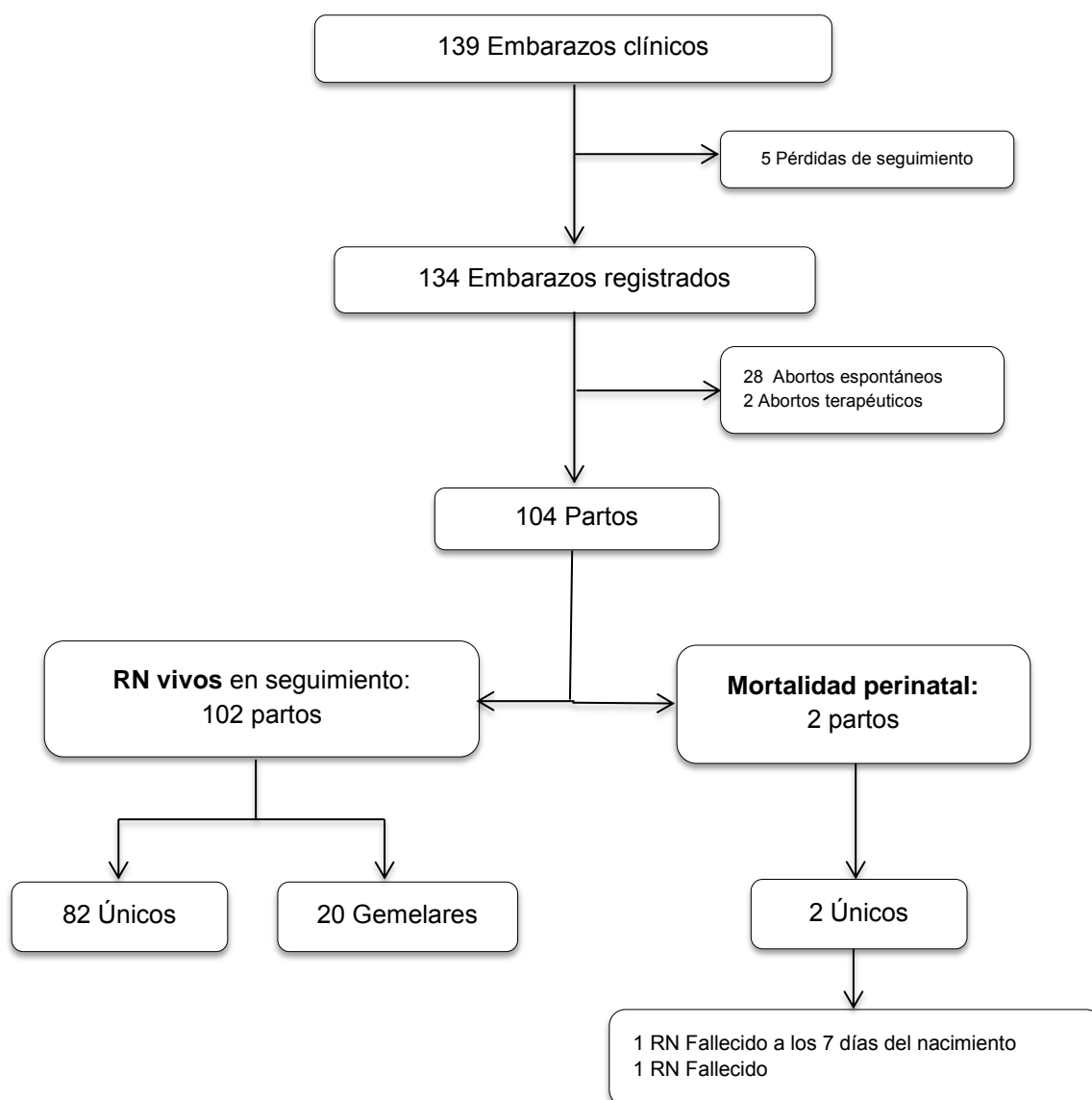
	CONTROL VIH ⁻ (n=9)				ESTUDIO VIH ⁺ (n=8)				Media de las diferencias (95% CI)
	Media	±	SD	Rango	Media	±	SD	Rango	
Semana gestacional media	38,3	±	1,6	36 - 41	37,6	±	2,1	35 - 41	0,62 (-1,35 ; 2,59)
Peso medio al nacer	2931	±	453	2360 - 3690	2790	±	339	2350 - 3300	141 (-277,2 ; 559,2)

NS

3. Resultados obstétricos y neonatales en ciclos de ICSI realizados con pentoxifilina para identificar espermatozoides viables

De los 139 embarazos clínicos registrados, hubo 104 (77,6%) partos con al menos un recién nacido. Se registraron 122 recién nacidos vivos con seguimiento (84 partos únicos y 20 partos gemelares) y se obtuvo seguimiento neonatal para 84 partos únicos y 20 partos gemelares. El análisis final de los datos incluyó 134 embarazos clínicos con resultados obstétricos y neonatales (Figura 33).

FIGURA 33: Diagrama de flujo del estudio.



Las principales características de los ciclos estudiados y de los resultados obstétricos obtenidos se muestran en la Tabla 20 y Tabla 21, respectivamente. Los embarazos clínicos se produjeron principalmente con espermatozoides testiculares en ciclos de transferencia embrionaria en fresco (84%). Los resultados neonatales están reflejados en la Tabla 22.

El origen de los espermatozoides en relación con el embarazo clínico viene indicado en la Tabla 20. Considerando el origen de los espermatozoides en cada uno de los partos (n = 104), obtuvimos 91 partos procedentes de espermatozoides testiculares, 6 de espermatozoides del epidídimo y 7 partos con espermatozoides eyaculados.

TABLA 20. Características clínicas de los ciclos estudiados.

CARACTERÍSTICAS	NÚMERO (%) O MEDIA ± SD
N° de pacientes	120
N° de embarazos clínicos	134
Edad	34,1 ± 4,4
Suplemento de ácido fólico	81 (60%)
Tipo de tratamiento	
▪ Ciclos en fresco	112 (84%)
▪ Ovocitos desvitrificados	3 (2%)
▪ Embriones desvitrificados	19 (14%)
Origen espermatozoides	
▪ Testicular	113 (84%)
▪ Epidídimo	9 (7%)
▪ Eyaculado	12 (9%)
N° de embriones transferidos	1,9 ± 0,5
▪ 1	29 (22%)
▪ 2	94 (70%)
▪ 3	11 (8%)
Día de la transferencia	
▪ Día 2-3	110 (82%)
▪ Día 4	13 (10%)
▪ Día 5-6	11 (8%)

Si se consideran partos únicos y gemelares como un solo grupo, la proporción de recién nacidos hombre/mujer fue de 0,85 con una incidencia del sexo masculino igual al 46% (IC del 95%= 37 – 55%). La media de la edad gestacional del parto fue de $38^{+6} \pm 2^{+6}$ semanas, con diferencias entre los embarazos únicos ($39^{+2} \pm 2^{+5}$ semanas) y gemelares ($36^{+6} \pm 2^{+2}$ semanas). El peso medio al nacer fue de 2984 ± 669 g, con diferencias significativas ($p < 0,001$) entre partos únicos (3242 ± 577 g) y gemelares (2434 ± 481 g).

TABLA 21. Resultados obstétricos y neonatales de los partos estudiados.

CARACTERÍSTICAS		n	%
Embarazos clínicos			
▪ Únicos		106	(79,1)
▪ Gemelares		28	(20,9)
Abortos			
▪ Tasa de aborto espontáneo		28	(20,9)
▶ Aborto (<12 semanas)		26	(19,4)
▶ Aborto (12-19 semanas)		2	(1,5)
▪ Aborto terapéutico		2	(1,5)
Hipertensión gestacional		4	(3,0)
Diabetes gestacional		11	(8,2)
Placenta previa		1	(0,7)
RPM		11	(8,2)
Muerte anteparto		1	(0,75)
Partos de nacidos vivos		103	(76,8)
▪ Muerte neonatal tardía		1	(1)
Tipo de partos			
▪ Únicos		84	(80,8)
▪ Gemelares		20	(19,2)

RPM: Rotura prematura de membranas

TABLA 22. Resultados obstétricos y neonatales de los partos estudiados.

CARACTERÍSTICAS	GESTACIONES ÚNICAS (n=84 partos, n=84 RN)	GESTACIONES GEMELARES (n=20 partos, n=40 RN)
Semana gestacional ^(+días) del parto ^a	39 ⁺² ± 2 ⁺⁵	36 ⁺⁶ ± 2 ⁺²
Partos pretérmino (<37 semanas)	10 (12%)	9 (45%)
Peso (gramos)	3242 ± 577	2434 ± 481
Peso <1500 gramos	2 (2,4%)	2 (5%)
Peso 1500-2500 gramos	3 (3,6%)	18 (45%)
Peso >4500 gramos	0%	0%
Muerte anteparto	1 (1,2%)	0%
Muerte neonatal tardía	1 (1,2%)	0 (0%)

^a Calculado desde el día de la transferencia embrionaria + 14 días + edad del embrión.

3.1. Malformaciones neonatales

En cuanto a la tasa de malformación por recién nacido vivo, se registraron 4/122 (3,3%, IC del 95% = 0,9 – 8,2%) según la tasa de malformación de la ICD-10, concretamente, un Q67 y un Q65 que afectan al sistema músculo-esquelético, un Q14 que afecta al ojo y un Q43 que afecta al intestino (Tabla 23).

Los cuatro recién nacidos vivos con malformaciones de la ICD-10 nacieron en ciclos de ICSI-PTX con espermatozoides testiculares. Cabe destacar que tres de estas cuatro malformaciones se registraron en recién nacidos de embarazos gemelares. Además, una mujer presentó una rotura prematura de las membranas (RPM) tras 24 semanas de gestación y el recién nacido murió una semana después del parto sin presentar malformaciones.

TABLA 23. Resultados de malformaciones neonatales en recién nacidos vivos.

CARACTERÍSTICAS	GESTACIONES ÚNICAS (n=82 partos, n=82 RN vivos)	GESTACIONES GEMELARES (n=20 partos, n=40 RN vivos)
Malformaciones ICD-10 (recién nacidos)	1 (1%)	3 (8%)
▪ Anomalía intestinal congénita (Q43.9)	0 (0%)	1 (3%)
▪ Plagiocefalia posicional (Q67.3)	0 (0%)	1 (3%)
▪ Displasia de cadera (Q65.89)	0 (0%)	1 (3%)
▪ Cambio macular congénito (Q14.1)	1 (1%)	0 (0%)

Basándonos en los datos previamente publicados por Bonduelle et al. (2002) sobre la prevalencia esperada de malformaciones según la ICD-10 entre los niños nacidos mediante ICSI, el riesgo de obtener una descendencia afecta entre los pacientes que realizaron ciclos con ICSI sería del 4,4% (IC del 95% = 1,3 – 9,3%) que incluye la tasa del 3,3% observada en nuestro estudio (Tabla 24).

Considerando los partos únicos y gemelares por separado, las tasas de malformación observadas fueron de 1,2% (IC 95% = 0 – 6,7%) en partos únicos y de 7,5% en partos gemelares (IC 95%= 1,6 – 20,4%), respectivamente.

La tasa total de malformaciones según la clasificación de la ICD-10 fue de 4 (recién nacidos vivos afectados) + 1 (recién nacido muerto afectado) + 2 (abortos terapéuticos) dividido entre 134 (embarazos) = $7/134 = 5,2\%$ (2,3 – 11,3%). El parto del recién nacido muerto afectado tuvo una trisomía del 18 y los dos abortos terapéuticos fueron afectados por trisomía del 18 y 16, respectivamente. Todas las malformaciones se observaron en ciclos frescos, con la excepción de la Q67.3 que procedía de un embrión crioconservado.

Dado que ninguna de las malformaciones neonatales se observó en parejas que usaron espermatozoides procedentes del eyaculado y, la única muerte neonatal tardía registrada procedía de este grupo, se analizó el subgrupo de recién nacidos tras ICSI-PTX con espermatozoides testiculares o de epidídimo y se observó una tasa malformación por recién nacido de 3,5% según la ICD-10 y una tasa total de malformaciones del 5,5% en ciclos de espermatozoides testiculares.

La muerte perinatal fue comparada en el grupo de Bonduelle et al. (2002) y en el grupo de estudio (1,7% vs 1,6%) (Tablas 24 y 25).

TABLA 24. Resultados obstétricos y neonatales del grupo de estudio comparado con el control externo (Bonduelle et al., 2002).

CARACTERÍSTICAS	Incidencia prevista según Bonduelle et al., 2002	Incidencia observada en el grupo de estudio (95% IC)
Muerte perinatal	1,7% (0,0 – 5,2)	1,6% (0,2 – 6,8)
Prematuros ^b	31,2% ^a (23,1 – 40,2)	23,0% (15,8 – 21,4)
Tasa de malformación en recién nacidos vivos (ICSI)	4,4% (1,3 – 9,3)	3,3% (0,9 – 8,2)
Tasa total de malformación según la ICD-10 (ICSI)	4,2% (1,8 – 10,4)	5,2% (2,3 – 11,3)

95% IC: 95% Intervalo de confianza; ^areferente a embarazos únicos y gemelares; ^b <37 semanas de gestación

TABLA 25. Muerte perinatal.

CARACTERÍSTICAS		
Muerte perinatal	2	(1,6%)
▶ Muerte anteparto	1	(0,8%)
▶ Muerte intraparto	0	(0%)
▶ Muerte neonatal precoz (< 7 días)	0	(0%)
▶ Muerte neonatal tardía (7 – 28 días)	1	(0,8%)

DISCUSIÓN

1. Efecto de la monoterapia con DRV/r sobre la calidad y carga viral seminal

La estrategia de simplificación a monoterapia con IP/r, ha sido relacionado en algunos trabajos, con una mayor frecuencia de *blips* (episodios intermitentes de viremia detectable, precedidos y seguidos de viremia indetectable, sin realizar cambios en el TAR) que en los pacientes en triple terapia (Lambert-Niclot et al., 2011). Aunque su causas no están del todo claras, si es cierto que han generado dudas sobre esta estrategia de simplificación. El origen de estos *blips* no es del todo conocido, pero se postula que son debidos a la replicación residual en los reservorios virales, como el compartimento genital, en los pacientes en monoterapia. En función a esta hipótesis, esta mayor replicación en reservorios sería debida a una supuesta pérdida de la potencia supresora de la monoterapia frente a la triterapia, lo que llevaría al paciente a presentar un mayor riesgo de fracaso virológico (Doyle & Geretti, 2012).

Por otro lado, el semen es el vector más común para la transmisión del VIH, y la CV seminal es un predictor del riesgo de contagio del VIH. Por tanto, cualquier terapia frente al VIH debe ser efectiva a este nivel, reduciendo los niveles de ARN-VIH en semen, manteniendo la CVP negativa y disminuyendo el riesgo de transmisión en la población.

Con el objeto de valorar la eficacia de la monoterapia con DRV/r analizamos la calidad y CV seminal en un grupo de varones VIH⁺ en tratamiento con triterapia, antes y después de 48 semanas de tratamiento con monoterapia con DRV/r.

El porcentaje de pacientes en tratamiento con triterapia que tenían CVP negativa y CV seminal positiva encontrados en nuestro estudio (10%) es similar al observado por otros autores que oscila entre un 6,4% y un 16% (Günthard et al., 2001; Vernazza et al., 2007; Lambert-Niclot et al., 2010; Lambert-Niclot et al., 2012; Torres-Cornejo et al., 2016). Además, las concentraciones de ARN-VIH halladas en el plasma seminal durante nuestro estudio presentaban

valores similares (35 – 1210 copias/mL) a las observadas por algunos de estos autores, Lambert-Niclot et al. (2010) con 270 – 1345 copias/mL y Torres-Cornejo et al. (2016) con y 31 – 1445 copias/mL.

En nuestro estudio hemos encontrado una alta eficacia de la monoterapia con DRV/r en el control de la CV seminal, pues únicamente el 3% de los pacientes han presentado CV seminal positiva tras 48 semanas de tratamiento. Este 3% corresponde con un único paciente, el cual obtuvo una CV seminal de 139 copias/mL y, además, presentó CV seminal positiva en V0. Este resultado coincide con el obtenido en estudios similares (Nunes et al., 2009; Lambert-Niclot et al., 2010; Santos et al., 2016), los cuales observan un 6,7% y un 4,3%, respectivamente, usando ambos IP/r. Sin embargo, discrepan de los obtenidos por Swindells et al. (2006) y Ghosn et al. (2008), pues estos autores no encuentran ningún paciente con CV seminal positiva. Estas discrepancias pueden deberse principalmente a la técnica de detección del ARN-VIH empleada, ya que los límites de detección descritos por estos autores son muy superiores (<150 copias/mL y <200 copias/mL, respectivamente) a los utilizados en nuestro estudio (<20 copias/mL). Por otro lado, existen estudios con monoterapia usando DRV/r que demuestran también una alta eficacia de la monoterapia en el control de los niveles de VIH en otros reservorios o santuarios corporales, como el SNC (Pérez-Valero et al., 2014; Clarke et al., 2014; Arenas-Pinto et al., 2016) o el tejido linfático (Vinuesa et al., 2014).

El bajo porcentaje de CV seminal positiva con DRV/r en monoterapia nos lleva a pensar que es tan segura y eficaz como la triterapia, a pesar de la baja penetración de DRV/r en el compartimento genital masculino como indica Lambert-Niclot et al. (2011). Estos autores demostraron que la fracción libre de DRV que se encuentra en el semen es del 7,2% de la observada en plasma sanguíneo (Lambert-Niclot et al., 2010).

Durante nuestro análisis no registramos ningún fracaso virológico en ninguna de las dos etapas del estudio. Según el estudio de Gutmann et al. (2010), el único factor predictor del fracaso virológico en pacientes sometidos a monoterapia es una concentración sanguínea <200 cel/mm³ de linfocitos CD4. Durante ambas fases de nuestro trabajo estos niveles fueron superiores a 200 cel/mm³ en todos los pacientes.

Uno de los factores claves en cualquier estudio sobre terapias en VIH es el seguimiento de los pacientes. En nuestro trabajo observamos que un 25% de los pacientes que realizaron el primer estudio seminal, luego no acudió a realizar el segundo tras 48 semanas de tratamiento en monoterapia. Este porcentaje es parecido al observado en estudios de diseño similar como el realizado por Santos et al. (2016), el cual encuentra un 30% de tasa de abandono. No creemos que el inconveniente que supone la recogida de semen haya influido en esta alta tasa de abandonos, ya que estudios similares al nuestro, pero sin análisis de semen, también han observado tasas de abandono cercanas al 30% (Arribas et al., 2005; Ghosn et al., 2010).

Otro factor limitante de los estudios que detectan CV seminal es la elevada frecuencia de inhibición de la PCR. En nuestro trabajo hemos detectado que el porcentaje medio fue del 36%. Cabe destacar que estudios previos han indicado que en el 20% – 40% de las muestras de semen se inhibe (Dyer et al., 1996; Coombs et al., 1998), sin poder obtener resultados cuantitativos de ARN-VIH. Esto es debido a que la sensibilidad de la PCR se ve reducida por la presencia de inhibidores de RT-PCR en plasma seminal (Coombs et al., 1998; Dunne et al., 2003). Esto dificulta la aparición de un ensayo comercial certificado para detectar la CV del VIH en semen (Pasquier et al., 2012). Estas dificultades hacen que se haya comunicado una alta variabilidad entre laboratorios participantes en programas de control de calidad externo para la determinación de virus en semen mediante PCR (Bourlet et al., 2003). Estos programas son organizados por CREAThE (una red sin ánimo de lucro de centros que ofrecen asistencia reproductiva a parejas con VIH) y ayudan a mejorar la fiabilidad de la determinación de VIH en semen. Nuestro centro participa en ellos (Pasquier et al., 2012).

La estandarización de los estudios de calidad seminal es un factor clave para poder obtener conclusiones válidas. Nuestro grupo participó en el desarrollo de las recomendaciones SEMQUA para el diseño y evaluación de estudios de calidad seminal (Sánchez-Pozo et al., 2013) y este trabajo ha seguido dichas recomendaciones.

Respecto a la calidad seminal, tras descartar anomalías endocrinológicas y genitales, solo el 57,1% de los pacientes tratados en VO superaron el límite inferior de los valores de referencia según la última actualización de la OMS para la calidad del semen (Cooper et al., 2010). Estos datos confirman la mala calidad espermática en los pacientes seropositivos para VIH en tratamiento ARV (Dulioust et al., 2002; Nicopoullos et al., 2004; Bujan et al., 2007; Pilatz et al., 2014; Kehl et al., 2011; Van Leeuwen et al., 2008b). Las razones de esta baja calidad no están del todo claras, pero podría deberse al resultado de la propia infección (Van Leeuwen et al., 2007) o al daño atribuido a la triterapia (Lambert-Niclot et al., 2011).

De todos los pacientes que recibieron monoterapia con DRV/r, el porcentaje de pacientes que presentaron valores seminales superiores al límite inferior de los valores de referencias según la OMS fue del 62%. Esta tendencia a la mejora de la calidad seminal que hemos observado en nuestro estudio puede ser debido a que los análogos de nucleósidos que reciben los pacientes bajo tratamiento antirretroviral con triterapia, están asociados con una mayor toxicidad mitocondrial (Moyle et al., 2002; Moyle, 2005; Lambert-Niclot et al., 2011).

En cuanto a los parámetros espermáticos de todos los pacientes que completaron el estudio, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ningún parámetro seminal, sin embargo, observamos una tendencia a la disminución del volumen del eyaculado, de la morfología espermática y de la concentración de espermatozoides tras el cambio a monoterapia con DRV/r. En cuanto a este último parámetro, al tener en cuenta el número total de espermatozoides del eyaculado, observamos una diferencia menos acentuada. Según el manual de la OMS, este parámetro es el de mayor

valor clínico durante el estudio de la espermatogénesis (WHO, 2010). Respecto a la movilidad total no encontramos ninguna diferencia, ya que se mantuvo constante durante todo el estudio, no obstante, en cuanto a la movilidad progresiva hubo un ligero aumento tras el cambio a monoterapia con DRV/r. Esta observación sugeriría que los cambios observados en la movilidad progresiva durante la triterapia podrían estar relacionados con el uso de los ITIAN, ya que durante la primera fase del estudio todos los pacientes tenían prescrito TNF o ABC. Estos fármacos antirretrovirales se han relacionado con la afectación de la función mitocondrial a través de la inhibición de la replicación de la polimerasa gamma, causando un agotamiento del ADN mitocondrial y por tanto, disminuyendo la movilidad progresiva (Pavili et al., 2010).

Durante nuestro estudio, no encontramos relaciones estadísticamente significativas entre el tipo de terapia y los niveles de linfocitos CD4 en suero, lo que coincide con lo observado por otros autores (Swindells et al., 2006; Ghosh et al., 2008; Marcelin et al., 2008; Sheth et al., 2009; Torres-Cornejo et al., 2016).

De acuerdo con la revisión realizada, no se han encontrado estudios previos que comparen los cambios producidos en la calidad seminal al cambiar de triterapia a monoterapia con DRV/r o monoterapia con LPV/r.

En vista de los resultados obtenidos, concluimos que tanto la calidad seminal como la CV en el semen tienen las mismas características en los pacientes con triterapia que en los que recibieron monoterapia con DRV/r. Los resultados obtenidos deben ser tenidos en cuenta a la hora de informar adecuadamente a las parejas con varón VIH⁺ con deseos reproductivos (Molina et al., 2014). Sin embargo, los hallazgos encontrados deben ser confirmados con estudios de mayor número de pacientes y debería analizarse el efecto de la monoterapia sobre moléculas y células del sistema inmune a nivel seminal.

2. Evaluación de la calidad embrionaria en parejas con varón VIH⁺

Los avances en el tratamiento del VIH han supuesto una mejora en la calidad y esperanza de vida de los pacientes seropositivos y ha convertido a la infección por VIH en una enfermedad crónica en nuestro entorno. Muchos de estos pacientes tienen pareja estable y deseos de reproducción que quieren satisfacer. Desde que Semprini et al. (1992) realizara el primer lavado de semen las opciones disponibles para estas parejas incluyen, además de la reproducción natural, las técnicas de reproducción asistida.

Algunos autores han descrito tasas de implantación, embarazo clínico y recién nacido más bajos en parejas con varón VIH⁺, sugiriendo que esto se debía a la mala calidad embrionaria ocasionada por el tratamiento antirretroviral o por la propia infección de VIH (Dulioust et al., 2002; Nicopoullou et al., 2004; Lambert-Niclot et al., 2011; Molina et al., 2014). Por ello, nos hemos propuesto profundizar en la relación de la infección VIH en varones sobre la calidad de embriones obtenidos en programas de FIV/ICSI, utilizando para ello sistemas de tecnología time-lapse.

Muchos centros de reproducción asistida, que atienden a los deseos reproductivos de parejas con varón VIH⁺, realizan ICSI a todas las parejas en lugar de IAC, basándose en la mayor tasa de éxito y por tanto menor exposición a posibles espermatozoides contaminados, y en la teoría de que la ICSI requiere únicamente el contacto *in vitro* de un solo espermatozoide y ovocito, y reduce drásticamente el riesgo de transferir partículas víricas, que a menudo están en semen o en células seminales (Pasquier et al., 2000; Sauer and Chang, 2002; Cleary-Goldman et al., 2003). Otros autores consideran que esta teoría no ha sido probada y que esto podría suponer la introducción de partículas virales directamente en el ovocito sin saber los efectos que podrían tener (Piomboni and Baccetti, 2000; Gordon, 2002; Anderson and Politch, 2003), además de suponer mayor coste y estar asociada con mayor número de complicaciones que la IAC (Fernández-Shaw et al., 2010). A pesar de que el meta-análisis realizado por Zafer et al. (2016) no encuentra ninguna

seroconversión tras IAC con semen lavado, nosotros hemos realizado de forma rutinaria ICSI a todos las parejas, ya que al igual que ocurre en otros centros (Ohi et al., 2003; Prisant et al., 2010) no disponemos del resultado del análisis que descarta la presencia de partículas víricas en la suspensión de espermatozoides el mismo día del lavado seminal. Esto nos obliga a congelar la suspensión de espermatozoides lavados, y por tanto no nos permite tener el número suficiente de espermatozoides móviles para realizar IA. Por otro lado, y debido al uso de la tecnología time-lapse, la realización de la ICSI ha sido necesaria para poder registrar todos los parámetros morfocinéticos del desarrollo embrionario.

Nuestros resultados en gestación clínica para parejas con varón VIH⁺ son similares a los descritos por otros autores (Semprini et al., 2002; Peña et al., 2003; Sauer et al., 2009; Zamora et al., 2016), pero superiores a los reportados por otros (Manigart et al., 2006; Prisant et al., 2010). Nuestra tasa de gestación múltiple en estas parejas es alta (60%), siendo próxima a la descrita por Peña et al. (2003), Sauer et al. (2009) y Zamora et al. (2016), los cuales obtienen un 57,1%, 41% y 45% respectivamente. Por ello, creemos que debería tenderse a la implantación de una política de transferencia de embrión único en parejas con varón VIH⁺, ya que muchas de estas parejas son fértiles, sin problemas reproductivos, por lo que es conveniente reducir el número de embriones transferidos para evitar así el riesgo de embarazo múltiple. Esta estrategia coincide con lo recomendado por las guías de reproducción asistida en parejas serodiscordantes (Jindal et al., 2016).

Aunque la tasa de cesárea fue mayor en el grupo de parejas con varón VIH⁺ (40%), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además fue inferior a la descrita por otros autores para este tipo de parejas (Cleary-Goldman et al., 2003; Peña et al., 2003; Sauer et al., 2009).

En cuanto a la edad gestacional media y el peso medio al nacer de recién nacidos en parejas cuyo varón es VIH⁺ los datos obtenidos fueron ligeramente menores que el grupo control de varones VIH⁻, aunque no

significativos. Sauer et al (2009) y Molina et al. (2014) realizaron estudios de diseño similar al nuestro y encontraron datos semejantes.

Respecto a las variables de laboratorio estudiadas, la tasa de fecundación en parejas con varón VIH⁺ fue significativamente menor (51,8%) que en varones VIH⁻, al igual que han observado otros autores (Manigart et al., 2006; Kashima et al., 2009). Esto puede ser debido a la propia calidad del semen, ya que puede estar afectada por la propia infección del VIH (Dondero et al., 1996; Dulioust et al., 2002), el tratamiento antirretroviral utilizado (Dulioust et al., 2002; Garrido et al., 2005), o por el mismo proceso de lavado de semen (Oliva and Pons, 2004).

En cuanto al número de embriones crioconservados, existen diferencias significativas entre ambos grupos de estudio. Incluso obteniendo proporciones similares en cuanto a calidad embrionaria, las parejas cuyo varón es VIH⁺ tuvieron menor número de embriones crioconservados. Esto puede ser debido principalmente a la menor cantidad de ovocitos fecundados en el grupo de varones VIH⁺, por lo que al obtenerse un número menor de ovocitos fecundados, menor es el número de embriones disponibles para poder crioconservar. Estas diferencias impactaran negativamente en la tasa de gestación acumulada por ciclo de las parejas con varón VIH⁺.

Referente a la calidad embrionaria, sólo hay una publicación, basada en criterios morfológicos estáticos, que la estudia en parejas con varón seropositivo para VIH (Melo et al., 2008) y al igual que nosotros no observaron afectación de la calidad embrionaria en estos pacientes cuando la TE se realiza en D+3. Nuestro estudio, basado en la tecnología time-lapse coincide con este trabajo.

Durante nuestro estudio hemos comprobado que no existen diferencias significativas entre todas las variables morfocinéticas directas estudiadas en ambos grupos, ya sea considerando t₀ como el tiempo medio de la realización de la ICSI o desde la desaparición de los PN, como recomienda Ahlstrom et al. (2016). Según Aguilar et al. (2014) la extrusión del 2ºCP (tPB2) disminuye la

capacidad de implantación cuando se produce entre 1 – 3,2 horas. Nosotros hemos podido comprobar que en el grupo de varones seronegativos para el VIH este tiempo ha sido de 4,3 horas, mientras que en el grupo de varones seropositivos para el VIH ha sido de 4,4 horas. Azzarello et al. (2012) indica en su estudio que la desaparición de los PN (tPNf) ocurrió entre las 23,4 – 26,1 horas en los embriones con buen pronóstico, tiempo muy similar al encontrado en nuestro estudio (25,1 horas para varones VIH⁻; 26,1 horas para varones VIH⁺).

En relación a la variable t3, Basile et al. (2015) encuentran que los embriones que dividen a 3 células entre las 34 – 40 horas presentan mejores resultados, intervalo de tiempo en el que se encuentran los tiempos de los embriones de ambos grupos de nuestro estudio. El tiempo de división t5 se ha postulado como un parámetro cinético fundamental para predecir implantación (Meseguer et al., 2011; Cruz et al., 2012; Basile et al., 2015), con un rango situado entre 45 – 55 horas. En los embriones analizados durante nuestro estudio, no encontramos diferencias significativas entre los varones VIH⁻ y VIH⁺ en cuanto a esta variable morfocinética directa, obteniendo tiempos dentro del rango definido por Basile et al. (2015). La variable t8 se ha definido en un intervalo de tiempo de 58,3 – 59,9 horas (Cruz et al., 2013); rango muy similar al obtenido en los embriones analizados en nuestro estudio.

En relación a las variables morfocinéticas indirectas, las de mayor valor predictivo correlacionadas positivamente con la formación de blastocisto son la duración del segundo ciclo celular, es decir, el periodo de tiempo en el que observamos un embrión de 2 células (ECC2 <12 horas) y la sincronía en la transición desde un embrión de 3 células a un embrión de 4 células (s2 <0,76 horas) (Cruz et al., 2012; Kirkegaard et al., 2013; Milewski et al., 2015; Wong et al., 2010). Los embriones que cumplen estos tiempos de división tienen al menos un 10% más de probabilidades de implantar que aquellos embriones cuya cinética de desarrollo está fuera de rango (Cruz et al., 2012). Los tiempos medios obtenidos en nuestro estudio son inferiores a los comentados para ECC2 y s2, tanto para varones VIH⁻ como VIH⁺.

Melo et al. (2008) observó que los embriones procedentes de varón VIH⁺ que se cultivaban hasta día 5 ó 6 presentaban un aumento significativo en el bloqueo embrionario. Durante nuestro estudio, las TE se realizaron en D+2, D+3 o D+4, pero nunca en estadio de blastocisto, lo que nos impidió verificar este punto.

No parece que el aumento de edad de los varones VIH⁺ de nuestro estudio haya repercutido en los parámetros de calidad embrionaria analizados. Algunos autores si han observado un efecto negativo de ésta sobre el embrión. No obstante, este efecto se ha puesto de relieve en el cultivo a blastocisto por lo que de existir, no lo habríamos podido detectar (Rosário et al., 2016).

Por todo lo expuesto anteriormente en cuanto a la comparación de las variables morfocinéticas directas e indirectas no hemos encontrado diferencias entre ambos grupos, lo que sugiere que la infección por VIH no afecta al desarrollo embrionario hasta D+3.

3. Resultados obstétricos y neonatales en ciclos de ICSI realizados con PTX para identificar espermatozoides viables.

La consideración más importante en todos los procedimientos relacionados con las TRA es la seguridad de los pacientes, tanto de las mujeres sometidas a este tipo de técnicas como de su descendencia. Nuestro estudio es el primero que aborda los resultados obstétricos y neonatales de los recién nacidos tras ICSI utilizando espermatozoides tratados con PTX. Ésta actúa a nivel de la vía del AMP cíclico para estimular la motilidad espermática mediante la fosforilación de proteínas presentes en el flagelo de los espermatozoides, siendo usada ampliamente cuando no existe motilidad, como en el caso de los espermatozoides testiculares. Sin embargo, existe controversia sobre su posible potencial embriotóxico (Rubino et al., 2016). Estudios sobre fecundación y desarrollo embrionario temprano en ratones han mostrado efectos deletéreos en incubaciones prolongadas con PTX (Tournaye et al., 1995). Por otro lado estudios experimentales en células de mamíferos demuestran que las células tratadas durante un corto período manifiestan una

resistencia relativamente alta a la toxicidad de la PTX, lo que sugiere que no tendría efectos citotóxicos o genotóxicos (McKinney et al., 1994). A pesar de su frecuente uso en TRA, hasta la fecha, no se han descrito resultados obstétricos y neonatales de las gestaciones conseguidas tras el uso de PTX en humanos. Por lo que en este trabajo nos propusimos este objetivo.

Nuestros resultados demuestran que la edad gestacional, tanto para los embarazos únicos como para los gemelares tras la ICSI-PTX, es similar a la observada en otras cohortes de recién nacidos tras TRA, tanto en Italia y como en España (Levi Setti et al., 2016; Ricciarelli et al., 2013). Del mismo modo, las tasas de aborto precoz y tardío, y el peso medio al nacer son semejantes a las descritas en la literatura para recién nacidos tras ICSI sin PTX (Farquhar et al., 2015; Qin et al., 2016).

Hemos observado en los recién nacidos vivos tras ICSI-PTX una proporción hombre/mujer o *sex ratio* de 0,85. Aunque el tamaño de la muestra de nuestro estudio no ha sido el adecuado para detectar posibles modificaciones en la proporción de sexos con el uso de la PTX, cabe destacar que el descenso en la *sex ratio* observada coincide con el encontrado cuando se realiza ICSI en comparación con otras TRA como la FIV (Fedder et al., 2013; Maalouf et al., 2014; Setti et al., 2012). Esto podría deberse a que los embriones femeninos y masculinos responden de forma diferente a las condiciones del cultivo *in vitro*. Los embriones femeninos, debido al segundo cromosoma X, tendrían una mayor absorción de glucosa y desintoxicación de radicales libres que los embriones que portan el cromosoma Y (Maalouf et al., 2014). No obstante esta explicación afectaría tanto a embriones obtenidos por FIV como por ICSI. Otra posibilidad para explicar esta disminución, sería el elevado porcentaje de espermatozoides testiculares utilizado en nuestro estudio (87,5%) ya que se ha descrito que cuando los espermatozoides proceden del testículo se obtiene una mayor proporción de niñas (Arikawa et al., 2016). Según estos autores, la meiosis en varones con microdeleciones del cromosoma Y tendería a proporcionar espermatozoides viables X, siendo la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma Y menor. Como en el 4 – 15% de las azoospermias secretoras se encuentran implicadas

microdelecciones del cromosoma Y, al utilizar espermatozoides testiculares de estos pacientes cabría esperar más embriones euploides XX (Arikawa et al., 2016).

Por último, Setti et al. (2012) observaron una significativa incidencia de embriones euploides XX en comparación con embriones XY, al realizar ICSI por lo que sugirieron que los espermatozoides morfológicamente normales tienden a portar el cromosoma X en este tipo de varones, no pudiéndose excluir que la menor *sex ratio* observada en recién nacidos tras ICSI se deba un sesgo en la selección de espermatozoides portadores de cromosomas X, que resultarían más “normales” a ojos del embriólogo.

En nuestro estudio encontramos una incidencia del 12% de partos prematuros en gestaciones únicas, muy similar al 8,3% descrita para recién nacidos de gestaciones únicas procedentes de TRA (Ricciarelli et al., 2013). En los partos múltiples, el 45% se produjo de forma prematura, lo cual coincide con la tasa del 42-68% encontrada en partos múltiples procedentes de TRA en diferentes países europeos (Ricciarelli et al., 2013; Bendsdorp et al., 2016).

En cuanto al porcentaje observado de muerte perinatal en gestaciones tras ICSI-PTX (1,6%), es similar al encontrado tras TRA sin PTX que oscila entre 0 – 4,9% (Bonduelle et al., 2002; Koudstaal et al., 2000; Ricciarelli et al., 2013; Fedder et al. (2013). Respecto a la tasa de muerte perinatal, Fedder et al. (2013) comunicaron que este porcentaje es algo más alto en gestaciones de TRA en comparación con las gestaciones espontáneas, aunque sin alcanzar la significación estadística. Este mayor riesgo de muerte neonatal e infantil temprana cuando las parejas se someten a TRA, podría explicarse por el aumento de la incidencia de partos prematuros en TRA, dado que la edad gestacional es un factor de riesgo crucial para la muerte perinatal (Henningsen et al. 2014).

El riesgo de anomalías congénitas tras TRA sigue siendo aún un tema muy controvertido y debatido. Varios estudios han mostrado un mayor riesgo de anomalías congénitas en recién nacidos mediante TRA (Chen et al., 2014; El-Chaar et al., 2009; Tararbit et al., 2011), mientras que otros sugieren que no existe riesgo alguno (Sutcliffe et al., 2003; Place and Englert, 2003). El mayor meta-análisis realizado hasta la fecha sobre ICSI y malformaciones congénitas recopiló datos de 1959 recién nacidos de ICSI, informando de una tasa de malformaciones de un 7,2% (Lacamara et al., 2017). Durante nuestro estudio no utilizamos este porcentaje para la comparación, pues como los mismos autores comentan, la gran heterogeneidad entre los estudios incluidos cuestiona la validez de las conclusiones del meta-análisis. Por esto preferimos utilizar como grupo control los resultados de un estudio con una cohorte homogénea que permitiera obtener conclusiones válidas. Este elevado porcentaje de malformaciones congénitas observado en el meta-análisis de Lacamara et al. (2017) se asociaría a factores relacionados con la infertilidad que pueden incrementar el riesgo de las mismas, que incluyen la patología subyacente de los propios pacientes infértiles y los factores relacionados con los procedimientos de la ICSI *per se*, como la composición de los medios de cultivo y la fecundación tardía de los ovocitos.

La tasa total de malformaciones congénitas observada tras ICSI-PTX (5,2%) es similar a la informada por Sutcliffe et al. (2003), Bonduelle et al. (2004), Bonduelle et al. (2005), Källén et al. (2005), Klemetti et al. (2005), Knoester et al. (2008), Halliday et al. (2010) y Farhangniya et al. (2013). Durante nuestro estudio, obtuvimos una tasa de malformaciones congénitas en recién nacido de un 3,3%, similar a la obtenida por Bonduelle et al. (2002) que obtuvo un 4,4%. La tasa de malformaciones congénitas obtenida en el grupo de embarazos únicos (1,2%) fue muy similar a la obtenida por Ombelet et al. (2005) y Farhi et al. (2013), los cuales obtienen un 2,1% y 2,5%, respectivamente. Estos resultados sugieren que el uso de la PTX durante la ICSI no es tóxico. Esta inocuidad se debería a que durante nuestro estudio, los ovocitos nunca estuvieron expuestos a la PTX. Los espermatozoides seleccionados fueron aislados y lavados en un medio que contiene PVP sin PTX antes de la ICSI.

La frecuencia de malformaciones congénitas en embarazos múltiples fue mayor que en los embarazos únicos, aunque sin alcanzar la significación estadística. La literatura que evalúa las posibles diferencias de las malformaciones entre embarazos múltiples y únicos es controvertida. Qin et al. (2016) realizó un meta-análisis y mostró que existe un mayor riesgo de malformaciones congénitas en gemelos DZT nacidos tras TRA respecto a los DZT de gestaciones espontáneas, mientras que Bendsorp et al. (2016) no encuentra diferencia alguna. Estas discrepancias pueden deberse a los diferentes criterios de definición de las malformaciones congénitas (Lacamara et al., 2017). Así, los hallazgos observados pueden ser diferentes según las malformaciones congénitas que se consideren, ya que pueden ser mayores o menores y pueden conducir a una estimación de riesgo menos precisa cuando se combinan ambas (Lacamara et al., 2017).

Por otro lado, existen varios autores que asocian alteraciones epigenéticas con las TRA, especialmente cuando la técnica usada es la ICSI (Cox et al., 2002; DeBaun et al., 2003; Gicquel et al., 2003; Moll et al., 2003). Estos síndromes incluyen el de Beckwith Wiedemann, síndrome de Angelman y retinoblastomas. Tras el uso de ICSI-PTX no se han encontrado trastornos epigenéticos.

Hemos encontrado una serie de limitaciones en nuestro estudio. En primer lugar, la falta de un adecuado grupo de control, ya que los resultados se han comparado con datos históricos publicados anteriormente sobre una gran cohorte de recién nacidos tras ICSI entre 1983 y 1999 en Bélgica (Bonduelle et al., 2002), por lo que no puede considerarse estrictamente un grupo control ideal para nuestro estudio. El grupo control ideal para el estudio de las malformaciones congénitas tras TRA debería ser un grupo de parejas infértiles que logran concebir de forma natural, sin ningún tratamiento de infertilidad (Retzlöff and Hornstein, 2003; Rimm et al., 2004). Pero en la práctica este grupo es muy difícil de encontrar por su propia definición. También hubiera sido interesante, dado que la mayoría de los recién nacidos del estudio derivaron de ciclos de ICSI-PTX con espermatozoides testiculares, un grupo control mediante ICSI sin PTX con espermatozoides testiculares. Desafortunadamente,

no encontramos tal grupo control en la literatura. Otra opción interesante hubiese sido comparar nuestros resultados con los de ciclos de FIV-PTX, sin embargo, este procedimiento se realiza muy poco, pues el uso de la PTX en una FIV convencional no ha resultado muy satisfactorio (Dimitriadou et al., 1995, Tournaye et al., 1994). Por todo lo anterior, realizamos la comparación con los recién nacidos mediante ICSI.

Otra limitación sería el método de detección de las malformaciones. Los recién nacidos considerados para el estudio realizado por Bonduelle et al. (2002) se sometieron a un examen físico *ad hoc* durante el estudio de seguimiento clínico, mientras que los datos de nuestro estudio han sido obtenidos de los padres, no de informes médicos. Por esta razón, la tasa de malformaciones congénitas obtenida puede ser subestimada, siendo la tasa real mayor de lo que indican los resultados. Únicamente recopilamos la información neonatal y no el seguimiento de la mayoría de los recién nacidos. Sin embargo, dos tercios de las malformaciones mayores fueron detectadas durante los primeros siete días de vida, por lo que podemos suponer que los resultados en cuanto a las malformaciones congénitas no están lejos de la realidad.

Otra limitación de nuestro estudio sería que el tamaño muestral no es suficiente para poder estimar el posible efecto de factores de confusión como la edad de los padres, origen de los espermatozoides, uso de ovocitos/embriones vitrificados, paridad, hábito de fumar, IMC y causa de esterilidad. Respecto a este último factor, cabe destacar que la causa de la esterilidad masculina severa también se considera como posible factor de confusión al estudiar las malformaciones congénitas en los recién nacidos, particularmente la criptorquidia e hipospadias (Asklund et al., 2007; Fedder et al., 2013; Skakkebæk et al., 2001). Sin embargo, dado que no se observa un aumento en el riesgo de malformaciones, no parece necesario un análisis específico de estos factores de confusión.

En consideración a lo comentado anteriormente, consideramos como punto fuerte de nuestro estudio, el método de cálculo de la tasa de malformaciones congénitas, ya que como sugirió Bertelsmann et al. (2008) hemos considerado no solo las encontradas en recién nacidos, sino también en mortinatos y abortos inducidos, como recomienda EUROCAT. Otros puntos fuertes de nuestro estudio son la novedad de éste, el carácter multicéntrico e internacional, y el tamaño muestral, que según se estimó, es capaz de detectar aumentos estadísticamente significativos para las malformaciones neonatales en una cohorte de recién nacidos mediante TRA.

CONCLUSIONES

1. La monoterapia con DRV/r frente al VIH es una opción terapéutica segura, manteniendo la CV plasmática y seminal, similares a la triterapia.
2. La monoterapia con DRV/r no afecta a la calidad seminal en pacientes con VIH⁺ que han recibido tratamiento con triterapia.
3. La infección en varones VIH⁺ en tratamiento con triterapia no afecta a la cinética del desarrollo ni a la calidad de los embriones obtenidos por ICSI.
4. En parejas con varón VIH⁺ sometidas a ICSI se recomienda realizar transferencia de embrión único.
5. El uso de la PTX en ciclos de ICSI para inducir la movilidad espermática en casos de astenozoospermia absoluta o extrema, no parece ser perjudicial.
6. Creemos necesario ampliar el número de recién nacidos tras ICSI-PTX estudiados, así como el período de seguimiento de éstos, para poder obtener conclusiones definitivas sobre la seguridad de su uso.

BIBLIOGRAFÍA

Adler-Levy Y, Lunenfeld E, Levy A. Obstetric outcome of twin pregnancies conceived by in vitro fertilization and ovulation induction compared with those conceived spontaneously. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;133:173-178.

Aflatoonian A, Karimzadeh Maybodi MA, Aflatoonian N, Tabibnejad N, Amir-Arjmand MH, Soleimani M et al. Perinatal outcome in fresh versus frozen embryo transfer in ART cycles. *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2016;14:167-172.

Agence de BioMédecine. Liste des Procédés biologiques régulièrement utilisés en AMP et des techniques visant à améliorer les procédés biologiques autorisés. 2013. <http://www.agencebiomedecine.fr/Procedes-et-techniques-d-AMP?lang=fr#1>.

Aguilar J, Motato Y, Escribá MJ, Ojeda M, Muñoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online.* 2014;28:475-484.

Ahlstrom A, Park H, Bergh C, Selleskog U, Lundin K. Conventional morphology performs better than morphokinetics for prediction of live birth after day 2 transfer. *Reprod Biomed Online.* 2016;33:61-70.

Alcamí J, Bermejo M, García J, González N, Coyras M, Mateos E, et al. Inmunopatología del sida. En: Gatell JM, Clotet B et al., editores. *Guía práctica del SIDA, clínica, diagnóstico y tratamiento.* Barcelona: Elsevier Doyma S.L.; 2007. p. 21-47.

Al-Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrich K, Schultze-Mosgau A. Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing?. *Reprod Biomed Online.* 2007;14:288-293.

Alikani M and Cohen J. Patterns of cell fragmentation in the human embryo. *J Assist Reprod Genet.* 1995;12:28s.

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M and Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Hum Reprod.* 2000;15:2634-2643.

Allen VM, Wilson RD, Cheung A; Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada, Reproductive Endocrinology Infertility Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. *J Obstet Gynaecol Can.* 2006;28:220-233.

Anderson DJ and Politch JA. Providing fertility care to HIV-1 serodiscordant couples: a biologist's point of view. *Am J Bioeth.* 2003;3:47-49.

Antczak M and Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod.* 1999;14:429-447.

Aparicio B, Cruz M, Meseguer M. Is morphokinetic analysis the answer? *Reprod Biomed Online.* 2013;27:654-663.

Aragonés M, Herrero R, Cabañes I, Mifsud A, de Pablo J and Mínguez Y. Biopsia Embrionaria. En: Remohí J, editor. *Manual práctico de reproducción humana.* Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España; 2004. p. 483-491.

Ardoy M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa M, Herrero R, Moreno J, et al. Cuadernos de embriología clínica. II Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Madrid: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR); 2008.

Arenas-Pinto A, Stöhr W, Jäger HR, Haddow L, Clarke A, Johnson M, et al. Neurocognitive sub-study Team. Neurocognitive function and neuroimaging markers in virologically suppressed HIV-positive patients randomized to ritonavir-boosted protease inhibitor monotherapy or standard combination ART: A cross-sectional substudy from the PIVOT Trial. *Clin Infect Dis.* 2016;63:257-264.

Arribas JR, Horban A, Gerstoft J, Fätkenheuer G, Nelson M, Clumeck N, et al. The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. *AIDS.* 2010;24:223-230.

Arribas JR, Pulido F, Delgado R, Lorenzo A, Miralles P, Arranz A, et al. Lopinavir/ ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1 viral suppression 48-week results of a randomized, controlled, open-label, proof- of-concept pilot clinical trial (OK study). *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;40:280-287.

Arikawa M, Jwa SC, Kuwahara A, Irahara M, Saito H. Effect of semen quality on human sex ratio in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: an analysis of 27,158 singleton infants born after fresh single-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2016;105:897-904.

Ashorn P, McQuade T, Thaisrivongs S et al. An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:7472.

Asklund, C., Jørgensen, N., Skakkebæk, N.E., Jensen, T.K. Increased frequency of reproductive health problems among fathers of boys with hypospadias. *Hum. Reprod*. 2007;22:2639–2646.

ASRM. Guidelines for reducing the risk of viral transmission during fertility treatment. *Fertil Steril*. 2008;90:S156-162.

Avery S and Brinsden PR. Making the best use of human embryos. *J Assist Reprod Genet*. 1999;16:457-459.

Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod*. 2012;27:2649-57.

Baeten JM, Donnell D, Ndase P, Mugo NR, Campbell JD, Wangisi J, et al. Partners PrEP Study Team. Antiretroviral prophylaxis for HIV prevention in heterosexual men and women. *N Engl J Med*. 2012;367:399-410.

Balaban B and Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:608-615.

Balakier H and Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod*. 1997;12:800-804.

Barnes A, Riche D, Mena L, Sison T, Barry L, Reddy R, et al. Efficacy and safety of intrauterine insemination and assisted reproductive technology in populations serodiscordant for human immunodeficiency virus: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014;102:424-434.

Barreiro P, del Romero J, Leal M, Hernando V, Asencio R, de Mendoza C, et al. Natural pregnancies in HIV-serodiscordant couples receiving successful antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006a;43:324-326.

Barreiro P, Duerr A, Beckerman K and Soriano V. Reproductive options for HIV-serodiscordant couples. *AIDS Rev*. 2006b;8:158-170.

Barreiro P, Castilla JA, Labarga P, Soriano V. Is natural conception a valid option for HIV-serodiscordant couples? *Hum Reprod*. 2007;22(9):2353-2358.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:868-871.

Basile N, Morbeck D, García-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod*. 2013;28:634-641.

Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod*. 2015;30:276-283.

Bay B, Ingerslev HJ, Lemmen JG, Degn B, Rasmussen IA, Kesmodel US. Preimplantation genetic diagnosis: a national multicenter obstetric and neonatal follow-up study. *Fertil Steril*. 2016;106:1363-1369.

Belva F, Henriët S, Van den Abbeel E, Camus M, Devroey P, Van der Elst J, et al. Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles. *Hum Reprod*. 2008;23:2227-2238.

Bensdorp AJ, Tjon-Kon-Fat RI, Bossuyt PM, Koks CA, Oosterhuis GJ, Hoek A, et al. Prevention of multiple pregnancies in couples with unexplained or mild male subfertility: randomised controlled trial of in vitro fertilisation with single embryo transfer or in vitro fertilisation in modified natural cycle compared with intrauterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation. *BMJ*. 2015;9:350:g7771.

Bensdorp AJ, Hukkelhoven CW, van der Veen F, Mol BW, Lambalk CB, van Wely M. Dizygotic twin pregnancies after medically assisted reproduction and after natural conception: maternal and perinatal outcomes. *Fertil Steril*. 2016;106:371-377.

Bertelsmann H, de Carvalho Gomes H, Mund M, Bauer S, Matthias K. The risk of malformation following assisted reproduction. *Dtsch Arztebl Int*. 2008;105:11-17.

Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M: Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;17:CD002118.

Blanes Zamora R, Vaca Sánchez R, González Pérez J, Báez Quintana D, Rodríguez Díaz R, Alberto Bethencourt JC. The use of pentoxifylline improves sperm mobility in cases of ICSI with TESE. *Rev Int Androl*. 2008;6:242-248.

Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod.* 2002;17:671-694.

Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, et al. A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod.* 2005;20:413-419.

Bourlet T, Caro V, Minjolle S, Jusselin I, Pozzetto B, Crainic R, et al. New PCR test that recognizes all human prototypes of enterovirus: application for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1750-1752.

Boulet SL, Schieve LA, Nannini A, Ferre C, Devine O, Cohen B, et al. Perinatal outcomes of twin births conceived using assisted reproduction technology: a population-based study. *Hum Reprod.* 2008;23:1941-1948.

Bras M, Lens J, Piederiet M, Rijnders P and Verveld M. *IVF Lab. Laboratory Aspects of In Vitro Fertilization.* Amsterdam: Organon; 1996.

Bruyere, H.J., Jr., Matsuoka, R., Carlsson, E., Cheung, M.O., Dean, R., Gilbert, E.F. Cardiovascular malformations associated with administration of prenatal terol to young chick embryos. *Teratology.* 1983;28:75-82.

Buchacz K, van der Straten A, Saul J, Shiboski SC, Gomez CA and Padian N. Sociodemographic, behavioral, and clinical correlates of inconsistent condom use in HIV-serodiscordant heterosexual couples. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001;28:289-297.

Bujan L, Sergerie M, Moinard N, Martinet S, Porte L, Massip P, et al. Decreased semen volume and spermatozoa motility in HIV-1-infected patients under antiretroviral treatment. *J Androl.* 2007;28:444-452.

Bujan L, Pasquier C. People living with HIV and procreation: 30 years of progress from prohibition to freedom? *Hum Reprod.* 2016;31:918-925.

Bunupuradah T, Bowonwattanuwong C, Jirajariyavej S, Munsakul W, Klinbuayaem V, Sophonphan J, et al. HIV STAR Study team. HIV-1 genital shedding in HIV-infected patients randomized to second-line lopinavir/ritonavir monotherapy versus tenofovir/lamivudine/lopinavir/ritonavir. *Antivir Ther.* 2014;19:579-586.

Buonocore L and Rose JK. Prevention of HIV-1 glycoprotein transport by soluble CD4 retained in the endoplasmic reticulum. *Nature*. 1990;345:625-628.

Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod Biomed Online*. 2013;27:140-146.

Carter EB, Bishop KC, Goetzinger KR, Tuuli MG, Cahill AG. The impact of chorionicity on maternal pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213:390.e1-7.

Castilla JA, Magán R. Seguridad Biológica en el Laboratorio de Reproducción Asistida. Aula de Formación en Embriología Clínica nº 4. Gráficas Fernando. Granada. 2003.

Centers for Disease Control and Prevention. Classification system for human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus infections. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1986;35:334-9.

Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1992;41:1-17.

Centers for Disease Control and Prevention. Revised guidelines for HIV counseling, testing, and referral. *MMWR Recomm Rep*. 2001;50:1-57.

Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, et al. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30:703-710.

Chang HJ, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH.: Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2009;91:2381-2390.

Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril*. 2013;99:1035-1043.

Chen L, Xu Z, Zhang N, Wang B, Chen H, Wang S, et al. Neonatal outcome of early rescue ICSI and ICSI with ejaculated sperm. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31:823-828.

Chowers MY, Spina CA, Kwoh TJ, Fitch NJ, Richman DD and Guatelli JC. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol.* 1994;68:2906-2914.

Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F and Bahceci M. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril.* 2006;85:358-365.

Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media-a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29:891-900.

Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, et al. Time-Lapse User Group. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod.* 2014;29:2650-2660.

Clarke A, Johanssen V, Gerstoft J, Clotet B, Ripamonti D, Murungi A, et al. Analysis of neurocognitive function and CNS endpoints in the PROTEA trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues. *J Int AIDS Soc.* 2014; 17:19526.

Clavero A, Gonzalvo M and Castilla J. Aula de Formación en Embriología Clínica nº 7. Reflexiones sobre evaluación de donantes de gametos y embriones. Granada: Gráficas Fernando; 2007.

Cleary-Goldman J, Peña JE, Thornton MH 2nd, Robinson JN, D'Alton ME, Sauer MV. Obstetric outcomes of human immunodeficiency virus-1-serodiscordant couples following in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Am J Perinatol.* 2003;20:305-311.

Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stuppia L, Guanciali-Franchi P, Tiboni GM. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2005;20:437-442.

Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocyte vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril.* 2007;89:1657-1664.

Cobo A, Pérez S, De los Santos MJ, Zulategui J, Domingo J, Remohí J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:350-359.

Coffin JM. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;176:143-164.

Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 1995;267:483-489.

Coombs R, Speck C, Hughes J, Lee W, Sampoleo R, Ross S, Dragavon J, Peterson G, Hooton T, Collier A, Corey L, Koutsky L, Krieger JN. Association between culturable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in semen and HIV-1 RNA levels in semen and blood: evidence for compartmentalization of HIV-1 between semen and blood. *J Infect Dis*. 1998;177:320-330.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reprod Update*. 2010;16:231-245.

Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet*. 2002;71:162-164.

Croxatto H, Ortiz M, Diaz S, Hess R, Balmaceda J, Croxatto H. Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;132:629-634.

Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*. 2012;25:371-381.

Cruz M, Garrido N, Gadea B, Muñoz M, Pérez-Cano I, Meseguer M. Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model. *Reprod Biomed Online*. 2013;27:367-375.

Cuadros J, de los Santos MJ, Figueroa MJ, Hurtado de Mendoza MV, Prados FJ. Cuadernos De Embriología Clínica III. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. Madrid: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR); 2015.

Cullen B. HIV-1 Nef protein: An invitation to a kill. *Nat Med*. 1999;5:985-986.

Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1986;3:284-295.

Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online.* 2012;25:474-480.

Dar S, Lazer T, Shah PS, Librach CL. Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2014;20:439-448.

Daskalakis G, Anastasakis E, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. Second trimester amniocentesis in assisted conception versus spontaneously conceived twins. *Fertil Steril.* 2009;91:2572-2577.

Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, van Essen P, Priest K, Scott H, et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med.* 2012;366:1803-1813.

Dávila Garza, S.A., Patrizio, P. Reproductive outcomes in patients with male infertility because of Klinefelter's syndrome, Kartagener's syndrome, round-head sperm, dysplasia fibrous sheath, and 'stump' tail sperm: an updated literature review. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2013; 25:229-246.

Dawson, D.A., Bantle, J.A. Coadministration of methylxanthines and inhibitor compounds potentiates teratogenicity in *Xenopus* embryos. *Teratology.* 1987;35:221-227.

DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet.* 2003;72:156-160.

De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, et al. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod.* 2002;17:2402-2409.

De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11:595-597.

De Vos A, Janssens R, Vande Velde H, Haentjens P, Bonduelle M, Tournaye H, et al. The type of culture medium and the duration of in vitro culture do not influence birthweight of ART singletons. *Hum Reprod.* 2015;30:20-27.

de Ziegler D, Gambone JC, Meldrum DR, Chapron C. Risk and safety management in infertility and assisted reproductive technology (ART): from the doctor's office to the ART procedure. *Fertil Steril.* 2013;100:1509-1517.

De los Santos MJ, Arroyo G, Busquet A, Calderón G, Cuadros J, Hurtado de Mendoza MV, et al. A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live-birth rate. *Fertil Steril.* 2014;101:981-987.

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 (Baltimore).* 2016;95:e4398.

Delfraissy JF, Flandre P, Delaugerre C, Ghosn J, Horban A, Girard PM, Norton M, Rouzioux C, Taburet AM, Cohen-Codar I, Van PN, Chauvin JP. Lopinavir/ritonavir monotherapy or plus zidovudine and lamivudine in antiretroviral-naive HIV-infected patients. *AIDS.* 2008;22:385-393.

Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;20:12:54.

Desmyttere S, De Rycke M, Staessen C, Liebaers I, De Schrijver F, Verpoest W, et al. Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD. *Hum Reprod.* 2012;27:288-293.

Dimitriadou F, Rizos D, Mantzavinos T, Arvaniti K, Voutsina K, Prapa A, et al. The effect of pentoxifylline on sperm motility, oocyte fertilization, embryo quality, and pregnancy outcome in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril.* 1995;63:880-886.

Doğer E, Çakıroğlu Y, Ceylan Y, Ulak E, Özdamar Ö, Çalışkan E. Reproductive and obstetric outcomes in mosaic Turner's Syndrome: a cross-sectional study and review of the literature. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;10;13:59.

Domingo E, Martin V, Perales C, Grande-Perez A, Garcia-Arriaza J, Arias A. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;299:51-82.

Dondero F, Rossi T, D'Offizi G, Mazzilli F, Rosso R, Sarandrea N, et al. Semen analysis in HIV seropositive men and in subjects at high risk for HIV infection. *Hum Reprod.* 1996;11:765-768.

Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell.* 1996;85:1149-1158.

Dornadula G, Zhang H, VanUitert B, Stern J, Livornese L, Jr., Ingeman MJ, et al. Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA.* 1999;282:1627-1632.

Doyle T, Geretti AM. Low-level viraemia on HAART: significance and management. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25:17-25.

Dube M, Bego MG, Paquay C and Cohen EA. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology.* 2010;7:114.

Dulioust E, Du AL, Costagliola D, Guibert J, Kunstmann JM, Heard I, et al. Semen alterations in HIV-1 infected men. *Hum Reprod.* 2002;17:2112-2118.

Dunne AL, Mitchell F, Allen KM, Baker HW, Garland S, Clarke GN, Mijch A, Crowe SM. Analysis of HIV-1 viral load in seminal plasma samples. *J Clin Virol.* 2003;26:239-245.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.* 1996;381:667-673.

Dyer J, Gilliam B, Eron JJ, Grosso L, Cohen M, Fiscus S. Quantitation of human immunodeficiency virus type1 RNA in cell free seminal plasma: comparison of NASBA TM with Amplicor TM reverse transcription-PCR amplification and correlation with quantitative culture. *J Virol Methods.* 1996;60:161-170.

El-Chaar D, Yang Q, Gao J, Bottomley J, Leader A, Wen SW, Walker M. Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction. *Fertil Steril.* 2009;92:1557-1561.

Eldar-Geva T, Srebnik N, Altarescu G, Varshaver I, Brooks B, Levy-Lahad E, Bromiker R, Schimmel MS. Neonatal outcome after preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 2014;102:1016-1021.

Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP, Liesnard C, Place I, Vannin AS, et al. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. *Hum Reprod Update*. 2004;10:149-162.

ESHRE Capri Workshop Group. Intrauterine insemination. *Hum Reprod Update*. 2009;15:265-277.

EUROCAT Guide 1.4 and Reference Documents. European surveillance of congenital anomalies (EUROCAT) Guide 1.4 and Reference Documents. 2013.

Fanchin R, Ayoubi J, Righini C. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod*. 2001;16:1115-1119.

Farhangniya M, Dortaj Rabori E, Mozafari Kermani R, Haghdooost AA, Bahrampour A, Bagheri P, et al. Comparison of Congenital Abnormalities of Infants Conceived by Assisted Reproductive Techniques versus Infants with Natural Conception in Tehran. *Int J Fertil Steril*. 2013;7:217-224.

Farhi A, Reichman B, Boyko V, Mashiach S, Hourvitz A, Margalioth EJ, et al. Congenital malformations in infants conceived following assisted reproductive technology in comparison with spontaneously conceived infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013;26:1171-1179.

Farquhar, C., Rishworth, J.R., Brown, J., Nelen, W.L., Marjoribanks, J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2015:CD010537.

Fedder, J., Loft, A., Parner, E.T., Rasmussen, S., Pinborg, A. Neonatal outcome and congenital malformations in children born after ICSI with testicular or epididymal sperm: a controlled national cohort study. *Hum. Reprod*. 2013;28:230-240.

Feinberg MB, Baltimore D and Frankel AD. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:4045-4049.

Fernández-Shaw S, Bruna I, Arroyo G, Carrera M, Gris JM, Fernández M, et al. Resultados gestacionales de los tratamientos de reproducción asistida en España. Año 2008. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 2010;27:489-498.

Feng Y, Broder C, Kennedy P, Berger E . HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996;272:872-877.

FIGO Committee for the Ethical Aspects of Human Reproduction and Women's Health. HIV and fertility treatment *Int J Gynaecol Obstet.* 2006;93:187-188.

Fiscus SA, Brambilla D, Coombs RW, Yen-Lieberman B, Bremer J, Kovacs A, et al. Multicenter evaluation of methods to quantitate human immunodeficiency virus type 1 RNA in seminal plasma. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2348-2353.

Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, et al. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature.* 1986;320:367-371.

Fisher, D.L., Gunaga, K.P. Theophylline induced variations in cyclic AMP content of the superovulated preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 1975;12:471-476.

Fourie JM, Loskutoff N, Huyser C. Semen decontamination for the elimination of seminal HIV-1. *Reprod Biomed Online.* 2015;30:296-302.

Furnes C, Andresen V and Szilvay AM. Functional rescue of an oligomerization-defective HIV-1 Rev mutant by fusion with an oligomeric tag. *Arch Virol.* 2008;153:357-362.

Gaddis NC, Chertova E, Sheehy AM, Henderson LE and Malim MH. Comprehensive investigation of the molecular defect in vif-deficient human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol.* 2003;77:5810-5820.

Galán A, Campos P, Blanco C, Salinas R, Pérez S, Cobo A. Inseminación de los ovocitos. En: Remohí J, editor. *Manual práctico de reproducción humana.* Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España; 2004. p. 358-361.

Galbis MC, Remohí J, Pellicer A, Garrido N. Lavado seminal en varones seropositivos para el VIH. ¿Está todo resuelto? *Rev ASEBIR.* 2012;17:28-38.

Gallinelli A, Roncaglia R, Matteo ML, Ciaccio I, Volpe A, Facchinetti F. Immunological changes and stress are associated with different implantation rates in patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2001;76:85-91.

Gaona Arreola R, Cejudo Carranza E, Hernández Gurrola L. Síndrome de hiperestimulación ovárica. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción.* 2010;2:67-73.

Garbers, D.L., First, N.L., Sullivan, J.J., Lardy, H.A. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biol. Reprod.* 1971;5:336-339.

Garcia JV, Miller AD. Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res Virol.* 1992;143:52-55.

Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, et al. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod.* 1999;14:2588-2595.

Garrido N, Meseguer M, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod.* 2005;20:1028-1034.

Gasol Boncompte M., Padullés Zamora N., Podzamczer Alter D. Monoterapia antirretroviral en el paciente adulto. *Butlletí d'informació terapèutica. Generalitat de Catalunya. Departament de Salut.* 2013;24:24-30.

Gathe Jr JC, Washington M, Mayberry C, Piot D, Nemecek J. IMANI I Pilot Study of the Safety and Efficacy of Kaletra (LPV/r) as single drug HAART in HIV + 1 ARV Naïve Patients. Interim analysis of subjects completing final 48 Week data. *Int Conf AIDS.* 2004. Abstract n° MoOrB1057.

Gathe Jr JC, Yeh RF, Mayberry C, Nemecek J, Miguel B, Lipman B, et al. Single-agent Therapy with Lopinavir/ritonavir Suppresses Plasma HIV-1 Viral Replication in HIV-1 Naïve Subjects: IMANI-2 48-Week Results. 4th IAS Conference, 22-25 July 2007 Poster # WEPEB034.

Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G and Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology.* 1987;156:171-176.

Ghosn J, Chaix ML, Peytavin G, Bresson JL, Galimand J, Girard PM, et al. Absence of HIV-1 shedding in male genital tract after 1 year of first-line lopinavir/ ritonavir alone or in combination with zidovudine/lamivudine. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:1344-1337.

Ghosn J, Flandre P, Cohen-Codar I, Girard PM, Chaix ML, Raffi F, Dellamonica P, Ngovan P, Norton M, Delfraissy JF; MONARK Study Group. Long-term (96-week) follow-up of antiretroviral-naïve HIV-infected patients treated with first-line lopinavir/ritonavir monotherapy in the MONARK trial. *HIV Med.* 2010;11:137-142.

Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1338-1341.

Ginström Ernstad E, Bergh C, Khatibi A, Källén KB, Westlander G, Nilsson S, et al. Neonatal and maternal outcome after blastocyst transfer: a population-based registry study. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;214:378.e1–378.e10.

Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod*. 1995;10:2427-2431.

Girard PM, Antinori A, Arribas JR, Ripamonti D, Bicer C, Netzle-Sveine B, et al. Week 96 efficacy and safety of darunavir/ritonavir monotherapy vs. darunavir/ritonavir with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in the PROTEA trial. *HIV Med*. 2017;18:5-12.

Gordon JW. Micromanipulation of gametes and embryos may be a risk for human germ-line gene transfer. *Fertil Steril*. 2002;78:455-459.

Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril*. 1981;35:662-665.

Gottlinger H, Sodroski J, Haseltine W. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86:5781-5785.

Grady R, Alavi N, Vale R, Khandwala M, McDonald SD. Elective single embryo transfer and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012;97:324-331.

Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*. 2001;357:1149-1153.

Griveau, J.F., Lobel, B., Laurent, M.C., Michardière, L., Le Lannou, D. Interest of pentoxifylline in ICSI with frozen-thawed testicular spermatozoa from patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:14-18.

Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RR, Carmo MT, Dell'Aqua JA Jr, Crespilho AM, et al. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci*. 2017;179:27-34.

Guía de Reproducción Asistida en el Sistema Sanitario Público de Andalucía. 2016. Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud. Junta de Andalucía.

Günthard HF, Havlir DV, Fiscus S, Zhang ZQ, Eron J, Mellors J, et al. Residual human immunodeficiency (HIV) type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *J Infect Dis.* 2001;183:1318-1327.

Gutmann C, Cusini A, Günthard HF, Fux C, Hirschel B, Decosterd LA, et al. the Swiss HIV Cohort Study (SHCS). Randomized controlled study demonstrating failure of LPV/r monotherapy in HIV: the role of compartment and CD4-nadir. *AIDS.* 2010; 24:2347-2354.

Halliday JL, Ukoumunne OC, Baker HW, Breheny S, Jaques AM, Garrett C, et al. Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. *Hum Reprod.* 2010;25:59-65.

Hansen M, Colvin L, Petterson B, Kurinczuk JJ, de Klerk N, Bower C. Twins born following assisted reproductive technology: perinatal outcome and admission to hospital. *Hum Reprod.* 2009;24:2321-2331.

Hansen M, Kurinczuk JJ, Milne E, Klerk N, Bower C Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013;19:330-353.

Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod.* 2001;16:313-318.

Harouse JM, Bhat S, Spitalnik SL, Laughlin M, Stefano K, Silberberg DH, et al. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science.* 1991;253:320-323.

Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update.* 2012;18:234-247.

Harrison GP, Lever AM. The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol.* 1992;66:4144-4153.

Hashimoto S, Kato N, Saeki K, Morimoto Y. Selection of high-potential embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril.* 2012;97:332-337.

Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:7311-7315.

Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2004;328:261-265.

Henningsen AA, Gissler M, Skjaerven R, Bergh C, Tiitinen A, Romundstad LB, et al. Trends in perinatal health after assisted reproduction: a Nordic study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod*. 2015;30:710-716.

Henningsen AA, Wennerholm UB, Gissler M, Romundstad LB, Nygren KG, Tiitinen A, et al. Risk of stillbirth and infant deaths after assisted reproductive technology: a Nordic study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod*. 2014;29:1090-1096.

Herrero J, Tejera A, Albert C, Vidal C, de los Santos MJ, Meseguer M. A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertil Steril*. 2013;100:1602-1609.e1-4.

Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM, 3rd, Osteen KG, et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*. 1989;52:801-806.

Hlinka D, Kalatova B, Uhrinova I, Dolinksa S, Rutarova J, Rezacova J, et al. Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. *Physiol Res*. 2012;61:513-525.

Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod*. 2004;19:288-293.

Hoffman RM, Jaycocks A, Vardavas R, Wagner G, Lake JE, Mindry D, et al. Benefits of PrEP as an Adjunctive Method of HIV Prevention During Attempted Conception Between HIV-uninfected Women and HIV-infected Male Partners. *J Infect Dis*. 2015;212:1534-1543.

Hoglund S, Ohagen A, Lawrence K, Gabuzda D. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology*. 1994;201:349-355.

Holte J, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Hum Reprod*. 2007;22:548-557.

Hsiou, Y, Ding, J, Das, K, Clark AD Jr, Hughes SH, Arnold E. Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure*. 1996;4:853-860.

Hurtado de Mendoza MV, González-Utor AL, Cruz N, Gutiérrez P, Cascales F, Sillero JM. In situ use of pentoxifylline to assess sperm vitality in intracytoplasmic sperm injection for treatment of patients with total lack of sperm movement. *Fertil Steril*. 2000;74:176-177.

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision, 2010. www.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/

Jacks T, Power M, Masiarz F, Luciw P, Barr P; Varmus H. Characterization of ribosomal frameshifting in VIH-1 Gag-Pol expression. *Nature*. 1988;331:280-283.

Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 1998;70:60-66.

Jackson RA, Gibson KA, Croughan MS. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: A meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2004;103:551-563.

James AN, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod*. 2006;21:1599-1604.

Nicopoulos JD, Almeida PA, Ramsay JW, Gilling-Smith C. The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. *Hum Reprod*. 2004;19:2289-2297.

Nicopoulos JD, Almeida P, Vourliotis M, Goulding R, Gilling-Smith C. A decade of sperm washing: clinical correlates of successful insemination outcome. *Hum Reprod*. 2010;25:1869-1876.

Jerónimo A, Baza MB, Río I, Vera M, Hernando V, Castilla J, et al. Factors associated with seminal impairment in HIV-infected men under antiretroviral therapy. *Hum Reprod*. 2017;32:265-271.

Jindal SK, Rawlins RG, Muller CH, Drobnis EZ. Guidelines for risk reduction when handling gametes from infectious patients seeking assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online*. 2016;33:121-30.

Johansson M, Hardarson T, Lundin K. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Genet*. 2003;20:309-313.

Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol.* 1995;69:6304-6313.

Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000;15:2390-2393.

Källén B, Finnström O, Nygren KG, Olausson PO. In vitro fertilization (IVF) in Sweden: risk for congenital malformations after different IVF methods. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005;73:162-169.

Kalichman SC, Rompa D, Luke W, Austin J. HIV transmission risk behaviours among HIV-positive persons in serodiscordant relationships. *Int J STD AIDS.* 2002;13:677-682.

Kalra SK, Ratcliffe SJ, Barnhart KT, Coutifaris C. Extended embryo culture and an increased risk of preterm delivery. *Obstet Gynecol.* 2012;120:69-75.

Kao SY, Calman AF, Luciw PA and Peterlin BM. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature.* 1987;330:489-493.

Kaplan AH. Assembly of the HIV-1 core particle. *AIDS Rev.* 2002;4:104-111.

Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2014;20:617-631.

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;62:173-176.

Katz RA, Skalka AM. Generation of diversity in retroviruses. *Annu Rev Genet.* 1990;24:409-445.

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;284:229-233.

Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2013;28:2643-2451.

Klemetti R, Gissler M, Sevón T, Koivurova S, Ritvanen A, Hemminki E. Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies. *Fertil Steril.* 2005;84:1300-1307.

Klein J, Pena JE, Thornton MH, Sauer MV. Understanding the motivations, concerns, and desires of human immunodeficiency virus 1-serodiscordant couples wishing to have children through assisted reproduction. *Obstet Gynecol.* 2003;101:987-994.

Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol.* 1990;64:621-629.

Klonoff-Cohen H, Chu E, Natarajan L, Sieber W. A prospective study of stress among women undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril.* 2001;76:675-687.

Knoester M, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP, van der Westerlaken LA, Walther FJ, Veen S; Leiden Artificial Reproductive Techniques Follow-up Project (L-art-FUP). Perinatal outcome, health, growth, and medical care utilization of 5- to 8-year-old intracytoplasmic sperm injection singletons. *Fertil Steril.* 2008;89:1133-1146.

Knopman JM, Krey LC, Oh C, Lee J, McCaffrey C, Noyes N. What makes them split? Identifying risk factors that lead to monozygotic twins after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2014;102:82-89.

Kogan M, Rappaport J. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology.* 2011;8:25.

Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:4686-4690.

Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science.* 1992;256:1783-1790.

Koudstaal J, Braat DD, Bruinse HW, Naaktgeboren N, Vermeiden JP, Visser GH. Obstetric outcome of singleton pregnancies after IVF: a matched control study in four Dutch university hospitals. *Hum Reprod.* 2000;15:1819-1825.

Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *J Androl.* 2006;27:45-52.

Krieger JN, Coombs RW, Collier AC, Koehler JK, Ross SO, Chaloupka K, et al. Fertility parameters in men infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 1991;164:464-469.

Lacamara C, Ortega C, Villa S, Pommer R, Schwarze JE. Are children born from singleton pregnancies conceived by ICSI at increased risk for congenital malformations when compared to children conceived naturally? A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assist Reprod.* 2017;21:251-259.

Lama J, Mangasarian A, Trono D. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef and Vpu inhibitable manner. *Current Biology.* 1999;9:622-631.

Lambert-Niclot S, Peytavin G, Duvivier C, Poirot C, Algarte-Genin M, Pakianather S, et al. Low frequency of intermittent HIV-1 semen excretion in patients treated with darunavir-ritonavir at 600/100 milligrams twice a day plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors or monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4910-4913.

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;83:1391-1394.

Lambert-Niclot S, Tubiana R, Beaudoux C, Lefebvre G, Caby F, Bonmarchand M, et al. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002-2011 survey. *AIDS.* 2012;26:971-975.

Larman MG, Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2007;15:692-700.

Lazar DC, Morris KV, Saayman S. The emerging role of long non-coding RNAs in HIV infection. *Virus Res.* 2016;212:114-126.

Le Rouzic E and Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology.* 2005;2:11.

Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using timelapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:385-391.

Levi Setti PE, Moioli M, Smeraldi A, Cesaratto E, Menduni F, Livio S, et al. Obstetric outcome and incidence of congenital anomalies in 2351 IVF/ICSI babies. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33:711-777.

Levin BR, Bull JJ, Stewart FM. Epidemiology, Evolution and Future of the HIV/AIDS Pandemic. *Emerging Infectious Diseases*. 2001;7:505-511.

Levy JA. HIV and the pathogenesis of AIDS. Washington: ASM Press; 1998.

Levy JA. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS*. 1993;7:1401-1410.

Liang C, Wainberg MA. The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev*. 2002;4:41-49.

Limkait T, Strebel K, Hoggan M et al. The human immunodeficiency virus type 1- specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol*. 1990;64:621-629.

Liu SY, Teng B, Fu J, Li X, Zheng Y, Sun XX. Obstetric and neonatal outcomes after transfer of vitrified early cleavage embryos. *Hum Reprod*. 2013;28:2093-2100.

Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse videography of human embryos: Using pronuclear fading rather than insemination in IVF and ICSI cycles removes inconsistencies in time to reach early cleavage milestones. *Reprod Biol*. 2015;15:122-125.

López Chicharro J, López Mojares LM. *Fisiología clínica del ejercicio*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008.

López-Regalado ML, Clavero A, Gonzalvo MC, Serrano M, Martínez L, Mozas J, Rodríguez-Serrano F, Fontes J, Castilla JA. Randomised clinical trial comparing elective single-embryo transfer followed by single-embryo cryotransfer versus double embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;178:192-198.

Lorusso F, Palmisano M, Chironna M, Vacca M, Masciandaro P, Bassi E, et al. Impact of chronic viral diseases on semen parameters. *Andrologia*. 2010;42:121-126.

Loskutoff NM, Huyser C, Singh R, Walker DL, Thornhill AR, Morris L, et al. Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. *Fertil Steril*. 2005;84:1001-1010.

Loughlin KR, Agarwal A. Use of theophylline to enhance sperm function. *Arch Androl*. 1992;28:99-103.

Loutradi K, Kolobianakis E, Venetis C, Papanikolaou E, Pados G, Bontis I et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008;90:186-193.

Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinou S, Michalakis S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1999;72:240-244.

Lowe SH, Sankatsingha SU, Repping S, Van der Veen F, Reiss P, Lange JM, et al. Is the male genital tract really a sanctuary site for HIV? Arguments that it is not. *AIDS*. 2004;18:1353-1362.

Lozano F, Domingo P. Tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:455-465.

Ludwig M, Schopper B, Al-Hasani S, Diedrich K. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod*. 2000;15:325-329.

Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*. 2001;16:2652-2657.

Lyerly AD, Anderson J. Human immunodeficiency virus and assisted reproduction: reconsidering evidence, reframing ethics. *Fertil Steril*. 2001;75:843-58.

Maalouf WE, Mincheva MN, Campbell BK, Hardy IC. Effects of assisted reproductive technologies on human sex ratio at birth. *Fertil Steril*. 2014;101:1321-1325.

Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986;47:333-348.

Maheshwari A, Bhattacharya S. Elective frozen replacement cycles for all: ready for prime time? *Hum Reprod*. 2013;28:6-9.

Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012;98:368-377.

Maheshwari A, Kalampokas T, Davidson J, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of blastocyst-stage versus cleavage-stage embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2013;100:1615–1621.

Malchau SS, Loft A, Henningsen AK, Nyboe Andersen A, Pinborg A. Perinatal outcomes in 6,338 singletons born after intrauterine insemination in Denmark, 2007 to 2012: the influence of ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2014;102:1110-1116.e2.

Malim MH and Emerman M. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe.* 2008;3:388-398.

Manigart Y, Rozenberg S, Barlow P, Gerard M, Bertrand E, Delvigne A. ART outcome in HIV infected patients. *Hum Reprod.* 2006;21:2935-2940.

Marcelin AG, Tubiana R, Lambert-Niclot S, Lefebvre G, Dominguez S, Bonmarchand M, et al. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. *AIDS.* 2008;22:1677-1679.

Marina S, Marina F, Alcolea R, Nadal J, Exposito R, Huguet J. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man. *Hum Reprod.* 1998;13:3247-3249.

Martínez-Burgos M, Herrero L, Megías D, Salvanes R, Montoya MC, Cobo AC, et al. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on orphologic apparence, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil Steril.* 2011;95:374-377.

Mashiach R, Stockheim D, Zolti M, Orvieto R. Case Report: Delayed intra-abdominal bleeding following trans-vaginal ultrasonography guided oocyte retrieval for in vitro fertilization in patients at risk for thrombo-embolic events under anticoagulant therapy. *F1000Res.* 2013;2:189.

Mathis S, Khanlari B, Pulido F, Schechter M, Negrodo E, Nelson M, et al. Effectiveness of protease inhibitor monotherapy versus combination antiretroviral maintenance therapy: a meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6:e22003.

Matorras R, Hernández J. 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. Madrid: Adalia; 2007.

Matthews LT, Baeten JM, Celum C and Bangsberg DR. Periconception pre-exposure prophylaxis to prevent HIV transmission: benefits, risks, and challenges to implementation. *AIDS*. 2010;24:1975-1982.

McKinney KA, Lewis SE, Thompson W. Persistent effects of pentoxifylline on human sperm motility, after drug removal, in normozoospermic and asthenozoospermic individuals. *Andrologia*. 1994;26:235-240.

Melo MA, Meseguer M, Bellver J, Remohí 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;89:141-150.

Meredith LW, Sivakumaran H, Major L, Suhrbier A and Harrich D. Potent inhibition of HIV-1 replication by a Tat mutant. *PLoS One*. 2009;4:e7769.

Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:511-520.

Meseguer M, Garrido N, Gimeno C, et al. Comparison of polymerase chain reaction dependent methods for determining the presence of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in washed sperm. *Fertil Steril*. 2002;78:1199-1202.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reprod*. 2011;26:2658-2671.

Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril*. 2012;98:1481-9.e10.

Milà M, Mallolas J. Fragile X syndrome: premature ovarian failure. Preimplantation and preconception genetic diagnosis. *Rev Neurol*. 2001;33:S20-3.

Milewski R, Kuć P, Kuczyńska A, Stankiewicz B, Łukaszuk K, Kuczyński W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32:571-579.

Miller M, Jaskolski M, Rao J et al. Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature*. 1989;337:576-579.

Miller MD, Feinberg MB and Greene WC. The HIV-1 nef gene acts as a positive viral infectivity factor. *Trends Microbiol.* 1994;2:294-298.

Miller MD, Warmerdam MT, Page KA, Feinberg MB and Greene WC. Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J Virol.* 1995;69:579-584.

Moini A, Shiva M, Arabipoor A, Hosseini R, Chehrazi M, Sadeghi M. Obstetric and neonatal outcomes of twin pregnancies conceived by assisted reproductive technology compared with twin pregnancies conceived spontaneously: a prospective follow-up study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;165:29-32.

Molina I, Carmen Del Gonzalvo M, Clavero A, Angel López-Ruz M, Mozas J, Pasquau J, Sampedro A, Martínez L, Castilla JA. Assisted reproductive technology and obstetric outcome in couples when the male partner has a chronic viral disease. *Int J Fertil Steril.* 2014;7:291-300.

Moll AC, Imhof SM, Schouten-van Meeteren AY, van Leeuwen FE. In-vitro fertilisation and retinoblastoma. *Lancet.* 2003;361:1392.

Moltó J, Santos JR, Negredo E, Miranda C, Videla S, Clotet B. Lopinavir/ritonavir monotherapy as a simplification strategy in routine clinical practice. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:436-439.

Moore JP, Parren PW, Burton DR. Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J Virol.* 2001;75:5721-5729.

Mortimer D. *Practical laboratory andrology.* Oxford: Oxford University Press; 1994.

Moyle G. Mechanisms of HIV and nucleoside reverse transcriptase inhibitor injury to mitochondria. *Antivir Ther.* 2005;10:M47-52.

Moyle GJ, Data D, Mandalia S, Morlese J, AsboeD, Gazzard BG. Hyperlactataemia and lactic acidosis during antiretroviral therapy: relevance, reproducibility and possible risk factor. *AIDS.* 2002;16:1341-1349.

Muesing M, Smith D, Cabradilla C et al. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature.* 1985;313:450-458.

Muller CH, Coombs RW and Krieger JN. Effects of clinical stage and immunological status on semen analysis results in human immunodeficiency virus type 1-seropositive men. *Andrologia*. 1998;30:15-22.

Nagy, ZP. Sperm centriole dysfunction and sperm immobility. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2000;166:59-62.

Nakatsuk T, Hanada S, Fujii T. Potentiating effects of methylxanthines on teratogenicity of mitomycin C in mice. *Teratology*. 1983;28:243-247.

Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril*. 1999;71:919-923.

Neil S, Bieniasz P. Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29:569-580.

Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod*. 2003;18:1307-1312.

Nunes E, Oliveira M, Almeida M, Pilotto J, Ribeiro J, Faulhaber J, et al. 48-Week Efficacy and Safety Results of Simplification to Single Agent Lopinavir/ ritonavir (LPV/r) Regimen in Patients Suppressed Below 80 copies/mL on HAART - The KalMo Study. Sixteenth International AIDS Conference. Toronto, Canada; 2006 [Abstract TuAb0103.]

Nunes EP, Santini de Oliveira M, Merçon M, Zajdenverg R, Faulhaber JC, Pilotto JH, et al. Monotherapy with Lopinavir/Ritonavir as maintenance after HIV-1 viral suppression: results of a 96-week randomized, controlled, open-label, pilot trial (KalMo study). *HIV Clin Trials*. 2009;10:368-374.

Ohl J, Partisani M, Wittemer C, Schmitt MP, Cranz C, Stoll-Keller F, et al. Assisted reproduction techniques for HIV serodiscordant couples: 18 months of experience. *Hum Reprod*. 2003;18:1244-1249.

Okamoto T. Positive and negative regulation of transcription from HIV provirus. *Uirusu*. 2011;61:81-89.

Okun N, Sierra S, Wilson R, Audibert F, Brock J, Campagnolo C et al. Pregnancy Outcomes After Assisted Human Reproduction. *J Obstet Gynaecol Can*. 2014;36:64-83.

Oliva G, Pons JMV. Lavado de semen en parejas VIH serodiscordantes para su uso en técnicas de reproducción humana asistida. Barcelona: Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques. CatSalut. Departament de Salut. Generalitat de Catalunya. 2004.

Ombelet W, Peeraer K, De Sutter P, Gerris J, Bosmans E, Martens G, et al. Perinatal outcome of ICSI pregnancies compared with a matched group of natural conception pregnancies in Flanders (Belgium): a cohort study. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:244-253.

Oron G, Nayot D, Son WY, Holzer H, Buckett W, Tulandi T. Obstetric and perinatal outcome from single cleavage transfer and single blastocyst transfer: a matched case-control study. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31:469-472.

Oron G, Sokal-Arnon T, Son WY, Demirtas E, Buckett W, Zeadna A, et al. Extended embryo culture is not associated with increased adverse obstetric or perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211:165.e1-7.

Ortega C, Verheyen G, Raick D, Camus M, Devroey P, Tournaye H. Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? *Hum Reprod Update*. 2011;17:684-692.

Osborne BJ, Sheth PM, Yi TJ, Kovacs C, Benko E, Porte CI, et al. Impact of antiretroviral therapy duration and intensification on isolated shedding of HIV-1 RNA in semen. *J Infect Dis*. 2013;207:1226-1234.

Overbaugh J, Miller AD, Eiden MV. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65:371-389.

Palomba S, Homburg R, Santagni S, La Sala GB, Orvieto R. Risk of adverse pregnancy and perinatal outcomes after high technology infertility treatment: a comprehensive systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14:76.

Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012;18:485-503.

Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el Sida. Recomendaciones de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización 2008). Madrid. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. 2008.

Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el Sida. Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización 2011). Madrid. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. 2011.

Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el Sida. Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización 2012). Madrid. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. 2012.

Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida. Documento de consenso de GESIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización 2016). Madrid. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. 2016.

Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida. Documento de consenso de GESIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización 2017). Madrid. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. 2017.

Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. 2011;1-166.

Pasquau J. Penetration in reservoirs. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:41-46.

Pasquier C, Daudin M, Righi L, Berges L, Thauvin L, Berrebi A, et al. Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. *AIDS*. 2000;14:2093-2099.

Pasquier C, Andreutti C, Bertrand E, Bostan A, Bourlet T, Molina I, et al. Multicenter assessment of HIV-1 RNA quantitation in semen in the CREATHÉ network. *J Med Virol*. 2012;84:183-187.

Pavili L, Daudin M, Moinard N, Walschaerts M, Cuzin L, Massip P, et al. Decrease of mitochondrial DNA level in sperm from patients infected with human immunodeficiency virus-1 linked to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Fertil Steril*. 2010;94:2151-2156.

Paxton W, Connor R, Landau N. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: Requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol.* 1993;67:7229-7237.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF and Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 1997;12:532-541.

Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13:960-963.

Pelkonen S, Hartikainen AL, Ritvanen A, Koivunen R, Martikainen H, Gissler M, et al. Major congenital anomalies in children born after frozen embryo transfer: a cohort study 1995-2006. *Hum Reprod.* 2014;29:1552-1557.

Peña JE, Thornton MH and Sauer MV. Assessing the clinical utility of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection in human immunodeficiency virus type 1 serodiscordant couples: report of 113 consecutive cycles. *Fertil Steril.* 2003;80:356-362.

Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* 1996;271:1582-1586.

Perez-Valero I, Arribas JR. Protease inhibitor monotherapy. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24:7-11.

Pérez-Valero I, González A, Estebáñez M, Monje S, Montes ML, Bayon C, et al. A prospective cohort study of neurocognitive function in aviremic HIV infected patients treated with 1 or 3 anti-retrovirals. *Clin Infect Dis.* 2014;59:1627-1634.

Pierone G, Mieras J, Bulgin-Coleman D, Kantor C, Shearer J, Fontaine L, et al. A pilot study of switch to lopinavir/ritonavir (LPV/r) monotherapy from nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapy. *HIV Clin Trials.* 2006;7:237-245.

Pilatz A, Discher T, Lochnit G, Wolf J, Hans-Christian S, Schuttler C, et al. Semen quality in HIV patients under stable antiretroviral therapy is impaired compared to WHO 2010 reference values and on sperm proteome level. *AIDS.* 2014;28:875-880.

Pinborg A, Loft A, Rasmussen S, Schmidt L, Langhoff-Roos J, Greisen G, et al. Neonatal outcome in a Danish national cohort of 3438 IVF/ICSI and 10,362 non-IVF/ICSI twins born between 1995 and 2000. *Hum Reprod.* 2004;19:435-441.

Pinborg A, Loft A, Aaris Henningsen AK, Rasmussen S, Andersen AN. Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: the Danish National Cohort Study 1995-2006. *Fertil Steril*. 2010;94:1320-1327.

Pinborg A, Wennerholm UB, Romundstad LB, Loft A, Aittomaki K, Söderström-Anttila V, et al. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013;19:87-104.

Pinborg A, Henningsen AA, Loft A, Malchau SS, Forman J, Andersen AN. Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Hum Reprod*. 2014;29:618-627.

Piomboni P and Baccetti B. Spermatozoon as a vehicle for HIV-1 and other viruses: a review. *Mol Reprod Dev*. 2000;56:238-242.

Place I, Englert Y. A prospective longitudinal study of the physical, psychomotor, and intellectual development of singleton children up to 5 years who were conceived by intracytoplasmic sperm injection compared with children conceived spontaneously and by in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2003;80:1388-1397.

Politch JA, Mayer KH, Abbott AF, Anderson DJ. The effects of disease progression and zidovudine therapy on semen quality in human immunodeficiency virus type 1 seropositive men. *Fertil Steril*. 1994;61:922-928.

Politch JA, Xu C, Tucker L, Anderson DJ. Separation of human immunodeficiency virus type 1 from motile sperm by the double tube gradient method versus other methods. *Fertil Steril*. 2004;81:440-447.

Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo R. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 1984;224:497-500.

Porta Ribera R, Molina Morales V, Boada Palá M, Coroleu Lletgetc V. Perinatal progress of children born after in vitro fertilization. *An Pediatr*. 2009;71:275-277.

Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 1988;242:1168-1171.

Prisant N, Tubiana R, Lefebvre G, Lebray P, Marcelin AG, Thibault V, et al. HIV-1 or hepatitis C chronic infection in serodiscordant infertile couples has no impact on infertility treatment outcome. *Fertil Steril*. 2010;93:1020-1023.

Prokofjeva MM, Kochetkov SN, Prassolov VS. Therapy of HIV Infection: Current Approaches and Prospects. *Acta Naturae*. 2016;8:23-32.

Pryciak PM and Varmus HE. Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell*. 1992;69:769-780.

Pulido F, Arribas JR, Delgado R, Cabrero E, Gonzalez-Garcia J, Perez-Elias MJ, et al. Lopinavir-ritonavir monotherapy versus lopinavir-ritonavir and two nucleosides for maintenance therapy of HIV. *AIDS*. 2008;22:F1-9.

Pulido Ortega F, Llenas-García J. Monoterapia con lopinavir/ritonavir como estrategia de simplificación en el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana Tipo 1 *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:12-20.

Pulido F, Matarranz M, Rodriguez-Rivera V, Fiorante S, Hernando A. Boosted protease inhibitor monotherapy. What have we learnt after seven years of research? *AIDS Rev*. 2010;12:127-134.

Qin J, Sheng X, Wu D, Gao S, You Y, Yang T, Wang H. Assisted reproductive technology and the risk of pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: a meta-analysis of cohort studies. *Fertil Steril*. 2016a;105:73-85.

Qin JB, Wang H, Sheng X, Xie Q, Gao S. Assisted reproductive technology and risk of adverse obstetric outcomes in dichorionic twin pregnancies: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2016b;105:1180-1192.

Qin JB, Sheng XQ, Wu D, Gao SY, You YP, Yang TB, et al. Worldwide prevalence of adverse pregnancy outcomes among singleton pregnancies after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295:285-301.

Rabi SA., Laird G M, Durand CM, Laskey S, Shan L, Bailey JR, et al. Multi-step inhibition explains HIV-1 protease inhibitor pharmacodynamics and resistance. *J Clin Invest*. 2013;123:3848-3860.

- Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, et al. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online*. 2003;6:323-331.
- Retzliff MG, Hornstein MD. Is intracytoplasmic sperm injection safe? *Fertil Steril*. 2003;80:851-859.
- Rhee SS, Marsh JW. HIV-1 Nef activity in murine T cells. CD4 modulation and positive enhancement. *J Immunol*. 1994;152:5128-5134.
- Ricciarelli E, Bruna I, Verdú V, Torrelló MJ, Herrero R, Gris JM, et al. Impact of assisted reproduction treatments on Spanish newborns: report of 14,119 pregnancies. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30:897-905.
- Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril*. 2001;76:1157-1167.
- Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, et al. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online*. 2005;10:669-681.
- Rijnders PM, Jansen CA. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998;13:2869-2873.
- Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama KP. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *J Assist Reprod Genet*. 2004;21:437-443.
- Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 1988;242:1171-1173.
- Rogel M, Wu L, Emerman M. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol*. 1995;69:882-888.
- Roque M, Lattes K, Serra S, Sola I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;99:156-162.
- Rosário GR, Vidal DS, Silva AV, Franco AC. The impact of male age on embryo quality: a retrospective study using time-lapse imaging. *JBRA Assist Reprod*. 2016;20:212-216.

Roux C, Borodkine R, Joanne C, Bresson JL, Agnani G. Morphological classification of human in-vitro fertilization embryos based on the regularity of the asynchronous division process. *Hum Reprod Update*. 1995;1:488-496.

Ruane P, Lubner A, Gaultier C, Stryker R, Peloquin C, Rothbard J, et al. Maintenance therapy using Lopinavir/ritonavir (LPV/r) alone with well-controlled HIV Infection. The XV International AIDS Conference. Bangkok, Thailand; 2004. [Abstract TuPeB4638.]

Rubino P, Viganò P, Luddi A, Piomboni P. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Hum Reprod Update*. 2016;22:194-227.

Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba MJ, et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril*. 2012;98:1458-1463.

Sadowy S, Tomkin G, Munne S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote*. 1998;6:137-141.

Saez de la Fuente J, Such Díaz A, Sánchez Gil C, Esteban Alba C, Escobar Rodríguez I. Meta-analysis of the effectiveness of the strategy of monotherapy with boosted protease inhibitors in HIV+ patients. *Farm Hosp*. 2010;34:251-258.

Sahali S, Chaix ML, Delfraissy JF, Ghosn J. Ritonavir-boosted protease inhibitor monotherapy for the treatment of HIV-1 infection. *AIDS Rev*. 2008;10:4-14.

Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod*. 2003;18:821-825.

Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod*. 2001;16:2177-2181.

Sánchez-Pozo MC, Mendiola J, Serrano M, Mozas J, Björndahl L, Menkveld R et al. Proposal of guidelines for the appraisal of SEMen QUALity studies (SEMQUA). *Hum Reprod*. 2013;28:10-21.

Santos JR, Llibre JM, Bravo I, García-Rosado D, Cañadas MP, Pérez-Álvarez N, Paredes R, Clotet B, Moltó J. Short Communication: Efficacy and Safety of Treatment Simplification to Lopinavir/Ritonavir or Darunavir/Ritonavir Monotherapy: A Randomized Clinical Trial. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2016;32:452-455.

Sato A, Igarashi H, Adachi A, Hayami M. Identification and localization of vpr gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Virus Genes*. 1990;4:303-312.

Sauer MV, Chang PL. Establishing a clinical program for human immunodeficiency virus 1-seropositive men to father seronegative children by means of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186:627-633.

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;91:2455-2460.

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;22:772-777.

Savasi V, Mandia L, Laoreti A, Cetin I. Reproductive assistance in HIV serodiscordant couples. *Hum Reprod Update*. 2013;19:136-150.

Schaeffer E, Geleziunas R, Greene WC. Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *J Virol*. 2001;75:2993-3000.

Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002;110:521-529.

Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod*. 2000;15:2394-2403.

Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod*. 1998;13:1003-1013.

Scott RT Jr, De Ziegler N. Could safety boards provide a valuable tool to enhance the safety of reproductive medicine? *Fertil Steril*. 2013;100:1518-1523.

Scott L, Smith S. Human sperm motility-enhancing agents have detrimental effects on mouse oocytes and embryos. *Fertil Steril*. 1995;63:166-175.

Sebastiani G, Pertierra Cortada A, Vidal Sorde E, Figueras Aloy J, Balasch Cortina J. Factors associated with assisted reproduction technologies and neonatal outcomes. *An Pediatr (Barc)*. 2009;70:323-32.

Seibert SA, Howell CY, Hughes MK, Hughes AL. Natural selection on the gag, pol, and env genes of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol Biol Evol.* 1995;12:803-813.

Sellés E, Mollá M, Nicolás M, Santa A, Gómez E, Garda A, et al. Capacitación Espermática. En: Remohí J, ed. *Manual práctico de reproducción humana*. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España; 2004. p. 283-287.

Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M, Ravizza M, Taglioretti A, Sulpizio P, et al. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet.* 1992;340:1317-1319.

Semprini AE, Vucetich A, Oneta M, Rezek, D, Rubino P, Scarselli F, et al. Sperm-washing and ICSI in HIV discordant couples: >50% pregnancy rate (Abstract P-340). *Hum Reprod.* 2002;17:117-18.

Semprini AE, Fiore S. HIV and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2004;16:257-262.

Semprini AE, Macaluso M, Hollander L, Vucetich A, Duerr A, Mor G, et al. Safe conception for HIV-discordant couples: insemination with processed semen from the HIV-infected partner. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;208:402.e1-9.

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997;12:1267-1270.

Setti AS, Figueira RC, Braga DP, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Gender incidence of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection-derived embryos: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2012;24:420-423.

Sharma RK, Agarwal A. Influence of artificial stimulation on unprocessed and Percoll-washed cryopreserved sperm. *Arch. Androl.* 1997;38:173-179.

Shavit T, Oron G, Weon-Young S, Holzer H, Tulandi T. Vitrified-warmed single-embryo transfers may be associated with increased maternal complications compared with fresh single-embryo transfers. *Reprod Biomed Online.* 2017;35:94-102.

Shaw PW, Bernard AG, Fuller BJ, Hunter JH, Shaw RW. Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival. *Mol Reprod Dev.* 1992;33:210-214.

Shenfield F, Pennings G, Cohen J, Devroey P, Tarlatzis B, Sureau C. Taskforce 8: ethics of medically assisted fertility treatment for HIV positive men and women. *Hum Reprod.* 2004;19:2454-2456.

Sheth PM, Kovacs C, Kemal KS, Jones RB, Raboud JM, Pilon R, et al. Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy. *AIDS.* 2009;23:2050-2054.

Shih CC, Stoye JP, Coffin JM. Highly preferred targets for retrovirus integration. *Cell.* 1988;53:531-537.

Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod.* 1997;12:1531-1536.

Singh K, Teague A, Jackson A, Mguni S, Higgs C, Mandalia S, et al. Single agent lopinavir/ritonavir (LPV/r) is as effective at maintaining viral suppression as continuation of standard ART at 24 weeks in patients who already have HIV RNA < 50 copies/mL. 11th European AIDS Conference (EACS), Madrid, Spain, October 24-27, 2007. [Abstract P 7.5/06.]

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* 2001;16:972-978.

Solas C, Lafeuillade A, Halfon P, Chadapaud S, Hittinger G, Lacarelle B. Discrepancies between protease inhibitor concentrations and viral load in reservoirs and sanctuary sites in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:238-243.

Southgate CD, Green MR. The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function. *Genes Dev* 1991;5(12B):2496-2507.

Speck CE, Coombs RW, Koutsky LA, Zeh J, Ross SO, Hooton TM, et al. Risk factors for HIV-1 shedding in semen. *Am J Epidemiol.* 1999;150:622-631.

Sprinz E, Bay M, Lazzaretti R, Jeffman M, Mattevi V. Lopinavir/ritonavir monotherapy as maintenance treatment in HIV-infected individuals with virological suppression: results from a pilot study in Brazil. *HIV Med.* 2008;9:270-276.

Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod.* 1992;7:117-119.

Steffy K, Wong-Staal F. Genetic regulation of human immunodeficiency virus. *Microbiol Rev.* 1991;55:193-205.

Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature.* 1987;328:728-730.

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.

Sunkara SK, Antonisamy B, Selliah HY, Kamath MS. Pre-term birth and low birth weight following preimplantation genetic diagnosis: analysis of 88 010 singleton live births following PGD and IVF cycles. *Hum Reprod.* 2017;32:432-438.

Sutcliffe AG, Saunders K, McLachlan R, Taylor B, Edwards P, Grudzinskas G, et al. A retrospective case-control study of developmental and other outcomes in a cohort of Australian children conceived by intracytoplasmic sperm injection compared with a similar group in the United Kingdom. *Fertil Steril.* 2003;79:512-516.

Suzuki S, Miyake H. Perinatal outcomes of elderly primiparous dichorionic twin pregnancies conceived by in vitro fertilization compared with those conceived spontaneously. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;281:87-90.

Swindells S, DiRienzo AG, Wilkin T, Fletcher CV, Margolis DM, Thal GD, et al. Regimen simplification to atazanavir-ritonavir alone as maintenance antiretroviral therapy after sustained virologic suppression. *JAMA.* 2006;296:806-814.

Tararbit K, Houyel L, Bonnet D, De Vigan C, Lelong N, Goffinet F, et al. Risk of congenital heart defects associated with assisted reproductive technologies: a population-based evaluation. *Eur Heart J.* 2011;32:500-508.

Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 1999;14:1318-1323.

The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Causes of Death in HIV-1-Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy, 1996-2006: Collaborative Analysis of 13 HIV Cohort Studies. *Clin Infect Dis*. 2010;50:1387-1396.

The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. 2008;372:293-299.

Thigpen MC, Kebaabetswe PM, Paxton LA, Smith DK, Rose CE, Segolodi TM, et al; TDF2 Study Group. Antiretroviral preexposure prophylaxis for heterosexual HIV transmission in Botswana. *N Engl J Med*. 2012;367:423-434.

Thomson Okatsu M, Vallejo A, Biggar, RJ, Klotman ME. Variabilidad en los patrones de splicing de tat, rev y nef de VIH-1 in vivo. *Pub of SEISIDA*. 1998;9:143-146.

Tiley LS, Madore SJ, Malim MH, Cullen BR. The VP16 transcription activation domain is functional when targeted to a promoter-proximal RNA sequence. *Genes Dev*. 1992;6:2077-2087.

Tokarev A, Guatelli J. Misdirection of membrane trafficking by HIV-1 Vpu and Nef: Keys to viral virulence and persistence. *Cell Logist*. 2011;1:90-102.

Tomasselli A G, Heinrikson RL. Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477:189-214.

Torres-Cornejo A, Benmarzouk Hidalgo O, Viciana P, Sánchez-Sánchez B, López-Ruz MA, López-Cortés LF, et al. Protease inhibitor monotherapy in controlling HIV-1 shedding in the male genital tract. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:98.e7-98.e10.

Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem A. Effects of pentoxifylline on in-vitro development of preimplantation mouse embryos. *Hum. Reprod*. 1993;8:1475-1480.

Tournaye H, Janssens R, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. In vitro fertilization in couples with previous fertilization failure using sperm incubated with pentoxifylline and 2-deoxyadenosine. *Fertil Steril*. 1994;62:574-579.

Tur R, Coroleu B, Torelló MJ, Boada M, Veiga A, Barri PN. Prevention of multiple pregnancy following IVF in Spain. *Reprod Biomed Online*. 2006;13:856-863.

Unemo M, Bradshaw CS, Hocking JS, de Vries H, Francis SC, Mabey D, et al. Sexually transmitted infections: challenges ahead. *The Lancet Infect Dis.* 2017;17:9-53.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.* 1998;51:53-58.

Valantin MA, Lambert-Niclot S, Flandre P, Morand-Joubert L, Cabiè A, Meynard JL, et al. Long-term Efficacy of DVR/r Monotherapy in Patients with HIV-1 Viral Suppression in the MONOI-ANRS 136 Study: Results at 96 Weeks. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:691-695.

Valencia-Ortega ME, Moreno-Celda V. From research to clinical practice: use of lopinavir/ritonavir in monotherapy. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:671-672.

Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech.* 1990;16:324-346.

Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod.* 2000;15:2621-2633.

Van Leeuwen E, Prins JM, Jurriaans S, Boer K, Reiss P, Repping S, et al. Reproduction and fertility in human immunodeficiency virus type-1 infection. *Human Reproduction Update.* 2007;13:197-206.

Van Leeuwen E, Wit FW, Prins JM, Reiss P, van der Veen F and Repping S. Semen quality remains stable during 96 weeks of untreated human immunodeficiency virus-1 infection. *Fertil Steril.* 2008a;90:636-641.

Van Leeuwen E, Wit F, Repping S, Eeftinck JK, Reiss P, van der Veen F, et al. Effects of antiretroviral therapy on semen quality. *AIDS.* 2008b;22:637-642.

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999;14:2345-2349.

Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, et al. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 2003;18:1062-1069.

Vasario E, Borgarello V, Bossotti C, Libanori E, Biolcati M, Arduino S, et al. IVF twins have similar obstetric and neonatal outcome as spontaneously conceived twins: a prospective follow-up study. *Reprod Biomed Online*. 2010;21:422-428.

Veeck L. *An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology*. New York: The Parthenon Publishing Group; 1999.

Vernazza P, Daneel S, Schiffer V, Decosterd L, Fierz W, Klimkait T, et al. The role of compartment penetration in PI-monotherapy: the Atazanavir-Ritonavir Mono-maintenance (ATARITMO) Trial. *AIDS*. 2007;21:1309-1315.

Vernazza P, Hirshel B, Bernasconi E, Flepp M. Les personnes seropositives ne souffrant d'aucune autre MST et suivant un traitement antiretroviral efficace ne transmettent pas le HIV par voie sexuelle. *Bulletin des medecins suisses*. 2008;89:165-169.

Vernazza PL, Graf I, Sonnenberg-Schwan U, Geit M, Meurer A. Pre-exposure prophylaxis and timed intercourse for HIV-discordant couples willing to conceive a child. *AIDS*. 2011;25:2005-2008.

Villa IC, Vinaccia S. Adhesión terapéutica y variables psicológicas asociadas en pacientes con diagnóstico de VIH-Sida. *Psicología y Salud*. 2006;16:51-62.

Vinuesa D, Parra-Ruiz J, Chueca N, Alvarez M, Muñoz-Medina L, Garcia F, et al. Protease inhibitor monotherapy is not associated with increased viral replication in lymph nodes. *AIDS*. 2014;28:1835-1837.

Vitorino RL, Grinsztejn BG, de Andrade CA, Hökerberg YH, de Souza CT, Friedman RK, et al. Systematic review of the effectiveness and safety of assisted reproduction techniques in couples serodiscordant for human immunodeficiency virus where the man is positive. *Fertil Steril*. 2011;95:1684-1690.

Von Schwedler U, Kornbluth R, Trono D. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:6992-6996.

Vulliemoz NR, McVeigh E, Kurinczuk J. British Fertility Society. *In vitro Fertilisation: Perinatal Risks and Early Childhood Outcomes*. *Hum Fertil (Camb)*. 2012;15:62-68.

Wang D, Li L, Xie Q, Hou Z, Yu X, Ma M, et al. Factors affecting sperm fertilizing capacity in men infected with HIV. *J Med Virol*. 2014;86:1467-1472.

Wdowiak A, Wdowiak E, Bojar I. Improving the safety of the embryo and the patient during in vitro fertilization procedures. *Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne*. 2016;11:137-143.

Weghofer A, Klein K, Stammer-Safar M, Barad DH, Worda C, Husslein P, et al. Severity of prematurity risk in spontaneous and in vitro fertilization twins: does conception mode serve as a risk factor? *Fertil Steril*. 2009;92:2116-2118.

Wen J, Jiang J, Ding C, Dai J, Liu Y, Xia Y, et al. Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012;97:1331-7.e1-4.

Wen SW, Leader A, White RR, Leveille MC, Wilkie V, Zhou J, et al. A comprehensive assessment of outcomes in pregnancies conceived by in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;150:160-165.

Wennerholm UB, Henningsen AK, Romundstad LB, Bergh C, Pinborg A, Skjaerven R, et al. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod*. 2013;28:2545-2553.

WHO. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

WHO. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen*, 5th edn. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2010.

Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol*. 1992;66:7193-7200.

Williams MA, Goldman MB, Mitterdorf R, Monson RR. Subfertility and the risk of low birth weight. *Fertil Steril*. 1991;56:668-671.

Winter H, Maeda Y, Mitsuya H, Zemlicka J. Phosphodiester amidates of allenic nucleoside analogues: anti-HIV activity and possible mechanism of action. *J Med Chem*. 1996;39:3300-3306.

Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod*. 2000;15:2591-2597.

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1115-1121.

Xu C, Politch JA, Mayer KH, Anderson DJ. Human immunodeficiency virus type-1 episomal cDNA in semen. *AIDS Res Ther.* 2005;2:9.

York RG, Randall JL, Scott WJ Jr. Teratogenicity of paraxanthine (1,7-dimethylxanthine) in C57BL/6J mice. *Teratology.* 1986;34:279-282.

Yovich JL. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 1993; 8:1786-1791.

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;105:645-655.

Zamora MJ, Obradors A, Woodward B, Vernaeva V, Vassena R. Semen residual viral load and reproductive outcomes in HIV-infected men undergoing ICSI after extended semen preparation. *Reprod Biomed Online.* 2016;32:584-590.

Zhao J, Xu B, Zhang Q, Li YP. Which one has a better obstetric and perinatal outcome in singleton pregnancy, IVF/ICSI or FET?: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016;14:51.

Zhu YM, Gao HJ, He RH, Huang HF. Research on the protocol of limited ovarian stimulation to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2006;41:740-744.

Zhu P, Winkler H, Chertova E, Taylor KA, Roux KH. Cryoelectron tomography of HIV-1 envelope spikes: further evidence for tripod-like legs. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000203.

Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997;12:1545-1549.

Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod.* 2002;17:1327-1333.

