

**Técnicas de Reproducción Asistida en
Hombres Seropositivos al Virus de la
Inmunodeficiencia Humana Tipo-1
(VIH-1)**

Tesis doctoral defendida

por

Fernando Marina Rugero

- 2001 -

Técnicas de reproducción asistida en hombres seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).

Memoria de investigación clínica presentada por Fernando Marina Rugero para obtener el grado de Doctor en Ciencias por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 28 de junio del 2001

Josep Egozcue i Cuixart, Catedrático de Biología Celular de la
Universitat Autònoma de Barcelona

Certifico: Que la memoria presentada por Fernando Marina Rugero
y titulada **“Técnicas de Reproducción asistida en hombres
seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
(VIH-1)”** ha sido realizada bajo mi dirección, para aspirar al Grado
de Doctor en Ciencias por la Universitat Autònoma de Barcelona.

El Director,

Dr. Josep Egozcue i Cuixart

Índice

1. PRESENTACIÓN	13
2. INTRODUCCIÓN	19
3. ASPECTOS PRELIMINARES	25
3.1 CONOCIMIENTOS SOBRE SIDA	25
3.1.1 Primeros casos clínicos	25
3.1.2 Vías de transmisión	25
3.1.3 Epidemiología	35
3.1.4 El virus del SIDA	38
3.1.5 Terapia antirretroviral	49
3.1.6 Breve referencia al VIH-2	51
3.2 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL VIH-1	52
3.2.1 Determinación de anticuerpos	52
3.2.2 Pruebas de confirmación de seropositividad	55
3.2.3 Determinación del antígeno p24	61
3.2.4 Cultivo celular	63
3.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa PCR	64
3.3 SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES SEROPOSITIVOS AL VIH-1	67
3.3.1 Introducción	67
3.3.2 Carga viral	67
3.4 EL VIH-1 Y EL SEMEN	69
3.4.1 Vía de llegada del VIH-1 al semen	69
3.4.2 Presencia del VIH-1 en semen	69
3.4.3 Contagiosidad del VIH-1 a través del semen	71
3.4.4 El VIH-1 y el espermatozoide	72
3.5 EL VIH-1 Y EL OVOCITO	75
3.6 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y TÉCNICAS DE LAVADO SEMINAL	76
3.6.1 Capacitación espermática	76
3.6.2 Técnicas de lavado de semen	78
3.7 TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	83
3.7.1 Antecedentes	83

3.7.2 Inseminación Intrauterina _____	84
3.7.3 Fecundación in vitro con técnica de microinyección (FIV-ICSI) _____	86
3.8 ASPECTOS BIOÉTICOS Y LEGALES _____	94
3.8.1 Aspectos bioéticos _____	94
3.8.2 Aspectos legales _____	95
4. OBJETIVOS _____	103
5. ESTUDIO CLÍNICO DEL HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1 QUE ACUDE A UN CENTRO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA _____	109
5.1 INTRODUCCIÓN _____	109
5.2 PACIENTES Y MÉTODO _____	110
5.3 RESULTADOS _____	113
5.4 DISCUSIÓN _____	117
6. CALIDAD SEMINAL DEL HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1 _____	125
6.1 INTRODUCCIÓN _____	125
6.2 MATERIAL Y MÉTODO _____	127
6.2.1 Pacientes _____	127
6.2.2 Evaluación seminal _____	127
6.2.3 Análisis estadístico _____	129
6.3 RESULTADOS _____	132
6.3.1 Efecto de la infección por VIH-1 en la calidad seminal _____	132
6.3.2 Efecto de la infección por VIH-1 en el volumen seminal _____	133
6.3.3 Efecto de la infección por VIH-1 en el recuento espermático por mililitro _____	134
6.3.4 Efecto de la infección por VIH-1 en el número total de espermatozoides eyaculados _____	136
6.3.5 Efecto de la infección por VIH-1 en el porcentaje de movilidad traslativa _____	136
6.3.6 Efecto de la infección por VIH-1 en el porcentaje de espermatozoides normales _____	138

6.3.7 Parámetros relacionados con la calidad seminal en varones seropositivos	139
6.4 DISCUSIÓN	156
7. LAVADO DE SEMEN DE HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1 PARA SU UTILIZACIÓN EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	165
7.1 INTRODUCCIÓN	165
7.2 TÉCNICA DE LAVADO DE SEMEN PROCEDENTE DE HOMBRE PORTADOR DEL VIH-1	167
7.2.1 Evaluación	167
7.2.2 Primer lavado	167
7.2.3 Técnica de gradientes discontinuos de PureSperm	167
7.2.4 Técnica de swim-up	169
7.3 RECUPERABILIDAD ESPERMÁTICA CON LA TÉCNICA DEL DOBLE LAVADO	170
7.4 DISCUSIÓN	171
8. DETERMINACIÓN DEL DNA Y RNA DEL VIH-1 EN SEMEN LAVADO CON LA TÉCNICA DE PCR	179
8.1 INTRODUCCIÓN	179
8.2 PROCEDIMIENTOS	180
8.2.1 Fundamento	180
8.2.2 Condiciones generales de trabajo y precauciones	180
8.2.3 Obtención y preparación de las muestras	181
8.2.4 Material	181
8.2.5 Método	182
8.2.6 Interpretación de los resultados	185
8.3 RESULTADOS	188
8.4 DISCUSIÓN	189
9. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN PAREJAS CON HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1	197

9.1 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL INTRAUTERINA	197
9.1.1 Estudio previo de la mujer	197
9.1.2 Estimulación de la ovulación	200
9.1.3 Inseminación	201
9.1.4 Soporte de fase lútea	202
9.1.5 Seguimiento de las mujeres inseminadas	203
9.1.6 Resultados	204
9.1.7 Discusión	208
9.2 FECUNDACIÓN IN VITRO CON INYECCIÓN INTRACITOPLAS- MÁTICA	212
9.2.1 Estimulación de la ovulación	212
9.2.2 Extracción de los ovocitos	213
9.2.3 Inyección intracitoplasmática	214
9.2.4 Cultivo embrionario	218
9.2.5 Transferencia embrionaria	222
9.2.6 Soporte de fase lútea	223
9.2.7 Resultados	224
9.2.7 Discusión	228
10. CONCLUSIONES	235
10.1 ESTUDIO CLÍNICO DEL HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1 QUE ACUDE A UN CENTRO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	235
10.2 CALIDAD SEMINAL DEL HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1	235
10.3 LAVADO DE SEMEN DE HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1 PARA SU UTILIZACIÓN EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	236
10.4 DETERMINACIÓN DE RNA Y DNA DEL VIH-1 EN SEMEN LAVADO CON TÉCNICA DE PCR	236
10.5 APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN PAREJAS CON HOMBRE SEROPOSITIVO AL VIH-1	235
11. AGRADECIMIENTOS	243
12. ANEXOS	253
12.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO	253
12.2 FORMULACIÓN DEL MEDIO HTF	254

12.3 MATERIAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE RNA Y DETECCIÓN DE DNA PROVÍRICO DEL VIH-1 _____	255
12.4 CONDICIONES DE RECOGIDA DE SEMEN _____	256
12.5 MATERIAL INVENTARIABLE PARA FIV-ICSI _____	257
12.6 MATERIAL FUNGIBLE PARA FIV-ICSI _____	258
13. ABREVIATURAS _____	265
14. BIBLIOGRAFÍA _____	273

1.

Presentación

1 PRESENTACIÓN

La ciencia avanza sumando nuevos conocimientos basados en los medios y conocimientos ya existentes, integrando varios descubrimientos ya realizados por otros autores y dándoles una nueva aplicación. Muchos avances se producen por casualidad, pero la mayoría se producen por tenacidad. Otros proyectos, además, evolucionan por la aparición de una necesidad. Los primeros impulsos para desarrollar este estudio que se presenta surgieron por la incongruencia que se producía con los pacientes seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1 (VIH-1) que acudían a centros sanitarios solicitando consejo reproductivo. Los centros sanitarios atendían a estos pacientes para evitar que la mujer ya infectada transmitiera el virus al hijo, pero no ejercían ninguna actuación para reducir la posibilidad de contagio en las parejas decididas a tener hijos. Ningún centro de reproducción asistida aceptaba a pacientes seropositivos con la única excepción del tratamiento con inseminación artificial de donante a mujer seronegativa y hombre seropositivo. Sin embargo, eran crecientes las consultas de mujeres infectadas por coitos no protegidos y embarazadas. Muchas de estas mujeres se infectaron, asumiendo el bajo riesgo de contagio por coito, buscando un hijo de su pareja. Las pacientes informadas que no querían asumir este riesgo empezaron a solicitar ayuda a las clínicas de reproducción.

Los centros de reproducción asistida no estaban familiarizados con los pormenores de la infección por VIH-1 y estos pacientes no eran atendidos. Aunque desaconsejado por todos los infectólogos consultados, el Instituto de Reproducción CEFER apostó por no discriminar a estos pacientes e intentar buscarles una solución para poder tener descendencia genéticamente propia con las máximas garantías. El nacimiento de los primeros niños no infectados fue el verdadero motor del trabajo que aquí se presenta.

2.

Introducción

2 INTRODUCCIÓN

Dentro de la medicina reproductiva, las enfermedades de transmisión sexual tienen un importante papel. Por una parte, estas enfermedades pueden causar esterilidad transitoria o permanente, pero por otro lado, en la mayoría de los casos son enfermedades tratables y el paciente puede recuperar la fertilidad. En otros casos, la enfermedad infecciosa puede haber causado daños mayores, pero si las gónadas conservan su función, aunque de forma reducida, es posible aplicar Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) con gametos de la pareja.

La aparición del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), ha hecho que acudan a consulta parejas formadas por hombres portadores de anticuerpos contra el VIH-1 y mujeres seronegativas, que desean tener hijos. Son en su mayoría pacientes sanos, sin problemas de fertilidad que se ven obligados a usar preservativo para evitar el contagio de sus cónyuges, dado que el semen es uno de los vehículos de transmisión del VIH-1. Estos pacientes tienen varias opciones reproductivas:

1. Utilizar semen de banco procedente de donante anónimo. Estos donantes son sometidos a un completo historial clínico-analítico, descartándose enfermedades hereditarias e infecciosas.
2. La adopción. Esta es una posibilidad sólo teórica puesto que en la práctica no se concede un niño en adopción a una pareja en la que uno de los miembros es portador del virus del SIDA.
3. Efectuar coito sin preservativo. Esta opción comporta el riesgo de transmisión del virus a la mujer y al hijo. Hay parejas que conscientes de la teórica baja contagiosidad del VIH-1 optan por esta alternativa. En algunas ocasiones hay médicos que incluso recomiendan o han recomendado esta práctica.

Una alternativa diferente a estas citadas fue descrita por Semprini *et al.* en 1992. Consiguieron gestaciones en estas parejas utilizando semen del marido y sin contagiar a la mujer. Con técnicas de lavado seminal, separaron las tres fracciones del semen: 1) plasma seminal; 2) células no espermáticas y espermatozoides inmóviles; y 3) espermatozoides móviles. Esta última fracción libre del VIH-1, fue utilizada para la inseminación artificial. Este trabajo aportó una solución clínica a las parejas que deseaban tener hijos genéticamente propios sin que la mujer se contagiase. Consideramos que ésta es la mejor opción de las descritas. Este trabajo está destinado a desarrollar y a sustentar esta opción.

3.

Aspectos

Preliminares

3 ASPECTOS PRELIMINARES

3.1 Conocimientos sobre el SIDA

3.1.1 Primeros casos clínicos

La enfermedad que posteriormente se llamaría en inglés *AIDS* (*acquired immune deficiency syndrome*) o SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) se comenzó a detectar en EE.UU. Los primeros casos clínicos descritos datan del año 1981 (Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.*, 1981; Siegal *et al.*, 1981). La presencia de tumores poco frecuentes, como el angiosarcoma de Kaposi junto con un cuadro de inmunodeficiencia adquirida, con alteración de la inmunidad celular, hasta entonces no descrita hizo saltar la alarma en el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (*CDC: Center for Disease Control*). Esta rara enfermedad se la llamó en un principio déficit inmunitario ligado a los gays (*GRID: gay related immunodeficiency*). Esta nomenclatura carecía de rigor científico y más tarde, con la aparición de nuevos casos en mujeres, en niños pequeños, así como en heterosexuales haitianos, drogadictos e individuos que habían recibido previamente transfusiones apuntó a que si bien los homosexuales eran una población más susceptible a esta enfermedad, había que pensar en una enfermedad infecciosa de carácter vírico.

3.1.2 Vías de transmisión

Desde las primeras investigaciones en los años 1981-82, las principales vías de contagio han permanecido siendo las mismas: sangre, contacto sexual y madre-hijo. El virus es transmitido por el uso de drogas inyectadas, por transfusión de sangre o inyección de hemoderivados contaminados con virus, por relaciones sexuales y, en el caso de madre a hijo, durante el parto o durante la lactancia materna (Buehler *et al.*, 1995).

Los patrones de transmisión tienen variantes en diferentes partes del mundo. Por ejemplo, mientras en el Reino Unido y la península Escandinava la mayoría

de casos descritos son homosexuales, en Italia y España la mayoría de personas con SIDA son usuarios de drogas por vía parenteral (European Centre for the Epidemiologic Monitoring of AIDS, 1995). En el Africa sub-Sahariana la principal vía de transmisión es la heterosexual (Petersen *et al.*, 1993).

Además de en sangre, semen y secreciones cervico-vaginales, han sido aislados virus en diferentes fluidos corporales: lágrimas (Fujikawa *et al.*, 1985), secreciones del oído medio (Liederman *et al.*, 1998), saliva (Goto *et al.*, 1991), orina (Li *et al.*, 1990), leche (Thiry *et al.*, 1985), líquido sinovial (Withrington *et al.*, 1987) y líquido cerebroespinal (Cheng-Mayer y Levy, 1988). Todos estos fluidos no parecen jugar un papel importante en la transmisión del VIH, si bien la leche materna ha sido descrita como vector del virus (Duun *et al.*, 1992). Parece que la leche materna al igual que la saliva contienen una sustancia antiviral protectora (Amory *et al.*, 1992; Newburg *et al.*, 1992). Lo que parece claro es que independientemente de la vía, la transmisión depende de la cantidad de virus, del tiempo de exposición, y de la forma del virus, virión (partícula viral extracelular y en forma de RNA) o provirus (virus integrado en el genoma de la célula infectada y constituido por DNA).

3.1.2.1 Transmisión por sangre o hemoderivados

La sangre ha sido descrita como la principal fuente de transmisión del virus. Se estima que un individuo asintomático presenta en su sangre una media de 100 partículas infecciosas por ml (Ho *et al.*, 1989; Pan *et al.*, 1993) mientras que el número de células mononucleares en sangre periférica infectadas es de 1 de cada 1.000 (Harper *et al.*, 1986; Psallidopoulos *et al.*, 1989; Schnittman *et al.*, 1989; Schnittman *et al.*, 1990; Brinchmann *et al.*, 1991; Hsia y Spector, 1991; Bagasra *et al.*, 1992).

La capacidad de infección es mayor cuando se transmiten células infectadas, porque si estas células están en estado latente pueden activarse en el nuevo huésped (Margolick *et al.*, 1987). La cantidad de células infectadas en la sangre

es 50 veces mayor que la cantidad de partículas víricas libres. Además, una célula infectada puede producir varios miles de partículas diariamente (Levy, 1993). La viremia varía según la fase clínica; así durante la fase aguda de infección primaria podemos encontrar 5×10^6 viriones/ml; en la fase asintomática encontramos cifras de 8×10^4 y en la fase terminal de proliferación de enfermedades oportunistas encontramos unos $2,5 \times 10^6$ viriones/ml.

En el caso de los hemofílicos, la transmisión es solo posible por virus libres. Los retrovirus sobreviven al proceso de liofilización (Levy y Fieldsteel, 1982; Levy *et al.*, 1984). Entre los años 1980 y 1983 los viales de factor VIII y factor IX procedían de concentrados de 2.000 ó más donaciones (Levy, 1993a). En esos viales se ha detectado la presencia de RNA vírico (Semple *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1991). Se estima que el número de partículas virales en estos preparados era bajo (menos de 10 por vial), por esto se asocia la transmisión del VIH a pacientes hemofílicos con la recepción de múltiples preparaciones de factor de coagulación (Koerper, 1989). En la actualidad los preparados de factor VIII y factor IX son calentados a altas temperaturas ($>60^\circ\text{C}$) antes o después de la liofilización; esto previene casi completamente a los pacientes hemofílicos de una posible infección (Levy *et al.* 1984; Levy *et al.*, 1985; McDougal *et al.*, 1985).

3.1.2.2 Transmisión sexual

La vía de transmisión sexual fue la que en un principio inició la propagación de la enfermedad entre el colectivo de homosexuales. En los últimos años la transmisión por contactos heterosexuales es la responsable de la mayoría de los contagios a nivel mundial (Neal *et al.*, 1997; Ward y Duchin 1997; Horowitz *et al.*, 1998).

Parece que la transmisión del VIH a través de fluidos genitales ocurre más frecuentemente por contacto directo célula-célula que por acción de virus libres (Pearce-Pratt y Phillips, 1993). Existe una gran variación en cuanto al riesgo de contagio por vía sexual entre unas parejas y otras, que es debida a la mayor o

menor presencia de células infectadas o virus libres en estos individuos. Se ha descrito que personas con enfermedades de transmisión sexual (ETS) tienen mayor riesgo de transmisión debido a la mayor presencia de células inflamatorias en los fluidos genitales (Cameron *et al.*, 1989; Hira *et al.*, 1990; Plummer *et al.*, 1991; Hunter y Maggwa, 1994).

La vía de entrada en la persona receptora de la relación sexual es anal o vaginal. Se supone que las abrasiones en estas vías están relacionadas con una mayor incidencia de contagio. En Africa, donde existe una gran incidencia de transmisión heterosexual, se relaciona una mayor seroprevalencia del VIH con la presencia de úlceras genitales debidas a ETS (Cameron *et al.*, 1989; Hira *et al.*, 1990; Plummer *et al.*, 1991; Telzak *et al.*, 1993; Hunter y Maggwa, 1994).

Diversos estudios realizados en biopsias de tejidos sugieren que la mucosa intestinal y el epitelio vaginal pueden ser infectados directamente por el virus sin necesidad de que existan ulceraciones (Mathijs *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 1988; Pomerantz *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 1989; Heise *et al.*, 1991). El contacto directo de las células infectadas presentes en el semen con la mucosa intestinal y probablemente vaginal puede ser la causa del alto riesgo de transmisión asociado con el contacto receptivo anal-genital (Bourinbaïar y Phillips, 1991; Phillips y Bourinbaïar, 1992; Pearce-Pratt y Phillips, 1993). El riesgo de contagio es mayor si se realiza una ducha local previa, puesto que de esta forma es eliminada la secreción mucosa y el contacto del virus con el epitelio es más directo (Winkelstein *et al.*, 1987).

En las mujeres, el riesgo de contagio es mayor durante los días de la menstruación (Levy, 1989; Levy, 1993) y en aquellas cuyas parejas masculinas no han sido circuncidadas (Cameron *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989; Kreiss y Hopkins, 1993; Hunter y Maggwa, 1994).

La infección es también posible en caso de contacto oral-genital, especialmente para el receptor, aunque con una menor frecuencia (Winkelstein *et al.*, 1987; Samuel *et al.*, 1993).

El empleo de espermicidas puede aumentar el riesgo de transmisión viral al causar irritación vaginal y cervical (Niruthisard *et al.*, 1991). El uso del preservativo ha demostrado su eficacia preventiva en estudios epidemiológicos (Conant *et al.*, 1986; Ngugi *et al.*, 1988).

3.1.2.3 Transmisión vertical de madre a hijo

El aumento del colectivo de mujeres embarazadas e infectadas con el VIH ha hecho que los clínicos acentúen la necesidad de comprender los efectos de esta infección en la mujer y en el niño no nacido.

El VIH-1 se ha detectado en placentas y fetos de 15 a 20 semanas (Jovaisas *et al.*, 1985; Sprecher *et al.*, 1986) y en sangre fetal (Viscarello *et al.*, 1992). Los linfocitos fetales expresan la proteína CD4 sobre las semanas 12 a 13 (Lobach *et al.*, 1985). Otra vía de contagio madre a hijo descrita es por la sangre (heridas) y secreciones vaginales durante el parto (Cowan *et al.*, 1984). También se han descrito contagios madre-hijo en nacidos por cesárea (Minkoff *et al.*, 1987). En el caso de parto gemelar el primer nacido tiene más riesgo de contagio tanto si el parto es vaginal como por cesárea (Goedert *et al.*, 1991). El contagio más frecuente de VIH en el recién nacido es perinatal (Simonds y Rogers, 1996).

A principios de los años 90 alrededor de 7.000 mujeres infectadas con el VIH dieron a luz en Estados Unidos (Gwinn *et al.*, 1988). Hasta el 30 de junio de 1996 se habían notificado 1.650 niños con anticuerpos VIH positivos al Registro de la Comunidad de Madrid. La seropositividad es debida al paso de anticuerpos de la madre a través de la placenta. De estos 1.650 niños, el 58,1% se ha seronegativizado posteriormente y el 20,6% estaba infectado (Fernandez-Quero, 1998). A pesar de que el número de mujeres infectadas sigue en aumento, la

tendencia en Europa es que la transmisión vertical del VIH está disminuyendo. Los estudios llevados a cabo a mediados de los años 80 mostraban tasas de transmisión vertical del 25-30% mientras que las investigaciones realizadas a principios de los años 90 encontraban una tasa de transmisión del 10-15% (European Collaborative Study, 1994, 1996; European Collaborative Study and the Swiss HIV Pregnancy Cohort, 1997; Maguire *et al.*, 1997; Byers *et al.*, 1998).

Los factores mejor conocidos que influyen en la transmisión del VIH-1 de la madre al hijo son:

1. Carga viral. A mayor carga viral mayor riesgo de transmisión vertical (Sperling *et al.*, 1996; Alonso Arias *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1999).
2. Cifra de linfocitos CD4+; al disminuir la cifra de los linfocitos CD4+, aumenta el riesgo de transmisión vertical (European Collaborative Study, 1992; Hague *et al.*, 1993). El aumento es estadísticamente significativo cuando el número de linfocitos CD4+ por mm³ es inferior a 500 (Simonds *et al.*, 1998). Otros autores no han corroborado este dato (Alonso Arias *et al.*, 1998). Un dato a considerar es que las infecciones oportunistas aparecen cuando el recuento de linfocitos CD 4+ por mm³ es inferior a 200.
3. Cepa viral infectante. Sólo un subgrupo de cepas de virus maternos se pueden transmitir selectivamente al hijo (Wolinsky *et al.*, 1992).
4. Tiempo transcurrido entre la rotura del amnios y el parto. Si es superior a 4 horas el riesgo de transmisión del virus al niño aumenta significativamente (Simonds *et al.*, 1998).
5. Prematuridad. Si el parto ocurre antes de la 37 semana de gestación se ha observado que el riesgo de transmisión vertical del VIH es mayor (Goedert *et al.*, 1989; Simonds *et al.*, 1998).

6. Tiempo de contacto de la sangre y las secreciones genitales maternas con la piel y mucosas del feto, sobre todo si presenta heridas. A mayor tiempo de contacto mayor riesgo de que el recién nacido se infecte.
7. La episiotomía, el uso de forceps o la extracción con ventosa aumentan el riesgo de transmisión en los partos vaginales, aunque sólo en los centros en los que estos procedimientos no son rutinarios (European Collaborative Study, 1992).
8. También se ha relacionado la vía de contagio del VIH-1 de la madre con el riesgo de transmisión vertical. Si la madre se contagió por UDI (uso de drogas inyectadas) el riesgo de transmisión vertical es menor que si el contagio fue sexual (Echeverria *et al.*, 1998).
9. La lactancia. Es admitida esta vía de transmisión vertical post parto. El riesgo de transmisión vertical aumenta un 14% si se práctica lactancia materna, sobre todo precozmente (Dunn *et al.*, 1992).

Las medidas terapéuticas que se han demostrado eficaces en reducir el riesgo de transmisión vertical son:

1. Tratamiento con zidovudina durante la gestación, parto y periodo neonatal. El riesgo de transmisión se reduce en un 66% y se considera la medida más eficaz. (Boyer *et al.*, 1994; CDC, 1994a; Cooper *et al.*, 1996; Fiscus *et al.*, 1996; Orloff *et al.*, 1996; Blanche *et al.*, 1997; Simonds *et al.*, 1998). La zidovudina es un inhibidor de la enzima viral transcriptasa inversa. Reduce la carga viral y aumenta el número de linfocitos CD4+, factores ambos que influyen en la transmisión vertical. El tratamiento con zidovudina reduce la transmisión vertical a menos del 8%, es decir, uno de cada 12 niños nace infectado (Simonds *et al.*, 1996; Kind *et al.*, 1996; Simonds *et al.*, 1998). Alonso Arias *et al.* (1998) encontraron que la transmisión vertical fue del 0% en mujeres tratadas con antirretrovirales

respecto a un 28,6% en las no tratadas. La dosis es de 100 mg 5 veces al día ó 200 mg tres veces al día por vía oral. El tratamiento debe iniciarse entre las 14 y las 34 semanas de gestación y continuarlo hasta el parto. La concentración de zidovudina es similar en la sangre materna y en el cordón fetal. En el líquido amniótico la concentración es 4-5 veces mayor que en la sangre (Sperling *et al.*, 1992; O' Sullivan *et al.*, 1993). La zidovudina pasa al feto por difusión pasiva, por gradiente de concentración. No se ha observado incremento de anomalías congénitas con la exposición del feto a la zidovudina en el primer trimestre de gestación, periodo en el que ocurre la organogénesis (CDC, 1994). En 1999 saltó la alarma en Francia donde se relacionó el tratamiento combinado de zidovudina y lamiduvina con alteraciones mitocondriales en los niños nacidos de mujeres infectadas (Blanche *et al.*, 1999). De otras drogas antirretrovirales hay poca información en relación con la mujer gestante. Se sabe que la zalcitabina (ddC) pasa la placenta como la zidovudina (Bawdon *et al.*, 1992). Se requieren más estudios de toxicidad de estos tratamientos. En un reciente estudio encontraron que la tasa de transmisión vertical fue sólo del 0,8% (2/244) en las madres que recibieron al menos dos fármacos frente al 8% (7/88) en los casos que sólo recibieron zidovudina (Shapiro *et al.*, 2000).

2. Evitar la prematuridad facilitando que la gestación se prolongue más allá de la 37 semana. La prematuridad incrementa el riesgo de transmisión vertical del VIH-1 (European Collaborative Study Group, 1992; St. Louis *et al.*, 1993; Landesman *et al.*, 1996; Mandelbrot *et al.*, 1996; Simonds *et al.*, 1998).
3. Atención correcta del parto (Minkoff y Mofenson, 1994; Landers y Sweet, 1996), con atención principal a tres puntos: a) acortar el tiempo entre rotura del amnios y la expulsión fetal. No ha de sobrepasar las 4 horas (Landesman *et al.*, 1996; Simonds *et al.*, 1998); b) administración de zidovudina por vía endovenosa (2 mg/kg) la primera hora seguida de

infusión (1 mg/kg) hasta el parto. c) lavado vaginal con sustancia de acción viricida. La administración de zidovudina antenatal, perinatal y neonatal es más eficaz en reducir la transmisión vertical si no se produce prematuridad, y si el intervalo entre la rotura del amnios y la expulsión fetal no es superior a 4 horas. Si el recién nacido se ha infectado a pesar de que la madre haya recibido tratamiento con zidovudina se considera que puede ser debido a los siguientes factores: la transmisión del VIH-1 al feto ha ocurrido antes de iniciar el tratamiento; la zidovudina no ha conseguido reducir, en esa mujer, la carga viral; la cepa es resistente a la zidovudina (Wolinsky *et al.*, 1992). Pueden aparecer cepas resistentes a la zidovudina a las 16 semanas de la administración, o es posible que el tratamiento no se haya hecho correctamente. En caso de elevada carga viral en la mujer preparto se ha propuesto administrar nevirapine. Se inicia el tratamiento unos días antes del parto. El nevirapine es un derivado de la dipirido diazepinona, que es un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleosido y un potente inhibidor de la replicación del VIH-1 (Merluzzi *et al.*, 1990). Su acción antiviral es rápida, intensa y de corta duración pues a las 4 semanas aparecen resistencias.

4. La cesárea reduce el riesgo de transmisión vertical (European Collaborative Study, 1992, 1994; Villari *et al.*, 1993; Dunn *et al.*, 1994; European Mode of Delivery Collaboration, 1999; Read, 2000; Ricci *et al.*, 2000). El riesgo disminuye si se combina la cesárea electiva con terapia antirretroviral durante los periodos prenatal, intraparto y neonatal (International Perinatal HIV Group, 1999).
5. Lavado del recién nacido. Ha de ser precoz, completo y correcto para reducir el tiempo de contacto de su piel y mucosas con sangre y/o secreciones genitales maternas contaminadas de VIH-1. Esta sencilla medida reduce el riesgo de contagio del recién nacido.

6. Administrar zidovudina por vía oral (2mg/kg/cada 6 horas) al recién nacido. Iniciar el tratamiento a las 8-12 horas del nacimiento y mantenerlo durante 6 semanas.

7. Indicar que no se practique la lactancia materna (CDC, 2000; Nduati *et al.*, 2000).

3.1.3 Epidemiología

Según el informe sobre la epidemia mundial del VIH/SIDA de 1999 (UNAIDS, 2000), 34,3 millones de personas vivían con el VIH/SIDA a finales de 1999, de los cuales 17,3 millones eran hombres adultos, 15,7 millones eran mujeres adultas y 1,3 millones niños menores de 15 años. El VIH/SIDA ha causado 2,8 millones de defunciones hasta 1999. Este informe estima que la epidemia del SIDA desde su comienzo ha creado 13,2 millones de huérfanos.

La epidemia del SIDA en EE.UU. ha pasado, en menos de 15 años, de ser indetectable a ser la primera causa de muerte de la población joven adulta. Mientras el impacto global de la epidemia ha sido mayor en el África sub-Sahariana, en la actualidad la epidemia se propaga más rápidamente en el Sudeste Asiático. A menudo, la epidemia ha sido peor en países con menos recursos económicos. Ante la ausencia de vacuna, la única esperanza de control de la enfermedad radica en programas informativos que enfatizan en el uso del condón.

En España el SIDA presenta la tasa de incidencia más elevada entre los países europeos (Tello y Castilla, 1998). En 1990 el grupo de edad más afectado era el comprendido entre 25 y 29 años; a partir de 1993 se observa un cambio y el grupo más afectado es el de 30 a 34 años cuyo porcentaje de casos se va elevando ligeramente hasta alcanzar en 1996 un 35,1%. Los primeros casos detectados en España datan de 1981; desde entonces el número de nuevos casos ha ido incrementándose cada año hasta alcanzar su máximo en 1994 con 7.080 casos. Desde 1981 hasta junio del 2000 se han diagnosticado un total de 58.091 casos de SIDA; en el 54% de ellos se ha notificado ya su fallecimiento. En el año 1999 se notificaron 2.536 nuevos casos, entre los cuales el 80% son hombres. El número de casos nuevos de SIDA ha disminuido más de un 60% en los últimos 5 años debido al conjunto de los avances en prevención, asistencia sanitaria, pero fundamentalmente a los nuevos tratamientos antirretrovirales. El mayor descenso se registró entre 1996 y 1997, mientras que en los últimos años la

3. Aspectos preliminares

incidencia tiende a estabilizarse por encima de 2.500 casos nuevos anuales. La edad media en el momento del diagnóstico ha ascendido a 37,4 años y sólo el 0,5% de los casos eran menores de 13 años.

La vía de transmisión más frecuente ha sido compartir material de inyección para la administración de drogas por vía parenteral (58%), tanto en hombres (60%) como en mujeres (54%). El número de pacientes contagiados por hemoderivados y transfusiones ha sufrido un importante descenso, y han disminuido también los casos de usuarios de drogas inyectables y los de transmisión homo/bisexual. La transmisión madre-hijo se mantiene mientras que la transmisión heterosexual muestra un incremento constante desde 1985.

Tabla 3.1. Casos por Comunidad Autónoma y provincia de residencia, según la categoría de transmisión. Casos acumulados desde 1981^a.

CC.AA.	Provincia	Homo/ bisex.	UDVP	Hemo- der.	Trans- fusión	Madre- hijo	Hetero- sexual	Otros /N.C.	Total
ANDALUCÍA	Almería	34	355	11	3	4	85	22	514
	Cádiz	64	1406	25	11	15	140	63	1724
	Córdoba	18	434	11	6	6	70	14	559
	Granada	43	451	7	1	15	79	40	636
	Huelva	31	382	5	2	7	64	15	506
	Jaén	12	266	10	2	9	61	11	371
	Málaga	299	1428	36	11	18	229	48	2069
	Sevilla	147	1178	36	6	15	175	48	1605
Total	648	5900	141	42	89	903	261	7984	
ARAGÓN	Huesca	8	97	4	1	3	32	14	159
	Teruel	5	59	4	1	1	11	4	85
	Zaragoza	68	508	23	4	16	154	65	838
	Total	81	664	31	6	20	197	83	1082
ASTURIAS	Asturias	103	640	11	14	9	171	64	1012
BALEARES	Baleares	370	854	23	12	31	275	83	1648
CANARIAS	Las Palmas	311	237	13	5	14	139	84	803
	S.C.Tenerife	174	247	12	7	4	80	48	572
	Total	485	484	25	12	18	219	132	1375
CANTABRIA	Cantabria	54	381	5	3	11	65	23	542
CAST-LA MANCHA	Albacete	12	90	1	1	6	24	4	138
	Ciudad Real	12	77	7	2	1	10	9	118
	Cuenca	15	86	1	1	.	9	7	119
	Guadalajara	8	106	5	4	3	21	6	153
	Toledo	33	335	8	3	3	74	28	484
	Total	80	694	22	11	13	138	54	1012

3. Aspectos preliminares

Continuación...

CC.AA.	Provincia	Homo/ bisex.	UDVP	Hemo- der.	Trans- fusión	Madre- niño	Hetero- sexual	Otros /N.C.	Total
CASTILLA Y LEÓN	Ávila	6	69	1	2	1	14	1	94
	Burgos	19	251	4	3	9	41	13	340
	León	20	181	12	15	7	69	12	316
	Palencia	10	128	3	.	2	27	6	176
	Salamanca	9	202	6	.	8	33	6	264
	Segovia	11	39	5	.	2	11	3	71
	Soria	1	32	4	.	.	9	2	48
	Valladolid	44	375	13	2	8	48	10	500
	Zamora	6	113	6	.	2	16	3	146
	Total	126	1390	54	22	39	268	56	1955
CATALUNA	Barcelona	2239	6202	83	41	162	1499	619	10845
	Girona	91	427	7	6	24	115	59	729
	Lleida	22	267	5	1	5	78	29	407
	Tarragona	90	468	13	2	6	130	38	747
		Total	2442	7364	108	50	197	1822	745
COM. VALENCIANA	Alicante	232	826	19	3	8	165	99	1352
	Castellón	37	192	3	1	7	80	15	315
	Valencia	352	2005	28	27	65	353	261	3081
		Total	621	3023	50	31	70	578	375
EXTREMADURA	Badajoz	25	294	14	3	7	23	25	391
	Cáceres	17	224	4	1	7	39	17	309
		Total	42	518	18	4	14	62	42
GALICIA	A Coruña	91	769	27	11	4	167	30	1099
	Lugo	11	169	4	3	3	46	7	243
	Ourense	26	229	7	5	1	58	13	339
	Pontevedra	88	730	19	10	5	202	37	1091
		Total	216	1897	57	29	13	473	87
MADRID	Madrid	2161	9419	128	71	220	1274	559	13832
MURCIA	Murcia	171	585	17	5	16	172	50	1016
NAVARRA	Navarra	48	482	9	3	5	94	31	672
PAIS VASCO	Álava	30	396	5	2	3	71	10	526
	Guipúzcoa	63	1021	26	8	16	151	34	1319
	Vizcaya	135	1840	25	11	40	306	65	2422
		Total	228	3257	56	21	59	528	118
LA RIOJA	La Rioja	14	254	3	1	9	67	12	360
CEUTA	Ceuta	4	94	.	.	1	10	13	122
MELILLA	Melilla	7	41	.	2	1	5	3	59
OTROS PAÍSES		88	66	2	5	2	21	21	205
TOTAL		7989	38007	760	344	837	7342	2812	58091

Homo/bisex.=Hombres homo y bisexuales; UDVP=Usuarios de drogas por vía parenteral;
Hemoder.=Receptores de hemoderivados; Transfusión=Receptores de transfusiones sanguíneas;
Heterosexual=Relaciones heterosexuales de riesgo; Otros/N.C.=Otras exposiciones de riesgo o no conocidas.

*Registro Nacional de SIDA. Actualizado a 30/06/2000

En la Tabla 3.1 se muestra la distribución por comunidades autónomas y provincias de los casos de SIDA acumulados en España desde 1981 (Centro Nacional de Epidemiología, 2000).

3.1.4 El virus del SIDA

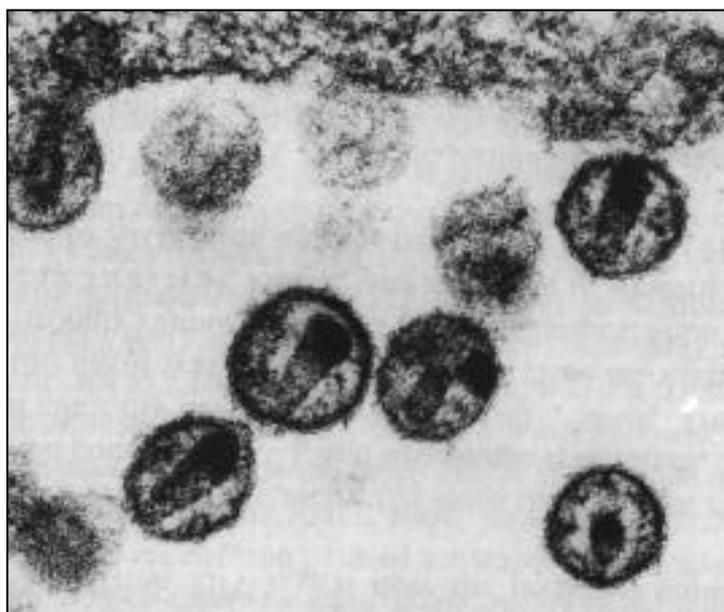
3.1.4.1 Descubrimiento del virus del SIDA.

En 1983 fue cuando por primera vez se apuntó que el SIDA era causado por un retrovirus. En un principio este virus fue denominado HTLV (*human T-cell leukemia virus*) por sus características similares al grupo de retrovirus conocido causante de la leucemia humana de células T (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983). Posteriormente se comprobó que se trataba de otro virus ya que el HTLV no destruía los linfocitos en cultivo; de hecho, frecuentemente inmortalizaba el cultivo en continuo crecimiento. El problema de la identificación correcta del virus radicaba en la pobre replicación en cultivo celular. Muy poco después Montagnier *et al.* (1984) aislan el que posteriormente llamarían LAV (*lymphadenopathy-associated virus*) como potencial agente etiológico del SIDA. Simultáneamente Gallo *et al.* (1984) describen otro retrovirus al que llaman HTLV-III. Este retrovirus lo aislan de células mononucleares de sangre periférica en hombres con SIDA. Al parecer el virus identificado por Gallo procedía de una contaminación con el virus LAV que el Instituto Pasteur había mandado al Instituto Nacional de la Salud (Hamilton, 1991; Chang *et al.*, 1993). Levy *et al.* (1984a) por esas mismas fechas identifican el denominado ARV (*AIDS-associated retroviruses*). Estos tres "prototipos" de virus (LAV, HTLV-III y ARV) son reconocidos como pertenecientes al mismo grupo de retrovirus y sus propiedades identificadas como pertenecientes al subgrupo lentivirus. En 1986 el Comité Internacional en Taxonomía de Virus recomendó dar un nuevo nombre al virus del SIDA, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Coffin *et al.*, 1986)

3.1.4.2 Estructura del VIH-1

La observación del VIH al microscopio electrónico de alta resolución muestra una envoltura con estructura icosaédrica externa formada por una bicapa lipídica con 72 protuberancias externas (Gelderblom *et al.*, 1987) (Figura 3.1). Estas estructuras externas corresponden a las dos mayores proteínas de la envoltura del virus, la gp120 y la gp41. Esta envoltura protege una nucleocápside formada por cuatro proteínas, p24, p17, p9 y p7 (Figura 3.2). Estas cuatro proteínas se forman a partir de una proteína precursora de 53-kD producto del gen *gag* por acción de la VIH-1 proteasa.

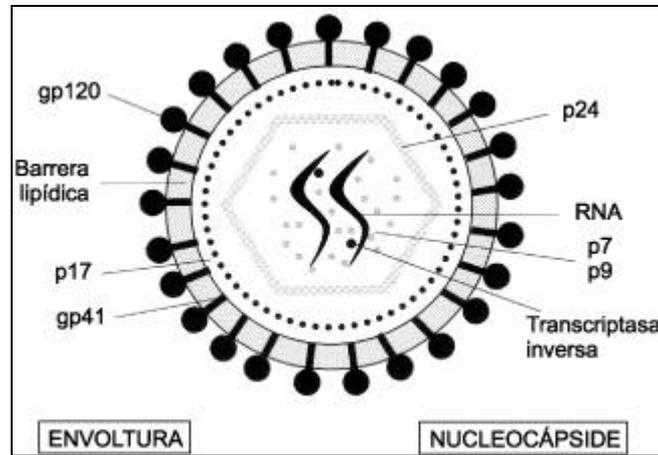
Figura 3.1



El polipéptido fosforilado p24 forma la estructura principal de la nucleocápside con forma de cono achatado. La p17 está ligada a la parte interna de la bicapa lipídica y probablemente tenga una función de estabilización de los componentes externos e internos del virión. Las proteínas p7 y p9 se unen directamente al RNA del virus formando lo que se conoce como nucleocápside o *core*. El *core* además de estas proteínas contiene dos copias de RNA de cadena

única y varias enzimas virales (transcriptasa inversa, RNasa H, integrasa y proteasa)

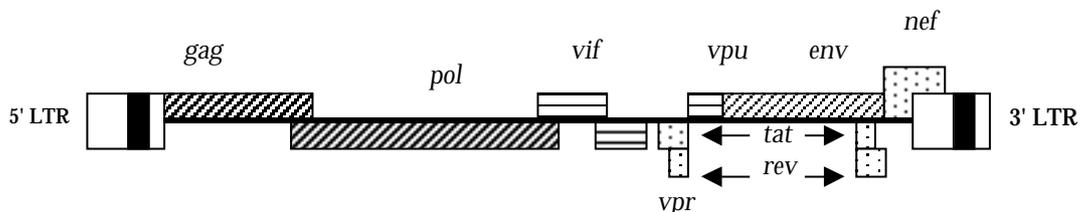
Figura 3.2



3.1.4.3 Genoma del VIH-1

El genoma del VIH tiene un tamaño de 9,8 kilobases. El VIH, así como la mayoría de retrovirus con capacidad replicatoria, contiene sólo tres genes esenciales denominados *gag*, *pol* y *env* (Varmus, 1988). Diversos fenómenos de ajuste (*splicing*) producen muchos RNAm subgenómicos que son importantes para la síntesis de otras proteínas virales. Al menos se conocen seis genes adicionales: *tat* y *rev* que codifican proteínas reguladoras; y *vpu*, *vpr*, *vif* y *nef* que codifican otras proteínas accesorias (Figura 3.3).

Figura 3.3



3.1.4.3.1 Precursor Gag-Pol

El gen *gag* codifica los polipéptidos de la nucleocápside o *core*. El gen *pol* codifica la transcriptasa inversa del virus y otras proteínas con actividad enzimática. El primer fragmento que es traducido proviene de un único transcrito común a los genes *gag* y *pol* y corresponde a una proteína precursora, Pr160, de las proteínas Gag y Pol. La proteína precursora Gag (p55), por rotura proteolítica, da lugar a las cuatro proteínas estructurales más pequeñas: p17, p24, p9 y p7 (Gottlinger *et al.*, 1989). La proteína precursora Pol se divide proteolíticamente en cuatro proteínas: transcriptasa inversa (RT: *reverse transcriptase*), proteasa (PR: *protease*), ribonucleasa H (RNase H) e integrasa (IN: *integrase*). La PR procesa las poliproteínas Gag y Pol. La IN se ocupa de la integración del virus en el genoma de la célula huésped.

3.1.4.3.2 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.

3.1.4.3.3 Tat

La proteína Tat está implicada en inducir la replicación del VIH (Ruben *et al.*, 1989). 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 y Green, 1991; Tiley *et al.*, 1992)

3.1.4.3.4 *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 *et al.*, 1998).

3.1.4.3.5 *Nef*

La proteína Nef (*negative factor*), de 27 kD se pensaba que actuaba inhibiendo la replicación del VIH-1 (Terwilligner *et al.*, 1986; Luciw *et al.*, 1987) por regulación negativa de la actividad transcripcional (Ahmad y Venkatesan, 1988; Niederman *et al.*, 1989), de ahí su nombre de “factor negativo”. Actualmente se piensa que Nef actúa como factor positivo aumentando la infectividad del VIH (Fisher *et al.*, 1986; Chowers *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994; Rhee y Marsh, 1994; Miller *et al.*, 1995). La proteína Nef ejerce una regulación negativa de la expresión del receptor celular CD4 (García y Miller, 1992) y actúa inhibiendo las células-T. Ciertos defectos en el gen *nef* han sido asociados con la ausencia de desarrollo de la enfermedad en individuos infectados (Deacon *et al.*, 1995).

3.1.4.3.6 *Vpr*

Vpr juega un importante papel en la capacidad infectiva del VIH sobre células que no se encuentran en división (Heinzinger *et al.*, 1994). También la proteína Vpr es capaz de bloquear el ciclo celular en la fase G2 (Jowett *et al.*, 1995; Rogel *et al.*, 1995)

3.1.4.3.7 *Vpu*

El gen *vpu* codifica un polipéptido de 16 kD que se localiza en la membrana interna de la célula (Sato *et al.*, 1990). *Vpu* proviene del mismo RNAm que *env*, pero se traduce en una frecuencia diez veces menor que *Env* debido a un codon de inicio de traducción poco eficiente (Schwartz *et al.*, 1990). *Vpu* tiene una doble función:

1. Actúa degradando los complejos intracelulares formados por CD4 y *Env* que dificultan el ensamblaje de las partículas virales (Willey *et al.*, 1992).
2. Incrementa la liberación de partículas en la superficie de las células infectadas. En ausencia de *Vpu*, pueden verse un gran número de viriones unidos a la superficie de la célula (Klimkait *et al.*, 1990).

3.1.4.3.8 *Vif*

Vif es un polipéptido esencial para la replicación del VIH en linfocitos de sangre periférica, macrófagos y ciertas líneas celulares (Strebel *et al.*, 1987). 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 DNA provírico eficientemente (von Schwedler *et al.*, 1993). 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).

3.1.4.4 Ciclo de replicación del VIH tipo 1

El ciclo de replicación del virus de la inmunodeficiencia humana se puede dividir en 9 pasos que a continuación describimos:

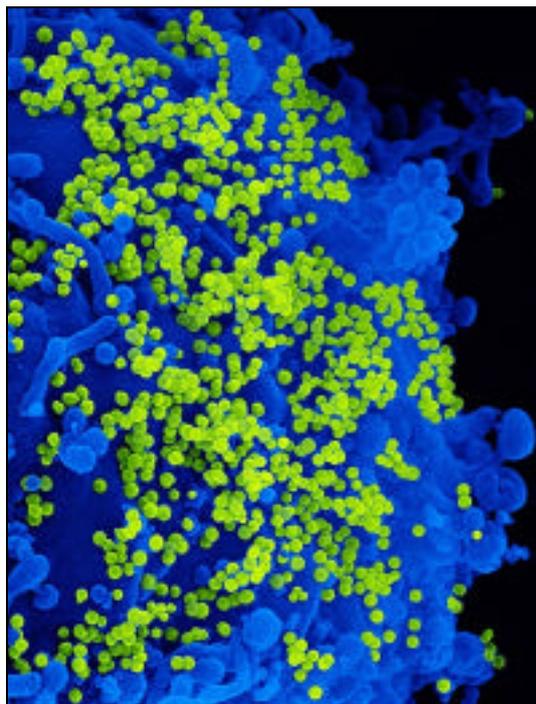
1. El ciclo de replicación comienza con la unión del virus a una célula diana susceptible mediante la interacción específica entre la glicoproteína viral de la envoltura gp120 y el receptor de superficie celular CD4 (Maddon *et al.*, 1986). En otros tipos celulares como células gliales y neuroblastos, el glicolípido galactosil ceramida parece actuar como receptor de la gp120 (Harouse *et al.*, 1991).
2. Posterior 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, dependiendo del tipo celular y de la cepa viral, por otros receptores de la membrana celular (fusina, CKR5, CKR3, CKR-2b)(Doranz *et al.*, 1996)
3. En los linfocitos T activados se produce la transcripción inversa del RNA viral creando una copia lineal de DNA (Katz y 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 y facilitar el escape a la neutralización por el sistema inmunitario del huésped.

4. Integración del DNA viral en el DNA genómico. Este paso depende de la actividad de la proteína viral IN. El DNA viral se puede integrar aleatoriamente en un gran número de sitios, pero existen regiones con mayor preferencia (Shih *et al.*, 1988; Pryciak y Varmus, 1992).
5. La transcripción del DNA viral es regulada por factores de transcripción de la célula huésped infectada y por la proteína viral Tat.
6. Una vez es sintetizada la cadena completa de RNA, ocurren fenómenos de ajuste diferencial regulados por la proteína viral Rev para crear diferentes RNA mensajeros. Cuando la presencia de Rev es reducida (en los estados iniciales de la infección o cuando el estado global de transcripción es bajo) se favorece la creación de RNA mensajeros con ajuste múltiple que favorecen la creación de proteínas virales reguladoras (Tat, Rev y Nef).
7. Cuando en el citoplasma se acumula un nivel suficiente de Rev, se producen menos procesos de ajuste y se favorece la creación de proteínas estructurales o enzimáticas (Gag, Pol y Env).
8. 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 y Rose, 1990). Los niveles de CD4 en la superficie celular están también regulados por las proteínas virales Nef y Vpu (García y 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 RNA transcritos de longitud completa son reconocidos por una estructura secundaria del RNA altamente estable y conservada para la formación de la nucleocápside viral (Harrison y Lever, 1992)

9. 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. La acción de la proteasa viral es esencial para la creación de viriones maduros infecciosos (Kohl *et al.*, 1988).

Se piensa que la vida libre de los viriones es muy corta, aproximadamente de 0,3-0,5 días (8-12 horas), y que en 2,6 días se realiza un ciclo viral completo con salida desde la célula infectada, infección productiva, vida libre, infección de otro linfocito, replicación intracelular y salida de nuevos viriones. De este modo se producirían unos 140 ciclos de replicación al año y en situaciones de equilibrio se estima que se producen y se destruyen del orden de 10^{12} viriones renovándose cada día alrededor del 30% de las partículas circulantes. De mismo modo se estima que del orden de 10^9 linfocitos CD4+ se producen y se destruyen diariamente probablemente a partir de la estimulación y proliferación de clones periféricos, lo que puede suponer un índice de recambio de 10 a 100 veces superior al fisiológico; en estas condiciones de equilibrio se piensa que cada 15 días se renueva la totalidad de los CD4+ circulantes siendo la vida media estimada de un linfocito infectado por el VIH de 1,2 a 2,2 días. También se ha calculado que cada célula infectada produce del orden de 10^4 a 10^5 partículas virales muchas de las cuales son defectivas, estimándose que un 1% del total de los linfocitos del organismo se infectan de novo cada día. La Figura 3.4 muestra la imagen de un linfocito infectado (las partículas virales se han coloreado de verde). Con esta dinámica poblacional y estimando la tasa de mutaciones del orden de 10^{-4} a 10^{-5} sustituciones por nucleótido copiado, se regeneran rápidamente distribuciones mutantes que podrían alcanzar los 10^{12} partículas virales circulantes en un individuo infectado.

Figura 3.4



Por lo tanto, en el organismo humano infectado el VIH se encuentra como una mezcla de variantes genéticas estrechamente relacionadas que se denominan cuasiespecies. En el modelo de cuasiespecies se acepta que la secuencia de nucleótidos del virus es indeterminada a nivel individual y sólo se definiría de un modo estadístico. En algunos casos un genoma con una secuencia definida puede ser el mayoritario (secuencia maestra) pero no siempre ocurre así ni tiene por qué coincidir con la secuencia consenso de la población viral. Las familias de virus desarrollan una serie de complejos mecanismos, llamados de escape, para no ser eliminados por la respuesta defensiva del organismos 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. La transcriptasa inversa del VIH tiene una tasa de error similar a la de otros virus RNA y se estima del orden de 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones por nucleótido copiado (de cada 1.000 a 100.000 nucleótidos copiados uno es erróneo); consecuencia de esta variabilidad se producen gran cantidad de virus defectivos pero también se da lugar a una alta diversidad de las proteínas virales que teóricamente puede

permitirles escapar a los controles inmunitarios específicos y a la presión de los antirretrovirales.

Considerado globalmente el organismo humano infectado por el VIH no se puede hablar de que exista una verdadera fase de latencia, sin embargo esta es posible en células individuales y a pesar de que probablemente no contribuyan a una producción de virus superior al 1% son de gran trascendencia porque pueden explicar la recidiva tras el fallo del tratamiento antirretroviral. En sangre periférica solo están infectados entre el 1 y el 10% de los linfocitos T CD4 circulantes, sin embargo en los órganos linfoides, especialmente los ganglios linfáticos, se piensa que pueden estar infectados más del 40% de los linfocitos CD4 presentes y que sólo una pequeña proporción de ellos, alrededor del 1%, replican activamente el genoma proviral que contienen produciendo del orden de 10^{10} viriones productivos al día y representarían a la población celular destruida (alrededor de 10^8); los virus producidos infectarían a un número parecido de células (alrededor del 1% del total) y esta población infectada de novo sería mayoritariamente de linfocitos activados para regenerar a los destruidos y en ellos el VIH experimentaría probablemente una replicación rápida sin fase de latencia. Se sabe por otro lado que el porcentaje de macrófagos infectados es muy pequeño, del orden de 1 por cada 15.000-100.000 en los órganos linfoides; a pesar de que la infección de células de las mucosas, células de Langerhans o de los macrófagos de la microglia cerebral suponen probablemente un reservorio muy pequeño del VIH, pueden jugar un papel transcendental en la transmisión sexual del virus y en la afectación del sistema nervioso central.

3.1.5 Terapia antirretroviral

Se ha hecho un grandísimo esfuerzo en el desarrollo de medicamentos que inhiban la replicación del VIH, y, al contrario de lo que ocurre con otros medicamentos, la FDA (US Food and Drug Administration) ha acelerado la aprobación de muchos de estos agentes antivirales. La terapia antirretroviral actualmente engloba tres grandes clases de agentes antirretrovirales: análogos de nucleósidos (también conocidos como inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos, ITIn), inhibidores de la proteasa (IP), e inhibidores no-nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITInn). En este apartado intentaremos describir sucintamente el papel de estos agentes antirretrovirales en el control de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana.

3.1.5.1 Análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa (ITIn)

Actúan por inhibición competitiva de la actividad de la transcriptasa inversa. Fueron los primeros en desarrollarse y en la actualidad juegan un importante papel prolongando la esperanza de vida, especialmente en combinación con otros agentes antirretrovirales. Son medicamentos seguros y generalmente bien tolerados. Actúan también previniendo el desarrollo de resistencias a los inhibidores de la proteasa. En este momento está difundida la aplicación de cinco análogos de nucleósidos: zidovudina (Retrovir, ZDV), didanosina (Videx, ddI), zalcitabina (Hivid, ddC), estavudina (Zerit, D4T), y lamivudina (Epivir, 3TC). Pero se están desarrollando nuevos ensayos (abacabir, emtricitabina, lodenosina, dOTC, DAPD) y han aparecido algunos análogos de nucleótidos (adefovir, tenofovir). Recientemente se ha comercializado un comprimido que, para facilitar la administración, combina dos ITIn (zidovudina y lamivudina) y es conocido por el nombre de Convivir.

3.1.5.2 Inhibidores de la proteasa (IP)

La FDA aprobó en diciembre de 1995 el uso del primer inhibidor de la proteasa viral del VIH en combinación con uno o más ITIn, el saquinavir (Invirase). Posteriormente aparecieron en el mercado otros tres IP: ritonavir (Norvir), indinavir (Crixivan), y nelfinavir (Viracept). La continua aparición de resistencia a los agentes antirretrovirales hace que cada día aparezcan nuevos medicamentos que intentan evadir estas resistencias, y numerosos IP se encuentran actualmente en fase de ensayo (Amprenavir, ABT-378, L-756,423, Tipranavir, AG 1776, BMS-232632, DMP-450). En general los IP suelen presentar más problemas de toxicidad que los ITIn. Los efectos a largo plazo de la administración prolongada de IP son desconocidos, pero en la literatura comienzan a aparecer complicaciones asociadas al uso prolongado de IP (pérdida de cabello, enfermedad arterial coronaria prematura, diabetes mellitus...). Aunque es difícil atribuir estas complicaciones exclusivamente a los IP, hay que ser cautos y profundizar en los estudios de toxicidad.

3.1.5.3 Inhibidores no-nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITInn)

A mediados de 1996 aparecen en el mercado una nueva generación de inhibidores de la transcriptasa inversa viral, los análogos no-nucleósidos. Estos ITInn difieren de los ITIn en que presentan una estructura química más heterogénea. Actúan de forma no competitiva sobre la región catalítica de la enzima. A diferencia de los ITIn, no requieren una fosforilación intracelular para ser activados. No se han descrito reacciones de resistencias cruzadas entre los ITIn y los ITInn. Dentro de esta familia de inhibidores encontramos tres agentes: nevirapina (Viramune), Delavirdina (Rescriptor), y Efavirenz (Sustiva). Además se encuentran en fase de estudio otros como: emivirina, GW-420867X, AG 1549, Calanolide A, DMP 961, y DMP 963.

3.1.6 Breve referencia al VIH-2

En 1985, Barin *et al.* encuentran, en prostitutas sanas del Senegal, anticuerpos que presentan reacciones cruzadas con el virus de la inmunodeficiencia de los simios. Clavel *et al.* (1986) aísla, en pacientes con SIDA de Guinea-Bissau y Cabo Verde, este agente que posteriormente sería conocido como VIH tipo 2. Este virus ha sido encontrado retrospectivamente en sueros almacenados de personas del oeste de África desde los años 60 (Kawamura *et al.*, 1989).

El VIH-2 no parece ser tan patogénico para los humanos como el VIH-1. La probabilidad de desarrollar recuentos de linfocitos CD4+ anómalos se calcula en aproximadamente el 1% por año *versus* un 10% por año en la infección con VIH-1.

La tasa de mortalidad de pacientes infectados por VIH-2 es de dos tercios la de pacientes infectados por VIH-1 (Whittle *et al.*, 1994). Las vías de transmisión del VIH-2 parecen ser similares a las del VIH-1, principalmente contacto heterosexual. La transmisión heterosexual del VIH-2 es aproximadamente tres veces menor que la del VIH-1 (Kanki *et al.*, 1994). Se ha descrito transmisión por hemoderivados y transmisión vertical, aunque esta última parece también menos eficiente que la del VIH-1 (Poulsen *et al.*, 1989). Se estima una tasa de infección del 0-4% en los niños nacidos de madres seropositivas al VIH-2 frente al 25-35% en los niños nacidos de madres seropositivas al VIH-1 (Marlink, 1996).

3.2 Técnicas de detección del VIH-1

Las técnicas usadas en la búsqueda de VIH-1 presentan distintas características, al enfocar el estudio del virus bajo ángulos distintos. Algunas de ellas buscan la presencia del virus (por ejemplo, el antígeno), y otras sus posibles efectos en el sistema inmunológico (anticuerpos). Se efectúa una revisión de sus características básicas, de modo que el estudio de presencia de VIH-1 para su uso en técnicas de reproducción asistida asegure usar la técnica más apropiada.

3.2.1 Determinación de anticuerpos

Existen diferentes métodos para la realización de las pruebas de cribado para la detección de anticuerpos específicos frente al VIH. Entre ellos las técnicas ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*), pruebas de aglutinación y análisis dot-blot son las más utilizadas, especialmente el ELISA, que también se denomina análisis inmunoenzimático (abreviado, EIA).

La comercialización de las técnicas EIA para la detección de anticuerpos anti-VIH arranca en 1985, y en la actualidad se usan de un modo rutinario en todos los laboratorios de Microbiología Clínica y en los Bancos de Sangre o Centros de Transfusiones de casi todos los países desarrollados del mundo. En ellas, el antígeno puede proceder del lisado viral de un cultivo (como en los primeros EIA disponibles que se llamaron de 1ª generación) o bien de proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de 10-50 aminoácidos específicos del VIH (que se han calificado como EIA de 2ª. y de 3ª. generación). Prácticamente la totalidad de las empresas que ofrecen reactivos diagnósticos tienen su técnica anti VIH que, en España, es aprobada después de un estudio exhaustivo por el Instituto Carlos III.

Según su diseño para reconocer la presencia de anticuerpos se habla fundamentalmente de cuatro tipos de EIA diferentes: indirecto, competitivo, tipo sandwich y de captura. Los dos últimos suelen ser los más sensibles y

específicos; dentro de los primeros, los indirectos son más sensibles que los competitivos, y éstos más específicos que aquéllos.

Durante los últimos años se han desarrollado técnicas mixtas, que permiten detectar simultáneamente anticuerpos frente al VIH-1 y frente al VIH-2, e incluso frente a otros retrovirus, y que se utilizan rutinariamente en la mayoría de los centros de nuestro país. Más recientemente se han desarrollado técnicas duales que permiten la detección simultánea de antígeno y de anticuerpos frente al VIH-1.

De un modo esquemático, la muestra, suero normalmente, se enfrenta en un soporte, generalmente un pocillo de una placa de microtitulación, a un componente vírico que actúa como antígeno. Si en el suero existen anticuerpos específicos, éstos se unen con el antígeno formando un complejo que se pone en evidencia mediante una reacción enzimo-cromática que puede ser visualizada a simple vista, o medida con un fotómetro. Por lo general, en las técnicas ELISA no competitivas la muestra es positiva cuando se desarrolla color. Métodos más modernos emplean técnicas de quimioluminiscencia.

Las técnicas EIA, por lo general muy sensibles, detectan mínimas cantidades de anticuerpos, por lo que pequeñas interferencias de sustancias similares podrían conducir a un resultado positivo falso. La probabilidad de un resultado falsamente positivo es mayor cuanto más baja es la prevalencia de la infección en la población estudiada. La práctica habitual de los centros que obtienen resultados positivos es utilizar al menos otra técnica ELISA para reafirmar la positividad, a ser posible con un diseño de reconocimiento de anticuerpos diferente; cuando la positividad se repite con un segundo EIA se confirman los resultados con otras técnicas de alta especificidad, usualmente con técnicas de inmunoblot. Además, se suele solicitar siempre una segunda muestra del paciente para evitar posibles equivocaciones en la manipulación de los sueros, con lo que la probabilidad de emitir resultados erróneos queda muy reducida. A pesar de todo hay descritas posible causas de resultados **falsos**, positivos y negativos, de las pruebas EIA (Tabla 3.2).

Tabla 3.2

FALSOS POSITIVOS DE LOS EIA	FALSOS NEGATIVOS DE LOS EIA
<p>Interferencia de</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos como los que se dirigen frente a antígenos de músculo liso, células parietales, mitocondriales, nucleares, leucocitarios y de células T. • Presencia de anticuerpos IgM frente al core del virus B de la hepatitis y frente al virus A de la hepatitis • Anticuerpos frente a antígenos leucocitarios de clase II de células H9 que pueden estar presentes en mujeres embarazadas multíparas y sujetos politransfundidos. 	<p>Periodo de incubación de la infección o enfermedad aguda antes de la seroconversión (periodo ventana)</p>
<p>Enfermedades del hígado como hepatopatía alcohólica grave, cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante</p>	<p>Tratamientos inmunosupresores intensivos o prolongados</p>
<p>Inactivación del suero por calor o positividad a RPR (reaginas plasmáticas)</p>	<p>Procesos malignos</p>
<p>Procesos hematológicos malignos, como linfomas</p>	<p>Transfusión de reposición</p>
<p>Infección por VIH-2 u otros retrovirus</p>	<p>Transplante de médula ósea</p>
<p>Infecciones agudas por virus DNA</p>	<p>Disfunciones de las células B</p>
<p>Vacunación contra la gripe</p>	<p>Interferencia de factores reumatoideos</p>
<p>Insuficiencia renal crónica y transplante renal</p>	<p>Equipos que detectan principalmente anti-p24</p>
<p>Síndrome de Steve-Johnson</p>	<p>Pérdida de estabilidad de los componentes del equipo de reactivos</p>
<p>Anticuerpos anti-VIH-1 adquiridos de forma pasiva, por ejemplo mediante inmunoglobulinas.</p>	

Los pacientes masculinos portadores del virus de la inmunodeficiencia humana son todos ellos anticuerpo-positivos, una vez transcurrido el periodo ventana, en suero (seropositivos). Debido a que esta determinación sólo pone de

manifiesto el estado inmunológico de la persona (que ya se sabe es positivo), no es útil como estudio de presencia de virus en el semen.

3.2.2 Pruebas de confirmación de seropositividad

Las pruebas llamadas de confirmación tienen como objeto verificar (confirmar) que los resultados obtenidos con las pruebas de cribado son correctos.

El fundamento de la principal prueba confirmatoria de la actualidad, o Western blot (WB), es una discriminación de los antígenos del VIH frente a los que se dirigen los anticuerpos presentes en la muestra.

Básicamente se basa en la separación de las proteínas (antígenos) obtenidas del VIH-1 procedentes del lisado del cultivo del virus y purificadas por centrifugación. La proteína viral así obtenida se coloca en un gel de poliacrilamida en forma de láminas delgadas, y luego se efectúa una electroforesis, con la que las proteínas de menor peso molecular (p17, p24) migran más lejos en el gel, mientras que las de mayor peso molecular se mantienen cerca de su lugar de depósito. Después se transfieren a una tira de nitrocelulosa, y se cortan en tiras de unos 5 mm de ancho. Estas son las tiras que se exponen al suero humano diluido; después de una incubación se lavan, y se vuelven a incubar con una IgG antihumana marcada con una enzima, que con la exposición a un revelador enzimático producirá una banda coloreada en las zonas correspondientes a los anticuerpos específicos que contenga la muestra. Por lo general cada uno de los diferentes equipos comerciales que existen para la realización de la prueba contienen instrucciones precisas de cómo interpretar los resultados obtenidos con unos criterios de positividad más o menos restrictivos, y sus tiras pueden contener un número variable de bandas; las principales bandas del WB se recogen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3

Principales bandas del Western blot			
Denominación	Proteína	Gen	
gp160	Precursora de la envoltura	env	
gp120	Glucoproteína externa		
gp41	Glucoproteína transmembrana		
p55	Precursora del core	gag	
p40			
p24			Proteína principal
p17			Proteína de la matriz
p66	Transcriptasa inversa	pol	
p51			
p31			Endonucleasa

De otro lado, desde 1987 diferentes organismos internacionales y especialmente de EE.UU han propuesto criterios diferentes de interpretación del WB que se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4

Criterios mínimos de positividad del Western blot	
FDA	Existencia por lo menos de tres bandas: p24, p31 y gp41 u otra glucoproteína
ARC	Existencia de al menos 3 bandas una por cada uno de los 3 genes estructurales
CDC	Al menos dos bandas: p24, gp41 y gp160/120
CRSS	Al menos una banda del core (gag/pol) y otra de envoltura (env)
OMS	Al menos dos bandas de envoltura

Por lo general se considera que el WB es una prueba sensible para las proteínas del core, y algo menos para las de la envoltura. Por ello, durante la primoinfección, por la escasez de anti-p24 o anti-gp41, es una prueba poco sensible como los EIA; algo similar ocurre en las fases terminales por la pérdida de anti-p24. En conjunto se considera que es una prueba altamente específica con menos de 1 falso positivo por cada 20.000, mientras que la tasa de falsos negativos es, en población donante de sangre, de 1 por cada 250.000 o más.

De un modo muy esquemático se puede decir que el WB puede ofrecer tres tipos de resultados diferentes:

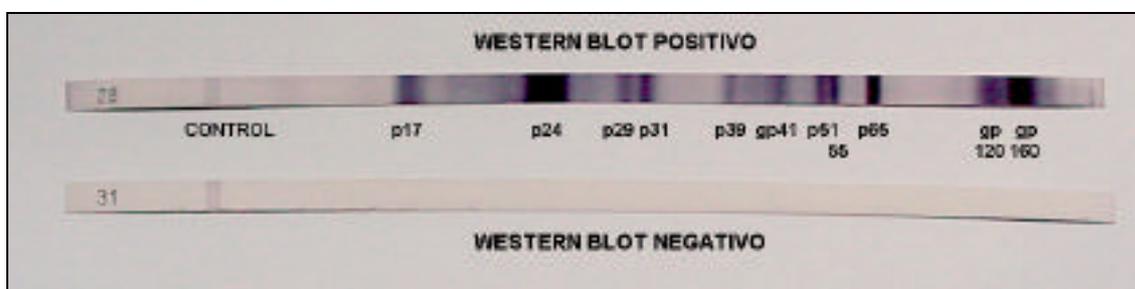
Positivo: Cuando cumple los criterios de positividad adoptados por la técnica que se está empleando (presencia de ciertas bandas).

Negativo: Cuando ninguna de las bandas presenta reacción.

Indeterminado: Cuando no es positivo o negativo.

En general para la positividad del WB al VIH-1 se requieren al menos 2 bandas de envoltura, que se consideran las más específicas, y la negatividad se obtiene por la ausencia de bandas. Muchos autores consideran los criterios de la OMS como los más específicos, teniendo en cuenta que: (1) la presencia aislada de p17 se suele considerar como negativa y no requiere seguimiento ulterior, (2) la presencia de una sola banda de la envoltura es un patrón infrecuente que puede observarse en la seroconversión y en la infección VIH-2, por lo que se recomienda repetir en WB y, en caso de persistencia, analizar una nueva muestra en 15 días, y (3) que los patrones de gag/pol sin env pueden deberse también a una seroconversión, por lo que se recomienda hacer un seguimiento periódico durante 6-12 meses, tras los cuales, si persiste el WB indeterminado y no concurren factores de riesgo en el paciente, se puede considerar negativo. La Figura 3.5 muestra un WB positivo y otro negativo.

Figura 3.5



El mayor problema que probablemente presentan los WB es la reactividad indeterminada de bandas p24, p55 ó p66. En poblaciones con bajo riesgo de infección VIH el WB indeterminado no se asocia, por lo general, con infección, mientras que en las poblaciones con riesgo alto los WB indeterminados se siguen con seroconversiones en proporciones variables. Las principales causas de WB indeterminado suelen obedecer a:

- Reactividad inespecífica (ver falsos positivos)

- Infección por VIH-2 u otros retrovirus humanos
- Seroconversión al VIH-1
- Estado avanzado de infección VIH-1
- Hijo de madre seropositiva
- Divergencias genéticas de la cepa del VIH-1 (africanos)

Aunque se han descrito diferentes causas de reacciones de WB falsas positivas para antígenos del VIH-1, las principales son similares a las que acontecen en los EIA, y se suelen deber a reacciones cruzadas con ribonucleoproteínas humanas, otros retrovirus, anticuerpos frente a antígenos mitocondriales, nucleares, de células T y leucocitarios, anticuerpos frente a antígenos HLA clases I y II y globulinas en una gammopatía monoclonal.

Además de ser una técnica de una complejidad variable, que requiere el adiestramiento en su realización e interpretación, otra de las principales desventajas del WB es su elevado precio, que lo hace inviable como prueba de confirmación en algunos países pobres. A ello se pueden sumar, como inconvenientes del método, la variabilidad reaccional que existe entre las bandas según el tipo de ensayo, el tipo de las muestras y las condiciones técnicas y la subjetividad de la interpretación de la intensidad de las bandas, que siempre depende del observador, aunque en la actualidad existen sistemas automatizados e informatizados que permiten optimizar las condiciones técnicas y la semicuantificación de las bandas del WB, lo que contribuye a objetivar mejor la interpretación final de la técnica. En un intento de mejorar y garantizar la sensibilidad del WB frente a los anticuerpos de las proteínas de la envoltura, algunos WB comerciales han incorporado péptidos sintéticos o proteínas recombinantes al lisado viral.

En la actualidad existen otras pruebas accesorias para la discriminación y confirmación de las muestras positivas en el cribado, varias de las cuales se

basan en el análisis inmunoenzimático de tipo lineal (LIA), y que suelen incorporar en un soporte plano, equivalente a la tira, varias proteínas recombinantes o péptidos sintéticos, correspondientes a diferentes proteínas del VIH-1 y, en algunos casos, del VIH-2. Estas pruebas, que son sensibles y específicas, pueden considerarse como pruebas confirmatorias y, en algunos sitios, reemplazan al WB, aunque la presencia de péptidos sintéticos puede ocasionar resultados falsos negativos en la infección VIH aguda y en niños. En algunos países se ha considerado la posibilidad de confirmación con un segundo EIA de las muestras reactivas a otro EIA inicial diferente.

Dentro de las pruebas de confirmación el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utiliza normalmente células H9 infectadas y no infectadas por el VIH-1 fijadas en pocillos de un portaobjetos. Aplicada una dilución de la muestra y el conjugado fluorescente (una anti IgG humana con isotiocianato de fluoresceína) se observa con un microscopio de fluorescencia, y se evalúa en función de la intensidad de la fluorescencia y el porcentaje entre células infectadas y no infectadas. En general, se acepta que la IFI requiere menos experiencia técnica y menos tiempo y dinero que el WB, frente al que presenta una sensibilidad y especificidad similar.

El ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) es una técnica limitada a laboratorios capaces de lograr la propagación del VIH-1 en cultivos celulares. El virus, que crece en células H9, se expone, al alcanzar un crecimiento exponencial, a una sustancia radiomarcada que, tras el procesamiento, permite detectar por autorradiografía los inmunoprecipitados que se han formado. Se considera más sensible que el WB frente a las proteínas de alto peso molecular, aunque puede detectar peor la p24. En general, es una técnica limitada a los laboratorios de investigación.

3.2.3 Determinación del antígeno p24

La detección del antígeno del VIH-1, usualmente la proteína p24, es un marcador directo de la presencia del virus en el organismo, a diferencia de las pruebas de detección de anticuerpos previamente vistas.

La búsqueda del antígeno p24 supone un cambio de estrategia en el estudio del VIH-1: se busca un componente que sólo está presente en caso de presencia del virus en la persona, de manera que es un marcador útil en su estudio para reproducción asistida. El antígeno p24 es uno de los antígenos componentes del virus, siendo el que está más reconocido en la determinación rutinaria de presencia/ausencia del virus. Sin embargo, el problema de esta determinación es su falta de sensibilidad comparada con otras técnicas, como el cultivo celular o la PCR (*polymerase chain reaction*). Muchos estudios independientes han confirmado esta circunstancia: se necesita una elevada concentración de virus en la muestra (sea sangre o semen) para que sea detectado, debido a una sensibilidad no excesivamente elevada de la técnica.

Podemos citar tan solo ejemplos como los de Krivine *et al.* (1992), realizando seguimientos de niños nacidos de madres seropositivas; Verhofstede *et al.* (1994), estudiando pacientes asintomáticos, con recuentos de linfocitos CD4+ superiores a 200; Lelie *et al.* (1988), en pacientes sintomáticos o asintomáticos; y van Kerckhoven *et al.* (1994), cuantificando p24 y RNA viral. En todos ellos se encuentran falsos negativos mediante la técnica del antígeno p24, dada su baja concentración que dificulta su detección.

Aunque teóricamente el antígeno debería detectarse en cualquier fase de la infección, la presencia de anticuerpos anti-p24 con los que forma inmunocomplejos suele enmascararlo, por lo que su utilidad ha quedado reducida a unas cuantas situaciones, entre las que destaca la detección de la infección antes de la seroconversión. Con los datos disponibles, parece que su detección no ofrece una ventaja sustancial para minimizar el periodo ventana

de la fase aguda de la infección, antes de la seroconversión y la aparición de anticuerpos, y aunque la proteína p24 es el primer marcador serológico que se positiviza después de la infección, posiblemente lo hace durante un periodo breve, que puede ser mayor en los sujetos cuyas manifestaciones clínicas de primoinfección obedecen a cuadros más graves, reflejados en sus niveles altos de viremia y antigenemia.

Por lo tanto, en el diagnóstico de una posible infección VIH tras una exposición, una determinación con un resultado negativo para el antígeno del VIH-1 no excluye la posibilidad de estar infectado, y puede resultar más fiable la detección de anticuerpos dentro de los seis meses que siguen a la exposición.

Disponibles diferentes pruebas comerciales desde 1987, en la actualidad el empleo de la carga viral como marcador de progresión y control de los tratamientos ha relegado su utilización al diagnóstico precoz de la infección VIH y, en algunos casos, al reconocimiento de la replicación viral en cultivos celulares; prácticamente no se utiliza como monitorización de la respuesta a los antirretrovirales ni para establecer el valor predictivo de la evolución clínica de la infección en los pacientes asintomáticos. Igualmente, su utilidad es dudosa para el reconocimiento de los sujetos seropositivos con alta infectividad, y en el diagnóstico de la infección vertical.

Los métodos de detección del antígeno p24 del VIH-1 son fundamentalmente técnicas ELISA, con anticuerpos específicos fijados en su fase sólida y con sensibilidades diferentes. En algunas pruebas comerciales se realiza una disociación (de carácter ácido o básico), que busca la liberación del antígeno p24 de los inmunocomplejos formados con su anticuerpo, y que ofrece buenos resultados, fundamentalmente con las muestras de pacientes asintomáticos con altos niveles de anti p24.

Entre los factores que se ha visto que pueden condicionar la detección de antígeno p24 se encuentran la sensibilidad de las diferentes pruebas

comerciales, el estadio evolutivo de la infección, así como la presencia de infecciones oportunistas que indirectamente condicionan una mayor replicación viral, y la administración de antirretrovirales. No se sabe por qué, pero en sujetos de raza negra se presenta antigenemia con menor frecuencia que en los de raza blanca. En general, solo es posible detectar antígeno p24 entre el 10-25% de los pacientes seropositivos asintomáticos, y en el 70% de los pacientes con SIDA. En la primoinfección no se detecta en más del 25% de los casos.

En algunos países es obligatorio el cribado de las donaciones de sangre frente al antígeno, en un intento de detectar los donantes en el periodo ventana de la infección; sin embargo no se ha demostrado que esta medida obtenga beneficios de reducción del riesgo de transmisión por sangre contaminada.

Debido a la existencia de mejores métodos de detección, el gran riesgo de obtención de falsos negativos descarta la aplicación de esta técnica en el presente estudio.

3.2.4 Cultivo celular

El cultivo celular es una técnica válida para este estudio, debido a su gran sensibilidad, pero no es posible su aplicación al demorarse la obtención de resultados durante días. La criopreservación de semen, esperando el resultado del cultivo, reduce las posibilidades de éxito en una inseminación artificial, al disminuir la movilidad espermática en el proceso de congelación y descongelación.

El cultivo viral queda restringido a laboratorios especializados, y se considera como la técnica más específica para el diagnóstico de la infección VIH, aunque en la actualidad su utilización puede quedar relegada a estudios de variabilidad genética, sensibilidad a antirretrovirales y epidemiología molecular, además de que puede ser necesario en el diagnóstico de la infección en el recién nacido y en las infecciones silentes. La principal muestra a partir de la que es posible el

aislamiento del VIH-1 la constituye la sangre periférica, específicamente las células mononucleares que se extraen de ella, linfocitos y monocitos, por centrifugación en un gradiente de Ficol. Sin embargo el VIH-1 se ha cultivado a partir de otros muchos tipos de muestras diferentes (orina, semen, lágrimas, leche materna, tejidos, etc.).

Es frecuente la realización de cocultivos que, básicamente, consisten en la aportación de células mononucleares de sujetos no infectados a los cultivos con las células a estudio o con líquidos acelulares, que podrían contener viriones; con ello se pretende, además de ser una aportación de nuevas dianas para la infección y replicación del virus, una interacción entre estímulos antigénicos.

Algunos autores consideran la técnica de PCR superior en sensibilidad al cultivo, incluso en muestras de semen (Mermin *et al.*, 1991; Tindall *et al.*, 1992; Verhofstede *et al.*, 1994). Esto es debido a que la técnica de PCR detecta también partículas virales defectivas no infectivas.

3.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa: PCR (*polymerase chain reaction*)

La detección de material genético del VIH por amplificación con la técnica de PCR puede hacerse a partir de moléculas de DNA o de RNA, que ofrecen información diferente de acuerdo con sus características funcionales. El DNA detectado se trata de DNA proviral presente en las células infectadas (principalmente en linfocitos T) y, dado que las células se infectan de un modo irreversible, es traducción de la incorporación del VIH a los cromosomas de la célula, mientras que el RNA expresaría el grado de replicación viral e, indirectamente, permite valorar la funcionalidad de las células infectadas en cuanto a la producción de viriones o quiescencia del virus. El material genético puede recuperarse a partir de células o tejidos, y también de líquidos acelulares que contienen partículas víricas circulantes.

Las pruebas de amplificación genética permiten la multiplicación exponencial (amplificación) de una zona de DNA, simulando in vitro lo que ocasiona la replicación viral in vivo. La detección de secuencias de RNA del VIH-1 requiere que, previamente a la amplificación, el RNA se convierta en DNA, lo que se consigue por una transcripción inversa, que lleva a cabo una enzima denominada retrotranscriptasa.

Bajo determinadas condiciones, la presencia de una cadena de DNA diana puede permitir la síntesis enzimática de una cadena de DNA complementaria. La cadena diana actúa como molde de una enzima DNA polimerasa cuando la doble hélice se desnaturaliza por calor, y en presencia de secuencias complementarias de oligonucleótidos, que actúan como 'cebadores', de desoxinucleótidos trifosfatos, y de ciertos elementos tampón, (como Mg^{++}) que ayudan a estabilizar el proceso, son capaces de producir múltiples copias de la cadena original. Para ello es necesario producir una serie de ciclos, en número variable, que agrupan tres hechos básicos que se deben desarrollar a diferentes temperaturas: desnaturalización del DNA diana a 92-96 °C, hibridación de los oligonucleótidos a un sitio complementario a 45-72 °C y extensión o copia de los oligonucleótidos a 72 °C por adición de los dNTP. Las diferentes aportaciones de cada uno de los elementos necesarios, las temperaturas y los diferentes ciclos necesarios, así como su duración y oscilación, dan lugar a múltiples variantes de la metodología, que pueden conducir a resultados no comparables y condicionar la sensibilidad y especificidad de la técnica.

Una vez amplificado el material genético, se debe detectar, y existen también diferentes procedimientos de detección, como la electroforesis en gel y visualización con luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio, la visualización por autorradiografía tras hibridación con una sonda marcada radioactivamente, o técnicas de hibridación con sondas marcadas con biotina o quimioluminiscentes que se ponen de manifiesto por metodología similar a los EIA.

Tabla 3.5

PCR + en sujetos seronegativos	PCR - en sujetos seropositivos
Periodo ventana de la infección	Transmisión pasiva de anticuerpos
Infección por virus defectivos	Error técnico
Infección por cepas de virus poco replicativas	Técnicas de baja sensibilidad
Secuencias de otros retrovirus	Mutaciones de zonas críticas
Hipogammaglobulinemia	Reactividad cruzada en pacientes con lupus eritematoso, fibrosis quística o vacuna de la gripe (falsos + de los EIA)
Contaminación de laboratorio	

En la Tabla 3.5 se reflejan las causas más frecuentes de resultados discordantes entre la PCR y marcadores de anticuerpos específicos.

Con la metodología de la PCR es posible también la cuantificación tanto de DNA como de RNA del VIH (carga proviral y carga viral).

La PCR se muestra como la técnica idónea para la realización de este estudio: no sólo cumple con las necesidades de obtención rápida de resultados (en unas 5-6 horas), sino que su especificidad y sensibilidad han quedado demostradas en numerosas ocasiones. Un trabajo del "AIDS Clinical Trials Group Virology Committee" (Hammer *et al.*, 1993), que engloba los esfuerzos de estandarización de más de 50 laboratorios virológicos de Estados Unidos, reconoce una especificidad y sensibilidad de la PCR superior al resto de determinaciones disponibles.

3.3 Seguimiento del paciente seropositivo al VIH-1

3.3.1 Introducción

La evolución del ciclo replicativo del VIH se puede modificar reduciendo la carga viral plasmática a niveles indetectables. Esto se consigue con la aplicación de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART, *highly active antiretroviral therapy*) que combina con suma eficacia la gran variedad de agentes antirretrovirales disponibles. Para el correcto seguimiento de la eficacia de la terapia, ha sido sumamente útil la aparición de métodos de detección ultrasensibles del RNA plasmático del VIH. Esta herramienta permite la optimización del tratamiento clínico de los pacientes seropositivos al VIH.

3.3.2 Carga viral

La carga viral plasmática es el número de copias de RNA del VIH-1. Los métodos de detección de la carga viral suelen dar su resultado en copias/mL, podemos conocer el número de partículas virales dividiendo por dos el número de copias.

En este momento existen en el mercado tres métodos comerciales para detectar la carga viral:

1. Amplicor HIV-1 Monitor de Roche. Se trata de un método cuantitativo basado en la técnica de PCR (Myers y Gelfand, 1991). Actualmente es el único método aprobado por la FDA.
2. Método del DNA ramificado de Chiron (Quantiplex HIV RNA Assay). Se basa en una serie de hibridaciones de tipo sándwich (Horn y Urdea, 1989).

3. Nuclisens o replicación secuencial de ácidos nucleicos de Organon Teknika (NASBA, *nuclueic acid sequence based amplification*). Consiste en la conversión del RNA viral a DNA mediante la síntesis de híbridos RNA-DNA y la amplificación del DNA por PCR (Kievits *et al.*, 1991).

Las últimas versiones ultrasensibles de estos kits son capaces de detectar hasta 50 copias de RNA viral. Estos niveles de detección son tremendamente útiles para evaluar la eficacia de la terapia HAART. Se considera que si después de 6 meses de la aplicación de una terapia HAART no se han alcanzado niveles inferiores a 50 copias por mL, dicha terapia ha fracasado y se debe cambiar o intensificar. Es recomendable que los pacientes seropositivos al VIH-1 se realicen controles de carga viral al menos cada 6 meses.

3.4 El VIH-1 y el semen

Uno de los conocimientos epidemiológicos más precozmente obtenidos al aparecer clínicamente el SIDA, fue la presencia del virus causante, el VIH-1, en el eyaculado (Gottlieb *et al.*, 1981). El semen es, por tanto, vehículo transmisor del SIDA. En otros países, no así en España, es el semen la más importante vía de transmisión del VIH-1.

3.4.1 Vía de llegada del VIH-1 al semen

La vía de entrada del VIH-1 en el aparato genital masculino se ha descrito a través del testículo (Nuovo *et al.*, 1994); epidídimo (Alexander, 1990); y también a través de próstata y/o vesículas seminales, pues sémenes de hombres seropositivos vasectomizados contienen VIH-1 (Anderson *et al.*, 1991; Krieger *et al.*, 1998). Al aplicar la técnica de PCR *in situ*, Nuovo *et al.* (1994) no detectan VIH-1 en tejido epididimario, prostático, de vesículas seminales ni en el pene; sólo en testículo. Hay que pensar que el VIH-1 llega a epidídimo, próstata y vesículas, a través de linfocitos y/o macrófagos, o de difusión de viriones a partir del plasma sanguíneo.

3.4.2 Presencia del VIH-1 en semen

La presencia del VIH-1 en el semen, ya sea en forma de provirus (DNA) o en su forma de partícula libre (RNA), ha sido descrita por varios autores. En la literatura encontramos una gran variabilidad en cuanto al porcentaje de sémenes que presentan el VIH-1. Estas diferencias se deben a la evolución de las diferentes técnicas para evaluar la presencia del VIH-1 y a diferencias en el estado clínico de los pacientes. En la Tabla 3.6 se muestran las proporciones de sémenes que presentan el virus según cada autor.

Tabla 3.6 Presencia del VIH en el semen

Autor	Pacientes	Técnica	VIH en semen
Krieger <i>et al</i> (1991a)	34	Cultivo	32% +
Mermin <i>et al</i> (1991)	23	PCR	74% DNA+ 65% RNA+
Van Voorhis <i>et al</i> (1991)	25	PCR Cultivo	4% + 17% +
Hamed <i>et al</i> (1993)	52	PCR	87 % +
Rasheed <i>et al</i> (1995)	55	PCR	24% +
Liuzzi <i>et al</i> (1996)	23	PCR	96% RNA+
Quayle <i>et al</i> (1997)	8	PCR	75% DNA+
Vernazza <i>et al</i> (1997)	44	PCR	68% RNA+
		Cultivo	37% +
Xu <i>et al</i> (1997)	74	PCR	65% DNA+
Krieger <i>et al</i> (1998)	46	PCR	21% DNA+ 20% RNA+ 10% DNA+ y RNA+
Dulouost <i>et al</i> (1998)	31	PCR	84% RNA+ 38% DNA+
Mayer <i>et al</i> (1999)	22	PCR	59% +
Tachet <i>et al</i> (1999)	52	PCR	85% RNA+ 57% DNA+

El VIH-1 se ha detectado en el semen ya en la fase aguda de la infección de SIDA (Tindall *et al.*, 1992). No se ha correlacionado la presencia de VIH-1 en semen con el estadio clínico de la enfermedad (Krieger *et al.*, 1991; Hamed *et al.*, 1993), si bien hombres en estadios más avanzados del SIDA presentan mayor riesgo de transmitir el VIH-1 a través del semen (Saracco *et al.*, 1993).

Algunos autores no encuentran relación entre el tratamiento con zidovudina y una disminución de la presencia de VIH-1 en el semen (Anderson *et al.*, 1992). Sin embargo, las terapias antirretrovirales combinadas parecen reducir la carga viral en sangre y en semen (Vernazza *et al.*, 1997)

3.4.3 Contagiosidad del VIH-1 a través del semen

La contagiosidad del semen de hombre seropositivo al VIH-1 depende:

1. Del contenido de linfocitos CD4+ y macrófagos infectados con el VIH-1. Éstas son las principales células dianas del VIH-1 y, si están infectadas, tienen el VIH-1 integrado en el genoma celular como provirus (Levy, 1994).
2. Del número de partículas virales o viriones (virus extracelular con material genético en fase de RNA), presentes en el plasma seminal (Levy, 1994). Según Levy (1994), la transmisión a través del semen es más probable que ocurra a través de las células infectadas (VIH-1 en forma de DNA integrado o provirus) que a través de virus libres o viriones (en forma de RNA) presentes en el plasma seminal. Recordemos que una célula infectada con el VIH-1 integrado, podría producir varios miles de viriones por día (Levy, 1993).
3. Dada la posible presencia del VIH-1 intraespermático, hemos de considerar este hecho también como posible vehículo de transmisión del VIH-1.
4. Número de veces que se recibe el semen infectado. La reiteración del contacto con muestra infectada aumenta el riesgo de contagiarse con el SIDA (Johnson, 1988).

Otros factores dependen de la persona receptora: úlceras, estado inmunitario, etc.

3.4.4 El VIH-1 y el espermatozoide

Con el microscopio electrónico de transmisión (MET) se ha observado el VIH-1 adherido y dentro de los espermatozoides, localizado entre membrana plasmática y acrosómica externa, y en la pieza intermedia (Baccetti *et al.*, 1992). Los mismos autores dicen que los espermatozoides alterados, con acrosoma reaccionado o con abundantes restos de citoplasma, son los más frecuentemente penetrados. No observaron virus dentro del núcleo espermático. Tampoco se observó el VIH-1 dentro del núcleo espermático en un trabajo citado por Scofield *et al.*, (1994). Con técnicas de PCR in situ Bagasra *et al.*, (1994) han demostrado la presencia de VIH-1 localizado principalmente en la pieza intermedia, y menos en la cabeza. Scofield *et al.* (1994) detectan el VIH-1 en espermatozoides inmóviles obtenidos con la técnica de Percoll. Bagasra *et al.* (1994) lo detectan también en espermatozoides móviles obtenidos con la técnica de swim-up. Otros autores descartan los espermatozoides móviles como vectores del VIH-1 (Quayle *et al.*, 1997).

En la Tabla 3.7 se resumen los diferentes trabajos publicados sobre la presencia o no del VIH-1 en el espermatozoide según la técnica empleada para determinarlo.

La vía de llegada del VIH-1 al espermatozoide puede ser a través de células de espermatogénesis, en el testículo. En este caso una espermatogonia infectada daría lugar a dos espermatocitos I infectados y así sucesivamente hasta llegar a los espermatozoides. Nuovo *et al.*, (1994), describen la presencia del VIH-1 en espermatogonias y espermatocitos (20%); rara vez en espermátides (1%). La técnica empleada fue la PCR in situ. Es importante señalar que el estudio se hizo en hombres fallecidos de SIDA. Sólo dió negativo en un caso de aplasia germinal. Es decir que las células de Sertoli no estaban infectadas de VIH-1.

Tabla 3.7 ¿El VIH-1 infecta al espermatozoide?

Autor	Técnica	Resultado
Bagasra y Freund (1990)	MET	SI
Scofield <i>et al.</i> (1992)	MET	SI
Dussaix <i>et al.</i> (1993)	MET	SI
Baccetti <i>et al.</i> (1998)	MET	SI
Anderson <i>et al.</i> (1990)	MET	NO
Pudney <i>et al.</i> (1998)	MET	NO
Bagasra y Freund (1990)	HIS	SI
Baccetti <i>et al.</i> (1994)	HIS	SI
Pudney (1990)	HIS	NO
Baccetti <i>et al.</i> (1994)	CULTIVO	SI
Kuji <i>et al.</i> (1998)	CULTIVO	NO
Bagasra <i>et al.</i> (1994)	PCR in situ	DNA+
Quayle <i>et al.</i> (1998)	PCR in situ	NO
Pudney <i>et al.</i> (1998)	PCR in situ	NO
Nuovo <i>et al.</i> (1994)	PCR in situ EN TESTE	DNA+
Muciaccia <i>et al.</i> (1998)	PCR in situ EN TESTE	DNA+
Shevchuck <i>et al.</i> (1998)	PCR in situ EN TESTE	DNA+
Scofield <i>et al.</i> (1992)	PCR	DNA+
Baccetti <i>et al.</i> (1994)	PCR	RNA+
Marina <i>et al.</i> (1998)	PCR	+ / -
Duliooust <i>et al.</i> (1998)	PCR	+ / -
Quayle <i>et al.</i> (1997)	PCR	-
Quayle <i>et al.</i> (1998)	PCR	-
Pudney <i>et al.</i> (1998)	PCR	-

Otra posibilidad es, como en otras células, a través de la unión a un receptor de la membrana espermática seguido de un proceso de endocitosis. Algunos autores han detectado la presencia del receptor CD4 en la membrana plasmática de los espermatozoides. Otra posibilidad es que la molécula galactosamil ceramida actúe en los espermatozoides como receptor para el VIH-1 (Bagasra *et al.*, 1988; Harouse *et al.*, 1991; Baccetti *et al.*, 1994; Baccetti *et al.*, 1998; Brogi *et al.*, 1998). En la Tabla 3.8 se resumen los diferentes estudios realizados sobre la controvertida presencia del receptor CD4 en los espermatozoides y sobre la posibilidad de que la galactosamil ceramida actúe como receptor.

Tabla 3.8 ¿Tiene el espermatozoide receptores para el VIH-1?

Autor	Receptor	Resultado
Gobert <i>et al.</i> , (1990)	CD4	SI
Scofield <i>et al.</i> , (1992)	CD4	SI
Bagasra <i>et al.</i> , (1990)	CD4	NO
Anderson <i>et al.</i> , (1992)	CD4	NO
Baccetti <i>et al.</i> , (1993)	CD4	NO
Dussaix <i>et al.</i> , (1993)	CD4	NO
Nuovo <i>et al.</i> , (1994)	CD4	NO
Gil <i>et al.</i> (1995)	CD4	NO
Brogi <i>et al.</i> , (1998)	GALACTOSAMIL CERAMIDA	SI
Baccetti <i>et al.</i> , (1998)	GALACTOSAMIL CERAMIDA	SI

3.5 El VIH-1 y el ovocito

El primer autor en investigar la posible interacción entre el VIH-1 y el ovocito humano maduro fue Baccetti *et al.* (1998, 1999). Estos autores demuestran que ovocitos maduros no fecundados expuestos *in vitro* a stocks de VIH-1, obtenidos de sobrenadantes de líneas celulares infectadas crónicamente, son incapaces de realizar síntesis *de novo* de VIH-1 proviral. En la Tabla 3.9 se muestran los estudios realizados en ovocitos humanos sobre la posible interacción con el VIH-1.

Tabla 3.9 VIH-1 y ovocitos humanos

Técnica	Detección	Resultado
MET	Partículas virales	Negativo
MET+inmunocitoquímica	p24	Negativo
PCR	gen <i>nef</i>	Negativo
Inmunofluorescencia	CD4	Negativo
Inmunofluorescencia	CCR5	Negativo
Inmunofluorescencia	GALACTOSAMIL CERAMIDA	Negativo
PCR	mRNA de CD4	Negativo
PCR	mRNA de CCR5	Negativo
PCR	mRNA de CXCR4	Negativo

Aunque el ovocito parece no tener receptores para el VIH-1, los espermatozoides móviles de pacientes con SIDA pueden vehiculizar partículas virales del VIH-1 a su interior. Embriones en el estado de 8 células fecundados con estos espermatozoides parecen mostrar con técnicas de microscopía electrónica la presencia de las mismas partículas observadas en los espermatozoides "infectados" y nunca vistas en ovocitos fecundados "sanos" utilizados como control (Baccetti *et al.*, 1994).

Kiessling (1998) encuentra que embriones humanos infectados con VIH-1 durante las fases de fecundación pueden expresar proteínas virales durante las primeras divisiones embrionarias.

3.6 Capacitación espermática y técnicas de lavado seminal

Para la utilización de espermatozoides en técnicas de reproducción asistida hay que aislar los que posean movilidad y capacitarlos. El primer punto es el requisito básico más sencillo para garantizar que los espermatozoides están "vivos" (con integridad de membrana y actividad celular). En cuanto al segundo punto, la capacitación, es un proceso previo que los espermatozoides deben sufrir para, de forma natural, adquirir la capacidad fecundante. En este apartado se explican brevemente los mecanismos fisiológico de la capacitación espermática y los métodos que se usan en el laboratorio de reproducción asistida para aislar los espermatozoides móviles y capacitarlos.

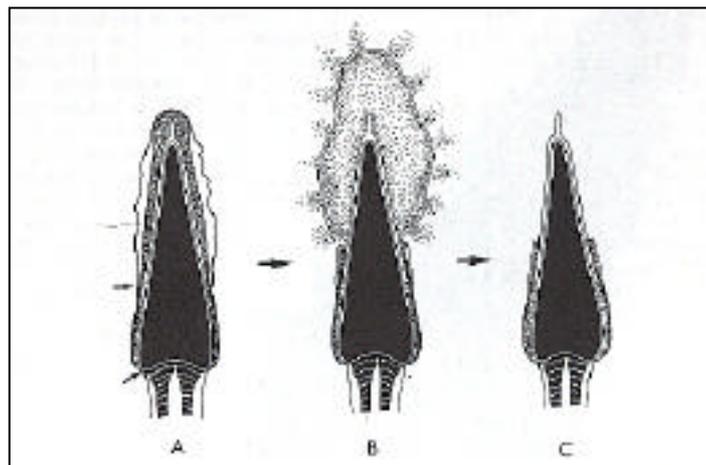
3.6.1 Capacitación espermática

La capacitación espermática es un fenómeno que en terminos de evolución aparece con la reproducción interna. Los peces que se reproducen de forma externa depositando el esperma directamente sobre los óvulos carecen de este mecanismo de capacitación; los espermatozoides pueden fecundar inmediatamente después de ser expulsados. En cambio los espermatozoides de mamíferos superiores necesitan retardar la capacidad fecundante hasta el momento del encuentro con el ovocito. El proceso de capacitación espermática fue descrito por primera vez en el año 1951 (Austin, 1951; Chang, 1951; Austin, 1952). Los espermatozoides maduros son almacenados en el epidídimo en un estado estable que les proporciona la capacidad de permanecer viables durante un período relativamente largo de tiempo. Se llama capacitación espermática al conjunto de procesos que sufre el espermatozoide maduro antes de adquirir la capacidad de poder fecundar un ovocito. Estos procesos tienen lugar de forma fisiológica principalmente en el tracto reproductor femenino. La capacitación *in vitro* se consigue eliminando el plasma seminal e incubando en medios de cultivos específicos.

La capacitación espermática en sí consiste en una serie de cambios en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide que permiten que suceda la reacción acrosómica y cambios en la membrana plasmática de la cola que permiten que el espermatozoide adquiera la movilidad hiperactiva necesaria, junto con la reacción acrosómica, para la penetración de la zona pelúcida del ovocito.

A nivel molecular se producen cambios en proteínas glicosiladas y lípidos de la membrana plasmática, y pérdida de moléculas de colesterol que contribuyen a la capacitación espermática (Benoff *et al.*, 1993). Al disminuir el cociente colesterol/fosfolípidos, la membrana se hace más fluida. Para la eliminación de las moléculas de colesterol es necesario la presencia de albúmina, que actúa como aceptor de las moléculas de colesterol (Benoff *et al.*, 1993); es por esto que es importante que los medios de cultivo *in vitro* contengan albúmina. Concomitante a la adquisición del movimiento hiperactivo de la cola ocurren cambios en la permeabilidad del Ca^{2+} en la membrana que inducirán la reacción acrosómica.

Figura 3.6



El principal inductor fisiológico *in vivo* de la reacción acrosómica es una proteína de la zona pelúcida, la ZP3. La hormona esteroidea progesterona tiene también un importante papel en inducir el influjo de Ca^{2+} hacia el interior de la membrana plasmática; esto desencadena un sistema de transmisión de señales intracelulares que inducen que las membranas acrosomal y plasmática se fusionen, dando lugar a la exocitosis de las enzimas acrosomales (Figura 3.6).

La reacción acrosómica permite al espermatozoide penetrar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana del ovocito (Yanagimachi, 1994).

3.6.2 Técnicas de lavado de semen

En el semen se distinguen dos componentes: a) el plasma seminal y b) la fracción celular. En la fracción celular se encuentran: espermatozoides (móviles e inmóviles, normales o anormales), células de espermatogénesis, células epiteliales de descamación y leucocitos (linfocitos y macrófagos). Desde los comienzos de la fecundación *in vitro* (FIV), las primeras revisiones hacían hincapié en que uno de los factores más importantes en el proceso de la FIV era la presencia de *detritus* y otras células no espermatozoides en las preparaciones de semen (Edwards *et al.*, 1984).

Las técnicas de preparación seminal son esenciales para eliminar el plasma seminal y obtener espermatozoides móviles y normales. El plasma seminal contiene factores que inhiben la capacitación y la fecundación (Chang, 1957; Bedford y Chang, 1962; Reddy *et al.*, 1979; van der Ven *et al.*, 1982).

El medio de cultivo que normalmente se usa en los laboratorios de reproducción asistida para lavar el semen es el mismo que se utiliza para el cultivo de ovocitos y embriones, aunque en los últimos años el avance en el estudio de los cultivos embriológicos ha hecho desarrollar medios de cultivo secuenciales diferentes a los empleados para el semen. Los medios de cultivo son mantenidos en el incubador a 37°C y equilibrados con tampón bicarbonato

en atmósfera de CO₂ al 5% en aire. En sistemas abiertos donde no se dispone de incubador con control de CO₂ se emplean medios tamponados con HEPES (tampón fosfato) para mantener el pH.

Los medios de cultivo empleados en la preparación seminal deben estar controlados para la osmolaridad y el pH, y deben contener albúmina. Estos medios en su composición deben excluir sustancias que, como el hierro, promueven la formación de especies oxígeno reactivas (EOR).

En la actualidad las casas comerciales suministradoras de medios de cultivo disponen de una amplia gama de estos medios: HTF (Irvine Scientific, EE.UU.), Menezo B2 (Fertility Technologies, EE.UU.), HAM F10 (Life Technologies, EE.UU.), *Sperm Preparation Medium* (Medi-cult, Dinamarca), Gamete 100 (IVF Science, Suecia), etc.

Se han descrito muchas técnicas de preparación seminal que varían principalmente entre sí en el tipo y cantidad de medio de cultivo empleado; en el número, fuerza y duración de las centrifugaciones; y en la metodología empleada para recuperar la mayor cantidad de espermatozoides móviles normales. A continuación se describen las tres técnicas más empleadas en la actualidad.

1. Lavado seminal. Este es el método más sencillo de preparación seminal, y consiste en la eliminación del plasma seminal mediante centrifugación. Este método es sólo empleable en muestras con un alto porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y libre de células y *detritus*. Esta técnica no se aplica de manera rutinaria, porque los restos de células y *detritus* presentes en el sedimento junto con los espermatozoides favorecen la presencia de EOR. Las membranas de los espermatozoides humanos contienen grandes cantidades de ácidos grasos insaturados y son, por tanto, muy susceptibles a la peroxidación lipídica inducida por EOR. Estos cambios hacen que la membrana espermática pierda fluidez

y sea incapaz de producir los fenómenos fusogénicos que participan en el proceso de fecundación. Es un método no empleado en FIV clásica, pero sí cuando se aplica la técnica de ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) donde se obvia el proceso de fusión, y las muestras suelen ser de muy mala calidad.

2. Swim-up. Es una técnica que, como su propio nombre indica (nadar hacia arriba), consiste en la selección positiva de los espermatozoides que nadan en un medio de cultivo. Fue descrita por primera vez por Lopata y colaboradores (Lopata *et al.*, 1976) y posteriormente se han descrito diferentes variaciones de la técnica (Cohen *et al.*, 1985; Mahadevan *et al.*, 1985; Lucena *et al.*, 1989). La aplicación de esta técnica está especialmente indicada en las muestras normozoospermicas, permite la recolección de fracciones espermáticas con una movilidad progresiva alta (>90%) y esto tiene un efecto positivo en la proporción de espermatozoides morfológicamente normales.

3. Centrifugación en gradientes de densidad. El Percoll (Pharmacia, Reino Unido), es un medio ampliamente utilizado para centrifugación de células, virus y partículas subcelulares en gradientes de densidad. Se compone de partículas de sílice coloidal de 15-30 nm de diámetro recubiertas de polivinilpirrolidona (PVP), lo cual hace que sea un material completamente no tóxico e ideal para el uso con materiales biológicos. El Percoll puede formar gradientes en un rango de densidades de 1.0-1.3 g/ml. La técnica de centrifugación con gradientes de Percoll para separar espermatozoides humanos fue publicada por primera vez por Gorus y Pipeleers en 1981. En la actualidad ha sido desaconsejado el uso clínico del Percoll y se utilizan otros preparados, de similares características aunque más costosos, recomendados para el uso humano como el PureSperm® (IVF Science, Suecia). La aplicación de esta

técnica como método de lavado y selección de espermatozoides se ha ido imponiendo en la mayoría de los grupos que trabajan en reproducción asistida (Bolton *et al.*, 1986; Guérin *et al.*, 1989; Jaroudi *et al.*, 1993; Sapienza *et al.*, 1993; Moohan y Lindsay, 1995). El principio básico de la técnica consiste en formar diferentes capas de densidades variables. En el fondo de un tubo de centrifuga se deposita la capa de mayor densidad y, sobre ésta, se colocan otras capas en densidad decreciente. El número de capas, la densidad y el volumen de las mismas variará dependiendo de los componentes de la muestra a separar. Cuando se efectúa la centrifugación, cada componente celular comienza a descender por el gradiente hasta que llega a una 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 y suele expresarse como coeficiente de sedimentación o valor *s* (*svedberg*). El coeficiente de sedimentación mide la velocidad de sedimentación por unidad de fuerza y se expresa en segundos ($1 s = 10^{-13}$ segundos). Los componentes celulares de menor tamaño tienen un coeficiente de sedimentación *s* menor que los de mayor tamaño. Cuanto menor sea la *s* de un componente, mayor fuerza de centrifugación y mayor tiempo se necesitará para que dicho componente alcance la capa de su densidad. Los espermatozoides humanos tienen una densidad que corresponde a una capa de PureSperm® de una concentración entre el 85 y el 100%. Aplicando una fuerza de centrifugación de 400 g durante 20 minutos, los espermatozoides móviles se colocan, gracias a su movimiento, paralelamente a la pared del tubo y facilitan su desplazamiento; de este modo se obtiene una fracción libre de células y enriquecida en espermatozoides móviles en el fondo del tubo de centrifugación.

Además de los métodos descritos, también se han utilizado otros como la filtración en columnas de lana de vidrio (Paulson y Polakoski, 1977; van der

Ven *et al.*, 1988) o los gradientes de Ficoll (polímero de sacarosa) (Cummins y Breen, 1985; Bongso *et al.*, 1989).

3.7 Técnicas de reproducción asistida

3.7.1 Antecedentes

En la Tabla 3.10 se resumen los hitos históricos más importantes en el conocimiento de los aspectos anatomofisiológicos de las gónadas y gametos.

Tabla 3.10 Hitos históricos

a) Anatomofisiología de los gametos

Año	Autor	Describe/Descubre/Hace
98-138	Sorano de Efeso	Anatomía de los ovarios
1538	Vesalio	Foliculo ovarico
1668	Malpighi	Cuerpo luteo
1672	De Graaf	Foliculogénesis
1677	Leeuwenhoek	Espermatozoide
1827	von Baer	Óvulo
1841	Kölliker	Espermatogénesis
1853	Newport	Fecundación
1881	Weismann	Diferencia entre célula germinal y somática
1923	Allen y Doisy	Hormona ovárica (Estrógeno)
1923	Corner y Allen	Progesterona
1927	Smith	Accion de gonadotrofinas sobre testículo
1931	Young	Función del epidídimo
1935	Moore	Hormona testicular (Testosterona)
1951	Austin	Capacitacion espermatica
1956	Hertig	Embrión preimplantatorio

En la Tabla 3.11 se muestran los hechos históricos más relevantes en las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Podemos asegurar que se han producido dos grandes puntos de inflexión en el conocimiento de la reproducción humana: 1) el nacimiento en 1978 de Louise Brown, la primera persona nacida de un embrión generado en un laboratorio por fecundación *in vitro* (Stephoe y Edwards, 1978); y

2) la irrupción de la ICSI a manos de Palermo *et al.* en 1992, que revolucionó desde entonces las TRA por indicación masculina.

Tabla. 3.11 Hitos históricos en las Técnicas de Reproducción Asistida

Año	Autor	Describe/Descubre/Hace
1790	Hunter	Inseminación Artificial Conyugal (IAC)
1884	Pancoast	Insemina. Art. con Donante y semen fresco (IAD)
1953	Bunge y Sherman	Congelacion de semen
1961	Greenblatt	Protocolos de estimulación folicular
1978	Stephoe y Edwards	Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)
1983	Trounson y Mohr	Congelacion de embrión
1985	Wikland	Punción folicular por ecografía vaginal
1989	Handyside	Diagnóstico genético preimplantatorio (DGP)
1990	Cohen	Eclosión asistida
1992	Palermo	Inyección espermática intracitoplasmática (ICSI)
1993	Schoysman	ICSI con espermatozoides de testículo
1995	Tesarik	ICSI con espermátides

3.7.2 Inseminación intrauterina

La primera inseminación artificial documentada se realizó a finales del siglo XVII en Londres y se atribuye a Jhon Hunter. Se trataba de un paciente con hipospadias, el semen fue recogido en una jeringa y depositado en la vagina de la esposa, se consiguió gestación. En 1938, Girault en Francia realizó inseminaciones conyugales en 10 mujeres, logrando 8 gestaciones (Cifriani, 1960). Un siglo después, hacia 1884, se realiza la primera inseminación artificial con semen de donante, se consiguió gestación en un paciente con azoospermia post-gonocócica. En 1953 se publicó la utilización de semen criopreservado por primera vez (Bunge y Sherman, 1953).

3.7.2.1 Definición

La inseminación artificial intrauterina (IA-IU) consiste en introducir por medio de una cánula apropiada una cantidad de espermatozoides en el interior del útero. Estos espermatozoides han estado previamente seleccionados y capacitados. Se realiza de forma sincronizada a la ovulación de la mujer.

3.7.2.2 Clasificación

Dentro de las IA-IU podemos distinguir dos tipos según la procedencia del semen:

1. Inseminación artificial con semen de la pareja o conyugal (IAC). Requiere que el hombre aporte un recuento de espermatozoides mínimos recuperados. La legislación francesa indica que no se puede hacer con menos de 500.000. Es aconsejable disponer como mínimo de 1.500.000 para tener expectativas reales de gestación.
2. Inseminación artificial con semen de donante (IAD). Se aplica en los casos en que el número de espermatozoides recuperados es inferior al aconsejable para la IAC y no se quiere optar por una FIV; en los casos de imposibilidad de obtener espermatozoides del hombre; y en los casos de mujer sin pareja masculina. Esta técnica también se aplica cuando el hombre es portador de anomalías que no se pueden descartar mediante estudio preimplantatorio del embrión o no se quiere recurrir al mismo.

3.7.2.3 Indicaciones

Podemos distinguir cuatro factores de esterilidad en los que estaría indicado practicar una inseminación artificial:

1. Factor cervical. Sería el más indicado, ya que al introducir la muestra de espermatozoides móviles en el interior del útero, se salta la barrera que puede suponer el cervix.
2. Factor masculino. Cuando el recuento espermático está disminuido pero es suficiente para aplicar la técnica (oligoastenozoospermia). Las disfunciones eréctiles que dificulten o imposibiliten el coito son tributarias también de esta técnica.
3. Esterilidad de origen desconocido. Se aplica la inseminación artificial a estos pacientes antes de recurrir a la FIV.
4. Factor ovárico. La inducción de la ovulación obtiene mejores resultados si se completa con una IA en lugar de con relaciones sexuales programadas.

Una edad superior a 40 años puede desaconsejar la técnica a favor de la FIV o incluso de la donación de ovocitos.

3.7.3 Fecundación *in vitro* con técnica de microinyección (FIV-ICSI)

3.7.3.1 Introducción

La FIV es una técnica que amplía las indicaciones de las IA. Entre las indicaciones de la FIV podemos destacar las siguientes:

1. Tubarica. Cuando las trompas están obstruidas o no están presentes.
2. Masculina. Cuando la baja calidad seminal no permite realizar IA.
3. Factor ovulatorio. Cuando no ha sido posible realizar una IA por respuesta folicular baja o excesiva.

4. Fallo de IA. Cuando no se ha conseguido gestación después de 3-4 intentos de IA

La FIV se diferencia de la IA principalmente en que la fecundación ocurre en el laboratorio y no en las trompas. Requiere, a diferencia de la IA, que se extraigan los ovocitos de los ovarios mediante punción folicular ecoguiada bajo sedación. Los embriones obtenidos *in vitro* se transfieren posteriormente al útero.

3.7.3.2 Inducción de la ovulación

La FIV requiere una estimulación de la ovulación más agresiva que la IA. Por término medio se obtienen 10-12 ovocitos maduros por punción folicular. Esta cifra está sometida a grandes variaciones dependiendo de la edad de la paciente, de la dosis inicial de gonadotropinas, de los niveles de estradiol en sangre, etc.

La inducción de la ovulación con gonadotropinas es el protocolo más extendido en los tratamientos de FIV en los centros de reproducción asistida. Hasta hace muy pocos años los únicos preparados en el mercado disponibles para el tratamiento con gonadotropinas eran los obtenidos de orina de mujeres posmenopáusicas. Posteriormente se desarrolló un preparado de FSH urinaria más purificado eliminando la mayor parte de la LH en el producto. Actualmente se han desarrollado las gonadotropinas recombinantes producidas en células ováricas de hámster chino transfectadas con los genes de las subunidades de la FSH humana (Germond *et al.*, 1992).

En la actualidad existen múltiples protocolos de estimulación de la ovulación con gonadotropinas, pero los que más éxito tienen son los que combinan las gonadotropinas con agonistas de la GnRH para controlar el pico ovulatorio y son monitorizados mediante controles ecográficos y de niveles plasmáticos de estradiol.

3.7.3.3 Microinyección espermática intracitoplasmática (ICSI en inglés)

Recordemos brevemente la historia de la técnica de ICSI. Antes de que Palermo *et al.* (1992) consiguieran la primera gestación de ICSI, muchos pequeños pasos se dieron para que esto fuera posible. Las técnicas de micromanipulación fueron posibles gracias a los sofisticados aparatos microscópicos que comenzaron a poseer la capacidad de, mediante unos finos capilares de vidrio afilados, poder manipular material biológico microscópico, es decir, poder manipular células. Los micromanipuladores como los conocemos en la actualidad nos permiten realizar movimientos micrométricos en las tres dimensiones del espacio con tan sólo hacer girar unas ruedecitas, sin necesidad de tener un buen pulso. La primera vez que se usaron estos aparatos con gametos fue en 1976 cuando Uehara y Yanagimachi inyectaron espermatozoides dentro de oocitos, en hámsters, y consiguieron la descondensación del núcleo del espermatozoide y la formación de dos pronúcleos, el del oocito y el del espermatozoide. Posteriormente se realizaron varios trabajos de inyección intracitoplasmática en oocitos de hámster o ratón (Uehara y Yanagimachi, 1977; Thadani 1980). Con el propósito de investigar el potencial fecundante, Lanzendorf *et al.* (1987) inyectaron espermatozoides humanos dentro de oocitos de hámster. Cuando en los años previos a 1992 nos trasladamos al mundo de la reproducción humana, nos encontramos con la idea generalizada que el hecho de elegir un espermatozoide determinado e inyectarlo dentro del oocito transgredía demasiadas barreras evolutivas naturales y podríamos estar incidiendo en el aumento de anomalías cromosómicas y/o genéticas. Introducir de forma agresiva un espermatozoide dentro de un oocito sin tener la certeza que es un espermatozoide genéticamente normal y con capacidad de generar un embrión evolutivo hacía pensar que otras técnicas menos agresivas y que permitieran una mayor selección natural se impondrían en reproducción humana, aunque ya había algún grupo que aplicaba la ICSI en humanos (Lanzendorf *et al.*, 1988).

Para conseguir fecundación en casos de oligozoospermias severas comenzaron a aplicarse técnicas como la SUZI (*Subzonal Injection*), consistente en la inyección de unos pocos espermatozoides en el espacio perivitelino; o la PZD (*Partial Zona Dissection*: disección parcial de zona), que consistía en realizar una perforación en la zona pelúcida para facilitar la entrada de espermatozoides. Estas técnicas habían sido ya aplicadas con éxito en ratones (Barg *et al.*, 1986; Gordon *et al.*, 1986; Mann, 1988). En 1988 Ng *et al.* publican la primera gestación en humanos con SUZI, en los años siguientes esta técnica se fue imponiendo en humanos. El gran resurgimiento de la ICSI se produjo cuando Palermo *et al.* (1993) y van Steirteghem *et al.* (1993) publican que los resultados de ICSI son claramente superiores a los de SUZI y que los estudios citogenéticos de vellosidades coriónicas y de amniocentesis no presentan ninguna anomalía.

Payne *et al.* (1993) y posteriormente Gerris *et al.* (1995) y Fishel *et al.* (1995a) consiguieron casi doblar la tasa de fecundación de la ICSI con el simple hecho de romper la cola del espermatozoide antes de proceder a la microinyección. La rotura de la cola parece inducir los mecanismos de activación espermática. Postularon además que el movimiento de la cola en el ovoplasma podría dañar al ovocito.

3.7.3.4 Indicaciones de la FIV-ICSI

Con la llegada de la ICSI, se ha abierto un nuevo abanico de indicaciones que la FIV clásica no podía solucionar con éxito. Las podemos resumir en 9.

1. Indicaciones masculinas de FIV. En estas indicaciones se mejoran los resultados con ICSI, incluso en casos en que el recuento de espermatozoides móviles recuperados era tan bajo ($<100 \times 10^3$) que no se indicaba FIV.
2. Casos de FIV previos con nula o baja tasa de fecundación. En este grupo se incluyen los pacientes con sémenes normales para hacer FIV, pero que

presentan anomalías ovocitarias que impiden que el espermatozoide pueda llegar al ooplasma. También se incluyen los pacientes con espermatozoides con morfología, recuento y movilidad aparentemente normales, pero, con defectos en los receptores que reconocen la zona pelúcida del ovocito. Cualquier alteración en las barreras de reconocimiento entre ovocito y espermatozoide puede truncar un proceso de fecundación con un semen aparentemente normal. Además del reconocimiento físico entre ambos gametos, defectos en el proceso enzimático de penetración del espermatozoide puede llevar también a un fallo de fecundación. La ICSI solucionaría todos estos problemas.

3. Azoospermias obstructivas. La obtención de espermatozoides puede hacerse a nivel de deferentes en los siguientes casos: en las obstrucciones de eyaculadores; en el hombre vasectomizado que prefiere ICSI a vasovasostomía; en la ausencia de emisión seminal por alteración neurológica; y en la obstrucción iatrógena tras herniorrafia bilateral. En caso de que el nivel de obstrucción sea más próximo al testículo, habrá que extraer los espermatozoides del epidídimo. Así en el síndrome de Young; en las secuelas de epididimitis; y en la agenesia bilateral de deferentes. En el Instituto de Reproducción CEFER se realiza la extracción de espermatozoides de epidídimo con anestesia local. Algunos autores practican la aspiración del fluido epididimario por vía percutánea, esta técnica se denomina PESA (*Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration*) (Tsirigotis *et al.*, 1994). La consideramos difícil y menos eficaz que la técnica a cielo abierto que permitiría obtener suficientes espermatozoides para, congelándolos, poder realizar varios ciclos de ICSI sin precisar extraer espermatozoides epididimarios cada vez.
4. Azoospermias secretoras. Desde que Schoysman *et al.* (1993) publicaran la primera gestación con espermatozoides obtenidos de testículo, se abrió una puerta real a la posibilidad de obtener fecundación y embarazos con espermatozoides que no pasan por el conducto epididimario y , por lo

tanto, no siguen el proceso madurativo que hasta ahora se consideraba indispensable para la fecundación. La obtención de espermatozoides de testículo está indicada en los casos en los que no se obtengan espermatozoides de buena calidad del epidídimo en las azoospermias obstructivas. También se han conseguido espermatozoides en hombres etiquetados de azoospermia secretora con FSH elevada y diagnóstico anatomopatológico de síndrome de solo células de Sertoli (Silber *et al.*, 1995). La reciente introducción de la inhibina B, como marcador de espermatogénesis, arroja luz al correcto diagnóstico de estos pacientes (Ballescá *et al.*, 2000). El hecho de obtener varios fragmentos de distintas zonas del testículo puede permitir encontrar algún foco activo de espermatogénesis en estos pacientes.

5. ICSI con espermátides. El espermatozoide es la resultante de la transformación de la espermátide en un proceso conocido como espermiogénesis. No hay división celular en este proceso y ya la espermátide contiene los mismos 23 cromosomas que el espermatozoide. La pieza intermedia y la cola son precisas para que la célula gamética se traslade hasta el oocito; y el acrosoma para que atraviese la zona pelúcida. Pero en la ICSI no se precisan estas estructuras dado que se introduce el espermatozoide o espermátide en el ooplasma. Los primeros pasos se dieron en ratón y hamster donde se obtuvo fecundación y desarrollo embrionario primario (Ogura y Yanagimachi, 1993; Ogura *et al.*, 1993). Posteriormente se consiguieron gestaciones en ratón (Ogura *et al.*, 1994; Kimura y Yanagimachi, 1995); y en conejo (Sofikitis *et al.*, 1994). Vanderzwalmen *et al.* (1995) obtienen fecundación, aparentemente normal, en humano, inyectando espermátides alargadas. Los primeros nacimientos en humanos los publican Tesarik *et al.* (1995, 1996) con espermátides redondas obtenidas de eyaculado y Fishel *et al.* (1995) publica la primera gestación con espermátides alargadas en humano. El bloqueo completo a nivel de espermátide es muy poco frecuente. Si el

bloqueo no es completo habrá espermatozoides aunque sean pocos y ésta sí es situación clínicamente frecuente.

6. Pacientes con eyaculación retrógrada completa. En estos pacientes han sido aplicadas diversas técnicas de inseminación cuando se recuperaban espermatozoides móviles de la orina post masturbación. La ICSI ha sido aplicada con éxito en casos de eyaculación retrógrada en los que no se han encontrado espermatozoides móviles (Gerris *et al.*, 1994).

7. ICSI en oocitos inseminados y no fecundados. La ICSI a las 24 h. de la recogida de oocitos y tras fallar la fertilización con inseminación permite obtener embriones si bien en tasa inferior a la ICSI por primera intención (Sjögren *et al.*, 1995).

8. Espongilzoospermias, globozoospermia o espermatozoides con cabezas redondas. Les falta el acrosoma, por lo que no pueden fecundar en una FIV convencional. Se ha descrito gestación con ICSI en estos pacientes (Liu *et al.*, 1995; Trokoudes *et al.*, 1995).

9. Autoanticuerpos antiespermáticos. En un estudio retrospectivo llevado a cabo en 37 pacientes y 55 ciclos, cuya infertilidad era debida a la presencia de un alto índice de anticuerpos antiespermáticos (más del 80% de los espermatozoides unidos en el MAR test), Nagy *et al.* (1995) obtuvieron tasas de fecundación mayores con ICSI que en otros ciclos realizados con ICSI en el mismo periodo y sin causa inmunológica (<80% unidos en el MAR test), 75,7% y 69,2% respectivamente. La tasa de fecundación, el desarrollo embrionario y las tasas de gestación con ICSI no están influenciadas significativamente por la proporción de autoanticuerpos antiespermáticos. Debido a los pobres resultados obtenidos con FIV clásica en estos pacientes, la ICSI estaría, por tanto, indicada en los pacientes con un alto número de anticuerpos antiespermáticos.

3.7.3.5 Transferencia embrionaria

La transferencia embrionaria es uno de los procesos clave en los tratamientos de FIV. La utilidad del control ecográfico durante la transferencia es un hecho que comienza a extenderse en los centros de reproducción asistida (Baba *et al.*, 2000; Coroleu *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2000). El empleo de un tipo cánula blanda parece tener mejores resultados que el uso del tipo de cánulas rígidas (Amorocho *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2000).

La asepsia es un factor muy importante durante todo el proceso de la transferencia. La metodología de la transferencia embrionaria debe además evitar el sangrado producido por traumas ocasionados en el canal cervical o el endometrio por una manipulación agresiva. Se ha mostrado útil, como método para prevenir problemas, la transferencia de prueba en una de las exploraciones ginecológicas previas.

3.8 Aspectos bioéticos y legales

3.8.1 Aspectos bioéticos

El problema del SIDA y la Reproducción es un tema sensible para la sociedad y por ende, para la Autoridad Sanitaria. La actuación médica tendente a que una pareja serodiscordante tenga un hijo puede comportar aspectos éticos y aspectos legales. Los posibles reparos éticos que se pueden aducir se pueden resumir en tres:

1. Riesgo de que la mujer inseminada se contagie del virus del SIDA.

En este trabajo se pone de manifiesto que con la actuación médica, el riesgo de contagio de la mujer es mínimo, y en todo caso inferior al riesgo de contagio con un coito sin preservativo.

2. Se crean falsas expectativas en estas parejas.

El impreso del Consentimiento Informado (Anexo I) que la pareja ha de conocer y firmar informa veraz y objetivamente sobre el tema. Existen claras expectativas de que la pareja consiga un hijo sin que se contagie la mujer y por tanto tampoco el hijo.

3. Se comenta que, dada la sobrevivencia previsiblemente menor de los hombres seropositivos, se estaría contribuyendo a que naciesen hijos que quedarían huérfanos.

Ante este punto de vista hay que recordar:

a) que la Ley de Reproducción Asistida (Ley 35/1988) admite la inseminación artificial en mujeres sin pareja masculina (artículo 6º.1). Inevitablemente ese niño nacido será en la práctica equiparable al huérfano de padre.

b) La citada Ley permite la inseminación con semen congelado del marido ya fallecido por lo que, antes de ser concebido, ya es huérfano (artículo 9º.2).

Estas dos situaciones admitidas y recogidas por la Ley 35/1988 son más drásticas que la situación de la pareja serodiscordante en la que el hombre es seropositivo sano. Los avances en el tratamiento del SIDA están claramente alargando la sobrevivencia de estos pacientes. En la actualidad no se puede afirmar que una persona seropositiva al VIH-1 vaya a morir de SIDA.

3.8.2 Aspectos legales

A pesar de que la XLI Asamblea Mundial de la Salud (Ginebra, 13 de mayo de 1988, Resolución WHA 41.24), y el Consejo de las Comunidades Europeas y los Ministros de Sanidad de los Estados miembros (Bruselas, 27 de noviembre de 1989, Resolución 10.048/89), se han pronunciado de manera específica contra la discriminación de las personas afectas de SIDA, no son pocos los países de nuestro entorno en los cuales éstas parejas siguen encontrando numerosas dificultades para poder ejercer la libertad de tener hijos.

Desde el punto de vista legal se podría aducir como reparo a la IA en parejas serodiscordantes la Orden del 15 de junio de 1988 (BOE nº 1550 y 151 página 1372). Pero la técnica utilizada está estrictamente dentro de la normativa legal incluida esta Orden: Se efectúa determinación de VIH-1 en el semen lavado en sus dos formas, RNA y DNA, con la técnica más precisa en la actualidad (PCR). Sólo si el resultado es negativo se utiliza el semen en TRA.

También se ha invocado la Ley 35/1988 en su artículo 1º.2 como reparo a la IA en casos de hombres seropositivos con semen normal. Dicho artículo dice "*Las técnicas de Reproducción Asistida tienen como finalidad la actuación médica ante la esterilidad humana, para facilitar la procreación cuando otras terapéuticas se hayan descartado por inadecuadas o ineficaces*". No se trata, se ha argumentado, de esterilidad y por tanto no está indicado la IA en la pareja serodiscordante. Pero en el artículo siguiente, el 1º.3 se dice: "*Estas técnicas podrán utilizarse también en la prevención y tratamiento de enfermedades de origen genético o hereditario ...*" y en el artículo 6º.1 se especifica que "*toda mujer (la soltera también) podrá ser receptora también o usuaria de las técnicas reguladas en la presente Ley, siempre que haya prestado su consentimiento a la utilización de aquellas de manera libre, consciente, expresa y por escrito. Deberá tener dieciocho años al menos y plena capacidad de obrar*".

Está claro que en los dos artículos citados se especifica la posibilidad de efectuar TRA aunque no haya esterilidad. La Ley citada es de 1988 y no es extraño que no se refiera específicamente al SIDA. Según la Ley Orgánica 3/1986 sobre Sanidad en su artículo tres dice: "*Los medios y actuaciones del sistema sanitario estarán orientados prioritariamente a la promoción de la salud y a la prevención de las enfermedades*".

En España, tanto la sociedad como los legisladores, han sabido plasmar con notable acierto los derechos de los pacientes afectos del VIH-1, que están recogidos, como los de cualquier persona, en el artículo 14 de la Constitución Española, en la Ley General de Sanidad (Ley 14/1986); y en el artículo 512 del Nuevo Código Penal.

Es evidente que el lavado de semen y las TRA según la metodología que se describe en este trabajo proporcionan una actuación sanitaria encaminada a prevenir la enfermedad, en este caso el SIDA. Por todo lo expuesto no hay duda de que la aplicación de TRA en parejas serodiscordantes y con las garantías

técnicas que se describen es una actuación médica totalmente legal y plenamente aceptable desde el punto de vista ético.