

HIV y reproducción asistida. Reproducción Asistida en parejas serodiscordantes (hombre seropositivo) al VIH-1: experiencia de 118 niños nacidos sanos*

Simón Marina¹
 Fernando Marina
 Rosabel Expósito
 Ruth Alcolea
 Natalia Pérez
 Blanca Bermejo²
 Marta Sánchez²
 Joan Huguet²

¹Instituto de reproducción CEFER
 Barcelona
²Laboratorio Dr. Echevarne
 Barcelona

Introducción

Uno de los aspectos sanitarios en el que los hombres seropositivos han sido y siguen siendo discriminados es en su derecho a tener hijos. Las razones esgrimidas para negar las técnicas de reproducción asistida a estas parejas son en síntesis dos: riesgo de que el niño quede huérfano y de contagiar a la mujer y, por ende, al hijo. Pero el periodo de sobrevivencia, es decir, el tiempo entre la aparición de síntomas de SIDA y la muerte, se ha alargado debido al mejor control de las infecciones oportunistas y a la mayor eficacia de la terapia antirretroviral. Actualmente no se puede afirmar que toda persona infectada de VIH-1 morirá de SIDA. Y el contagio de hombre infectado a mujer seronegativa se puede reducir mediante técnicas de lavados de semen y reproducción asistida. La vía de contagio que nos interesa en este trabajo es la heterosexual y, más concretamente, el coito vaginal no protegido. Es el método natural de conseguir el embarazo, pero que conlleva el riesgo de transmitir el VIH-1 a la mujer. La profilaxis de esta vía de transmisión viral consiste en la abstinencia sexual o el uso de condón. Conseguir la gestación por vía natural y no correr ningún riesgo de transmitir al mismo tiempo el virus no es posible.

Otro aspecto importante a resaltar es que no toda pareja serodiscordante al VIH-1 es fértil. Algunas asumen el riesgo de contagiar a la mujer por tener el hijo deseado sin saber que son estériles. El resultado es que la mujer se contagia del VIH-1 y no queda gestante. La repetición de coitos no protegidos incrementa el riesgo de transmisión viral (Osmond, 1999). Presentamos nuestra experiencia en reproducción asistida (RA) aplicada a parejas serodiscordantes (hombre seropositivo), tanto fértiles como estériles.

Material y método

Protocolos

El primer protocolo de estudio e investigación clínica aprobado por el Comité Ético incluía los siguientes puntos principales:

- sólo se podía efectuar inseminación artificial (IA), no fecundación in vitro (FIV), en parejas serodiscordantes (hombre seropositivo) al VIH-1.
- el hombre debía ser portador del VIH-1 pero no paciente afecto de SIDA. Debía estar incluido, por lo tanto, en los grupos A₁, A₂, B₁ o B₂ de la clasificación del CDC de Atlanta (Castro, et al. 1992). Si el hombre estaba afecto de SIDA, no solo infectado del VIH-1, es decir si se incluía (por la clínica y la cifra de linfocitos T CD4+) en los grupos A₃, B₃, C₁, C₂ o C₃, no podía ser aceptado para efectuar IA.
- la mujer debía ser no sólo seronegativa, sino con determinación del VIH-1 con PCR, reciente y negativa. El objetivo era descartar a mujeres seronegativas pero recién infectadas que estuviesen en el periodo ventana del proceso infeccioso.
- en los espermatozoides móviles obtenidos después de los lavados había que determinar con técnica de PCR si, a pesar de los lavados, había virus, como virión (RNA) o como provirus (DNA). El objetivo del lavado de semen era eliminar el plasma seminal que contiene viriones (RNA) y las células infectadas del virus, linfocitos T y macrófagos que tienen en su genoma el DNA viral (provirus). Si el resultado del PCR daba negativo se efectuaba la IA. Si daba positivo, fuese para RNA y/o DNA, se cancelaba la IA.
- para la determinación con PCR del VIH-1 se utilizaría la mitad de los espermatozoides móviles obtenidos tras los lavados.

Correspondencia:
 Instituto de Reproducción
 CEFER
 Marqués de Vilallonga 12,
 despacho 21
 08017 Barcelona

*Artículo publicado en el libro "1ª Jornada de fertilidad y reproducción asistida de las comarcas catalanas". Barcelona: Nexus Ediciones, 2001.

- f. la IA se haría en ciclo estimulado, a las 40 horas de la administración de hCG, depositando los espermatozoides móviles dentro del útero.
- g. al mes de la IA la mujer se haría técnica de PCR para el RNA y DNA del VIH-1, con objeto de conocer si ha habido o no contagio tras la IA.
- h. el paciente ha de dar su consentimiento informando por escrito.
- i. el número de ciclos de IA previstos era de 1000, independiente de que hubiese o no gestación. Este elevado número de ciclos se propuso dada la baja infectividad del VIH-1 en un coito no protegido. Si no se producía infección de ninguna mujer después de 1000 ciclos de IA, se podrá concluir que la metodología aplicada reduce el riesgo de transmisión del VIH-1.

En un segundo protocolo, aprobado por el Comité Ético en 1998, se extendió la aplicación de la IA a todo hombre seropositivo, fuese cual fuese su estadio de SIDA. Se empezó por lo tanto a tratar a hombres en estadios A3, B3, C1, C2 y C3 (Castro, et al. 1992); y se empezó a aplicar FIV a las parejas que lo precisaran: mujeres con obstrucción tubárica, hombres con baja calidad seminal insuficiente para IA o parejas en las que la IA (tras 3-4 ciclos) no había conseguido gestación. En estos casos no se efectuó la FIV convencional sino la FIV con microinyección espermática, conocida por el acrónimo inglés ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection). En esta técnica se introduce un solo espermatozoide vivo en cada ovocito maduro.

De esta forma sí, a pesar de los lavados de semen y el PCR negativo para el RNA y el DNA del VIH-1, hubiese virus intraespermático, el inóculo viral que pudiese vehicular el espermatozoide al interior del ovocito sería el menor posible.

Pacientes

Hemos estudiado 332 hombres seropositivos. El motivo de consulta era el deseo de tener hijos genéticamente propios. Se recogió el estadio clínico del SIDA y se efectuó exploración física andrológica. De estos 332 pacientes, 299 dieron 607 muestras de semen que se lavaron.

Lavado de semen

Los detalles del lavado de semen se han publicado (Marina, et al. 1998a). En síntesis, se efectúa un primer lavado añadiendo medio de cultivo HTF

(human tubal fluid) al semen fresco en proporción 2:1. Se centrifuga a 400g durante 10 minutos y se extrae el sobrenadante. El sedimento se resuspende en HTF.

Esta suspensión espermática en HTF se centrifuga en tubos, conteniendo gradientes discontinuos de PureSperm® (50%, 70% y 90%, de arriba al fondo del tubo), a 300g durante 20 minutos. Los espermatozoides móviles descienden a la capa de 90% de PureSperm®. Esta fracción se resuspende en HTF y se vuelve a centrifugar a 200g durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se vuelve a añadir HTF. Los tubos se introducen en incubador, en ángulo de 45°C, en atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C durante una hora. Es la técnica conocida como swim-up, nadar hacia arriba. Los espermatozoides muestran antigeotropismo y por eso suben del fondo del tubo a la parte alta. Se recoge el sobrenadante que contendrá sólo espermatozoides móviles sin plasma seminal ni células espermáticas (linfocitos y macrófagos infectados); teóricamente, por lo tanto, libres de virus.

PCR para el VIH-1 en espermatozoides

La mitad de los espermatozoides móviles obtenidos se utilizan para estudiar la presencia de VIH-1 como virión y/o como provirus. El estudio del DNA viral se hace aplicando el Kit AMPLICOR HIV-1 de Roche Diagnostic System. La descondensación de la cromatina espermática se efectúa con DTT (dithiothreitol). Los cebadores (primers) usados son el SK462 y el SK431, que amplifican la región gag del genoma viral. El número de copias de DNA detectada es cuatro en las muestras positivas y una en las dudosas. La cuantificación del RNA viral se hace con Kit de Roche Diagnostic System, HIV-1 MONITOR. La sensibilidad es de 200 copias por ml.

Reproducción Asistida (RA)

Se efectuaron 458 ciclos de IA y 58 ciclos de FIV con ICSI. Los detalles de la metodología empleada están publicados (Marina, et al. 1998a; Marina, et al. 1998b).

Resultados

La edad media de los hombres era de 33,7 ± 3,3 años. El estadio del SIDA en que estaban se recoge

en la Tabla 1. Los resultados de la determinación tras los lavados de semen se expresan en la Tabla 2. La Tabla 3 muestra los ciclos de IA y FIV-ICSI efectuados y los resultados obtenidos. Ninguna mujer se ha seronegativo al VIH. Todos los niños nacidos han sido seronegativos al VIH.

Tabla 1.
Distribución de pacientes de acuerdo con la clasificación del CDC para 1993. Según los síntomas clínicos; A, B y C; y según el recuento de linfocitos CD4+

Recuento de linfocitos CD4+	Estado clínico		
≥500/mm ³	A ₁ = 54 (16,2%)	B ₁ = 7 (2,1%)	C ₁ = 2 (0,6%)
200 - 499/mm ³	A ₂ = 111 (33,4%)	B ₂ = 38 (11,4%)	C ₂ = 9 (2,7%)
<200/mm ³	A ₃ = 38 (11,4%)	B ₃ = 38 (11,4%)	C ₃ = 35 (10,5%)

Tabla 2.
Resultados obtenidos de PCR-DNA y PCR-RNA del VIH en las muestras lavadas (n = 607)

Muestras	VIH-1 DNA	VIH-1 RNA	%
585	Negativo	Negativo	96,4
14	Positivo	Negativo	2,3
7	Negativo	Positivo	1,1
1	Positivo	Positivo	0,2

Tabla 4.
¿Infecta el VIH-1 al espermatozoide humano?

Autores	Técnicas	Resultado
Bagasra <i>et al.</i> (1988)	MET	Sí
Scofield <i>et al.</i> (1992)	MET	Sí
Dussaix <i>et al.</i> (1993)	MET	Sí
Baccetti <i>et al.</i> (1998)	MET	Sí
Anderson <i>et al.</i> (1990)	MET	No
Pudney (1990)	MET	No
Pudney <i>et al.</i> (1998)	MET	No
Bagasra and Freund (1990)	HIS	Sí
Baccetti <i>et al.</i> (1994)	HIS	Sí
Baccetti <i>et al.</i> (1998)	HIS	Sí
Pudney (1990)	HIS	No
Pudney <i>et al.</i> (1998)	HIS	No
Baccetti <i>et al.</i> (1994)	Cultivo ^a	Sí
Kuji <i>et al.</i> (1998)	Cultivo ^a	No
Bagasra <i>et al.</i> (1994)	PCR <i>in situ</i>	DNA+
Quayle <i>et al.</i> (1998) ^o	PCR <i>in situ</i>	No
Pudney <i>et al.</i> (1998)	PCR <i>in situ</i>	No
Nuovo <i>et al.</i> (1994)	PCR <i>in situ</i> en testes	DNA+
Muciaccia <i>et al.</i> (1998)	PCR <i>in situ</i> en testes	DNA+
Shevchuck <i>et al.</i> (1998)	PCR <i>in situ</i> en testes	DNA+
Scofield <i>et al.</i> (1992)	PCR	DNA+
Baccetti <i>et al.</i> (1994)	PCR	RNA+
Marina <i>et al.</i> (1998a)	PCR	±
Dulouist <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	-

MET = Microscopía electrónica de transmisión; HIS = Hibridación in situ; ^aCultivo in vitro de muestras de semen de hombre seronegativo al VIH con VIH-1.

A) Ciclos de IAC (n = 458; 100%)

Mujeres inseminadas	233
Ciclos/mujer	1,96
Gestaciones clínicas	116
Gestaciones/ciclo	25,3%
Gestaciones/mujer	49,7%
Abortos	10(8,6%)
Nacimientos	86
Partos gemelares	17(19,8%)
Niños nacidos	103
Gestaciones en curso	20

B) Ciclos de FIV-ICSI (n = 58; 100%)

Mujeres	40
Ciclos/mujer	1,4
Gestaciones	27
Gestaciones/ciclo	46,5%
Gestaciones/mujer	67,5%
Abortos	5 (18,5%)
Nacimientos	11
Partos gemelares	5 (45,4%)
Niños nacidos	15
Gestaciones en curso	11

Ninguna mujer se infectó con el VIH-1. Todos los niños nacidos fueron seronegativos al VIH-1.

Tabla 3.
Resultados de Reproducción Asistida en parejas serodiscordantes (hombre seropositivo)

Discusión

El hombre seropositivo al VIH-1 tiene derecho a tener hijos genéticamente propios como cualquier otro paciente. No ha de ser, por lo tanto, discriminado por su infección viral. Así lo reconoce el artículo 14 de nuestra Constitución, la Ley General Sanidad (Ley 14/1986) y el Nuevo Código Penal en su artículo 512 (Fernández, 1996). La discriminación por VIH ha sido específicamente prohibida por la 41 Asamblea Mundial de la Salud (13, mayo, 1988) en su resolución WHA 41, 24; por el Congreso de las Comunidades Europeas y por los ministros de Sanidad de los estados miembros (Bruselas, 27, noviembre, 1989) en su resolución 10, 048/89. La Declaración Universal de los derechos de las personas con VIH – SIDA en su sección 5, establece que “cualquier discriminación de las personas que padecen SIDA o infección por VIH es una violación de los derechos humanos”. Un segundo punto importante es que la actuación médica descrita en ningún caso aumenta el riesgo de transmisión del VIH.

Aunque no podemos demostrar que el VIH-1 no se adhiera fuertemente al espermatozoide o lo infecte, la experiencia propia mostrada comienza a indicar que, con la metodología descrita, el riesgo de transmitir el VIH-1 a través de espermatozoides lavados es inferior (cero por el momento) al observado en parejas serodiscordantes que efectúan coito no protegido (Mandelbrot, et al. 1997).

Pensamos que los resultados positivos obtenidos con el PCR a pesar de los lavados, son falsos positivos pues la repetición del PCR en estos casos ha dado negativa. Otras opciones teóricas son:

1. en el caso de PCR positivo al RNA, que los lavados seminales no hayan eliminado completamente el plasma seminal y en el caso de PCR positivo al DNA tras los lavados, que haya quedado algún linfocito y/o macrófagos infectados. Pero la observación al microscopio óptico de la fracción de espermatozoides móviles obtenida tras los lavados no detecta ninguna célula no espermática.
2. el espermatozoide está infectado de VIH-1 y los lavados no pueden eliminarlo. Es un tema muy controvertido y la Tabla 4 recoge algunos resultados contradictorios publicados por distintos grupos.

Desde el punto de vista clínico y ante los resultados de la experiencia de nuestro grupo, el espermatozoide no es vehículo transmisor del VIH-1 y sí lo es el semen. La metodología descrita permite ayudar a hombres seropositivos a tener hijos propios y sanos.

Bibliografía

- Anderson DJ, Wolff H, Pudney J, et al. Presence of HIV in semen. In: Alexander NJ, Gebelnic HL, Spieler JM (eds). *Heterosexual transmission of AIDS*. New York: Wiley-Liss, 1990;167-80.
- Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG, et al. HIV -1 particles in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte. *J Cell Biol* 1994;127:903-14.
- Baccetti B, Benedetto A, Collodel G, et al. The debate on the presence of HIV-1 in human gametes. *J Reprod Immunol* 1998;41:41-68.
- Bagasra O, Freund M. In vivo and in vitro studies of HIV-1 and human sperm. In: Alexander NJ, Gebelnic HL, Spieler JM. *Heterosexual Transmission of AIDS*. New York: Wiley-Liss, 1990;155-66.
- Bagasra O, Freund M, Weidmann J, et al. Interaction of human immunodeficiency virus with human sperm in vitro. *J AIDS* 1988;1:431-4.
- Bagasra O, Freund M, Condoluci D, et al. Presence of HIV-1 in sperm of patients with HIV/AIDS. *Mol Androl* 1989;2:109-25.
- Bagasra O, Farzadegan H, Seshamma T, et al. Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1 infected men. *AIDS* 1994;8:1669-74.
- Castro K G, Ward JW, Slutsker L, et al. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morbidity Mortality Weekly Rep* 1992;41:1-9.
- Duloust E, Tachet A, De Almeida M, et al. Detection of HIV-1 in seminal plasma and seminal cells of HIV-1 seropositive men. *J Reprod Immunol* 1998;41:27-40.
- Dussaix E, Guetard D, Dauguet C, et al. Spermatozoa as potential carriers of HIV. *es Virol* 1993;144:487-95.
- Fernández J. La pandemia VIH/SIDA y el derecho penal: pluralidad de perspectivas. *Avances en SIDA* 1996; 5:61-71.
- Kuji N, Tanaka H, Takahashi J, et al. Elimination efficiency of HIV from semen by Percoll continuous density gradient-swim-up. *Hum Reprod* 1998;13 (Abstract book):131.
- Mandelbrot L, Heard I, Henrion Géant E, et al. Natural conception in HIV-negative women with HIV-infected partners [letter]. *Lancet* 1997;349:850-1.
- Marina S, Marina F, Alcolea R, et al. Human immunodeficiency virus type 1-serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1998a;70:351-9.
- Marina S, Marina F, Alcolea R, et al. Case Report: Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man. *Hum Reprod* 1998b;13:3247-9.

- Muciaccia B, Filippini A, Ziparo E, *et al.* Testicular germ cells of HIV-seropositive asymptomatic men are infected by the virus. *J Reprod* 1998;41:81-94.
- Nuovo GJ, Becker J, Sirmsir A, *et al.* HIV-1 nucleic acids localize to the spermatogonia and their progeny. A study by polymerase chain reaction in situ hybridization. *Am J Pathol* 1994;144:1142-8.
- Osmond DH. Sexual Transmission of HIV. In: Cohen PT, Sande MA, Volberding PA, *et al.* (eds). *The AIDS knowledge base*. New York: Lippincott Williams and Wilkins, 1999;53-63.
- Pudney J. Caveats associated with identifying HIV using transmission electron microscopy. In: Alexander NJ, Gebelnick HL, Spieler JM (eds.) *Heterosexual transmission of AIDS*. New York: Wiley-Liss, 1990: 197-204.
- Pudney J, Nguyen H, Xu C, *et al.* Microscopic evidence against HIV-1 infection of germ cells or attachment to sperm. *J Reprod Immunol* 1998;41:105-25.
- Quayle AJ, Xu C, Mayer KH, *et al.* T Lymphocytes and Macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *J Infect Dis* 1997;176:960-8.
- Quayle AJ, Xu Ch, Tucker L, *et al.* The case against an association between HIV-1 and sperm: molecular evidence. *J Reprod Immunol* 1998;41:127-36.
- Scofield VL, Poiesz B, Kennedy C, *et al.* HIV binds to normal sperm and is present in sperm from infected men. *Eighth International Conference on AIDS*. Amsterdam, 1992;Abstract 2102.
- Shevchuk MM, Nuovo GJ, Khalife G. HIV in testis: quantitative histology and HIV localization in germ cells. *J Reprod Immunol* 1998;41:69-80.