



Universidad de Granada

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**ATENCIÓN A LOS DESEOS REPRODUCTIVOS DE
LAS PAREJAS CON ENFERMEDADES
INFECCIOSAS TRANSMISIBLES (VIH, HEPATITIS
C, HEPATITIS B)**

Irene Molina González

GRANADA, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Irene Molina González
D.L.: GR 2141-2012
ISBN: 978-84-9028-092-8

D. JUAN MOZAS MORENO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DEL SERVICIO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “VIRGEN DE LAS NIEVES” DE GRANADA, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. Irene Molina González ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: “ATENCIÓN A LOS DESEOS REPRODUCTIVOS DE LAS PAREJAS CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS TRANSMISIBLES (VIH, HEPATITIS C, HEPATITIS B)”, que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 12 de Diciembre de 2011

Fdo.: Juan Mozas Moreno

D. LUIS MARTÍNEZ NAVARRO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DEL SERVICIO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DE LAS NIEVES" DE GRANADA, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. Irene Molina González ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: "ATENCIÓN A LOS DESEOS REPRODUCTIVOS DE LAS PAREJAS CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS TRANSMISIBLES (VIH, HEPATITIS C, HEPATITIS B)", que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 12 de Diciembre de 2011

Fdo.: Luis Martínez Navarro

D. JOSÉ ANTONIO CASTILLA ALCALÁ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DE LAS NIEVES" DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. Irene Molina González ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: "ATENCIÓN A LOS DESEOS REPRODUCTIVOS DE LAS PAREJAS CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS TRANSMISIBLES (VIH, HEPATITIS C, HEPATITIS B)", que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 12 de Diciembre de 2011

Fdo.: José Antonio Castilla Alcalá

Agradecimientos.

Quiero agradecer a todas las personas que, de una manera u otra, han contribuido a que este trabajo de investigación se hiciera realidad, y en especial a:

A D. José Antonio Castilla por transmitirme la entrega y responsabilidad en el trabajo investigador y clínico, y por hacer de mí la embrióloga vitrificada que soy.

A D. Juan Mozas y D. Luis Martínez por su colaboración y disposición, sin la cual este trabajo no hubiera visto la luz.

A Dña. Ana Clavero y Dña. María Carmen Gonzalvo por todo lo que me han enseñado y por inculcarme que con una buena organización, en un equipo de trabajo tan grande y nuevo, siempre se consigue un buen resultado.

A Dña. Coral García, Dña. Carmen Hidalgo y D. Juan Pasquau por su amabilidad y disposición para facilitarme todos los datos y libros que he necesitado.

A todo el personal de la Unidad de Reproducción del H. U. Virgen de las Nieves de Granada por prestarme ayuda, siempre que se la he pedido.

A todos los eminentes embriólogos que han coincidido conmigo: Rafa, Belén, María Roldán, Rocío, Jose, Antonio, Noelia, Eva, AnaP, Lorena, María Serrano y Nacho. A mi “responsable docente postiza” Sandra por mostrarme siempre su apoyo y confianza. Y a Bea y Silvia por aguantar con paciencia mis intentos de transmisión de docencia.

A mis padres y a Marta por su apoyo incondicional y por estar siempre disponibles para ayudarme.

Y a Luismi por hacer que todo a su lado sea mejor.

**A mis padres,
a Marta,
y a Luismi.**

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en la siguiente **revista** científica:

- Pasquier C, Andreutti C, Bertrand E, Bostan A, Bourlet T, Molina I, Grossman Z, Halfon P, Leruez-Ville M, Lüneborg-Nielsen M, et al. Multicenter assessment of HIV-1 RNA quantitation in semen in the CREAThE network. J Med Virol 2011: in press.

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

- IV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico (Zaragoza). Octubre 2010.
- XVIII Reunión de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos (Jaén). Marzo 2011.
- Sábado Ginecológico: Reproducción y Medicina de Familia. Auspiciado por la Sociedad Andaluza de Medicina Familiar y Comunitaria (SAMFyC) y por la Sociedad Andaluza de Ginecología y Obstetricia (SAGO), Marzo 2011.
- VI Congreso Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) (Gerona). Octubre 2011.
- V Congreso Nacional del Laboratorio Clínico (Málaga). Noviembre 2011.
- 27th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embriology (ESHRE) (Estocolmo, Suecia). Julio 2011.

Glosario

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

TARGA: terapia antirretroviral de gran actividad.

EIT: enfermedad infecciosa transmisible.

TRA: técnicas de reproducción asistida.

VHC: virus de la hepatitis C.

VHB: virus de la hepatitis B.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

HSG: histerosalpingografía.

HSC: histeroscopia

LPC: laparoscopia.

IA: inseminación artificial.

IAC: inseminación artificial conyugal.

IAD: inseminación artificial de donante.

FIV: fecundación in vitro.

ICSI: microinyección espermática intracitoplasmática.

PGS: diagnóstico genético preimplantacional con screening de aneuploidías

RN: reproducción natural.

CV: carga viral.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedades infecciosas transmisibles.	1
1.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana.	1
1.1.1 Etiología.....	1
1.1.1.1 Características generales del VIH.	1
1.1.1.2 Estructura del VIH-1.	1
1.1.1.3 Genoma del VIH-1.	2
1.1.1.4 Ciclo de replicación del VIH tipo 1.....	5
1.1.1.5 VIH tipo 2.....	6
1.1.2 Epidemiología.....	7
1.1.2.1 Mecanismos de transmisión.	11
1.1.3 Técnicas de detección del VIH.....	15
1.1.4 Terapia antirretroviral.	19
1.1.5 VIH y reproducción.....	20
1.1.5.1 El espermatozoide y el ovocito como vehículo del VIH.	20
1.1.5.2 Influencia del VIH sobre la fertilidad.....	20
1.1.5.3 Efecto de la infección VIH sobre la gestación y resultados obstétricos.....	22
1.1.5.4 VIH y las técnicas de reproducción asistida.	22
1.2 Virus de la Hepatitis C.	26
1.2.1 Etiología.....	26
1.2.1.1 Características generales.....	26
1.2.1.2 Estructura del VHC.	26
1.2.1.3 Genoma.	26
1.2.1.4 Replicación.	27
1.2.2 Epidemiología.....	28
1.2.2.1 Mecanismos de transmisión.	29
1.2.3 Técnicas de detección del VHC.....	30

1.2.4 Tratamiento.....	31
1.2.5 VHC y reproducción.....	31
1.2.5.1 El espermatozoide y el ovocito como vehículo del VHC.	31
1.2.5.2 Influencia del VHC sobre la fertilidad.....	33
1.2.5.3 Efecto de la infección VHC sobre la gestación y resultados obstétricos.....	33
1.2.5.4 VHC y las técnicas de reproducción asistida.	34
1.3 Virus de la Hepatitis B.	34
1.3.1 Etiología.....	34
1.3.1.1 Características generales.....	34
1.3.1.2 Estructura del VHB.	35
1.3.1.3 Genoma.	35
1.3.1.4 Replicación.	36
1.3.2 Epidemiología.....	36
1.3.2.1 Mecanismos de transmisión.	38
1.3.3 Técnicas de detección del VHB.....	39
1.3.4 Tratamiento.....	40
1.3.5 VHB y reproducción.....	40
1.3.5.1 El espermatozoide y el ovocito como vehículo del VHB.	40
1.3.5.2 Influencia del VHB sobre la fertilidad.....	42
1.3.5.3 Efecto de la infección por el VHB sobre la gestación y resultados obstétricos.	42
1.3.5.4 VHB y las técnicas de reproducción asistida.	42
2. Estudio básico de esterilidad y técnicas de reproducción asistida.	43
2.1. Estudio básico de esterilidad.....	43
2.1.1 Anamnesis de la mujer.	45
2.1.2 Exploración ginecológica.....	47
2.1.3 Evaluación tubárica.	47
2.1.4 Esterilidad por factor masculino.	48

2.1.5 Anamnesis del varón.....	50
2.1.6 Análisis de semen.....	51
2.1.7 Causas de esterilidad.....	55
2.2. Técnicas de reproducción asistida.....	56
2.2.1 Evaluación ovocitaria.....	59
2.2.2 Evaluación del cigoto.....	61
2.2.3 Calidad embrionaria.....	63
2.2.4 Lavado de semen.....	68
2.2.4.1 Detección del virus en la muestra lavada.....	70
3. Opciones reproductivas en parejas con EIT.....	71
3.1 Reproducción natural.....	71
3.1.1. Profilaxis pre-exposición.....	73
3.2 Autoinseminación.....	74
3.3 Reproducción Asistida.....	74
4. Atención a los deseos reproductivos en nuestro medio.....	75
OBJETIVOS	81
MATERIAL Y MÉTODOS	85
1. Opciones reproductivas escogidas por parejas con al menos un miembro positivo para VIH.....	87
1.1 Características sociodemográficas y hábitos tóxicos.....	87
1.2 Características de la infección VIH.....	87
2. Asunción de riesgos en parejas con varón seropositivo para VIH que demandan atención reproductiva.....	88
3. Reproducción natural en parejas con VIH.....	89
3.1 Características de la infección VIH.....	90
3.2 Resultados obstétricos y neonatales de los partos.....	90
4. Técnicas de Reproducción Asistida en parejas seropositivas para VIH, VHC y/o VHB en el Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA).....	91
4.1 Análisis de la demanda.....	92

4.1.1 Demanda observada.	92
4.1.2 Demanda teórica.	93
4.1.3 Variables que influyen en la demanda.	93
4.2 Calidad seminal y resultados de lavado de semen en varones con EIT.	94
4.2.1 Análisis de semen.	95
4.2.2 Lavado de semen y detección de carga viral.	95
4.2.3 Swim-up.	96
4.3. Control de calidad externo para la cuantificación de VIH ARN.	97
4.3.1 Laboratorios.	97
4.3.2 Panel de muestras.	97
4.4 Resultados de estimulación ovárica e ICSI en parejas con varones con EIT.	98
4.4.1 Calidad embrionaria y ovocitaria.	100
4.4.2 Test de seroconversión.	102
5. Método estadístico.	102
RESULTADOS	105
1. Opciones reproductivas escogidas por parejas con al menos un miembro positivo para VIH.	107
1.1 Características sociodemográficas y hábitos tóxicos.	107
1.2 Características de la infección VIH.	108
2. Asunción de riesgos en parejas con varón seropositivo para VIH que demandan atención reproductiva.	112
3. Reproducción natural en parejas con VIH.	115
3.1 Características de la infección VIH.	115
3.2 Resultados obstétricos y neonatales de los partos.	116
4. Resultados de Reproducción Asistida en parejas VIH, VHC y VHB.	121
4.1 Análisis de la demanda.	121
4.1.1 Variables que influyen en la demanda.	122
4.2 Calidad seminal y los resultados de lavado de semen en parejas que se someten a TRA.	125

4.2.1 Características seminales dependiendo de la infección.	125
4.2.2 Correlación entre la infección por VIH y los parámetros seminales.	126
4.3. Control de calidad externo para la cuantificación de VIH ARN.	131
4.3.1 Tipos de ensayos utilizados para cuantificar VIH-1.	131
4.3.2 Detección de ARN VIH-1 en plasma seminal.	131
4.3.3 Detección de ARN VIH-1 en células seminales.	132
4.4 Resultados de estimulación ovárica e ICSI en parejas con varones con EIT.	136
DISCUSIÓN	145
1. Opciones reproductivas en parejas con al menos un miembro seropositivo para VIH.	147
2. Asunción de riesgos en parejas con varón seropositivo que demandan atención reproductiva.	149
3. Resultados de reproducción natural en parejas con VIH.	150
4. Resultados de reproducción asistida en parejas seropositivas para VIH, VHC y/o VHB.	152
5. Control de calidad externo para cuantificación de VIH ARN.	158
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	167

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades infecciosas transmisibles.

1.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

1.1.1 Etiología.

1.1.1.1 Características generales del VIH.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia de los retrovirus, subfamilia lentivirus (Streicher HZ, 2000). Estos virus tienen una serie de características específicas que son determinantes en la compleja patogenia de la infección por el VIH, entre estas características se encuentra que son virus de gran diversidad genética (virus ARN) y genoma muy complejo (lentivirus). Su ciclo vital se compone de 2 fases, la fase de virión infectante (ARN) y la fase provirus (ADN). Esta fase intermedia de integración en el genoma huésped le permite prolongados periodos asintomáticos (latencia), a pesar de una viremia persistente.

Además estos virus ARN se replican mediante un mecanismo inverso al habitual. El papel fundamental para poder realizar esto lo juega una enzima llamada transcriptasa inversa. Sus células huésped son los linfocitos CD4+, macrófagos, células nerviosas de la microglía y células dendríticas residentes en mucosas (células de Langerhans) (Pascual and Corral, 2003).

1.1.1.2 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; Moore et al., 2001; Zhu et al., 2008). 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 1), que se forman a partir de una proteína precursora de 53-kD producto del gen *gag* por acción de la VIH-1 proteasa. El polipéptido fosforilado p24 forma la estructura principal de la nucleocápside. La p17 está ligada a la parte interna de la bicapa lipídica y se cree que probablemente tenga una función de estabilización de los componentes externos e internos del virión. Las proteínas p7 y p9 se unen directamente al ARN del virus formando lo que se conoce como nucleocápside o

core. El core además de estas proteínas contiene dos copias de ARN de cadena única y varias enzimas virales (transcriptasa inversa, ARNsa H, integrasa y proteasa).

Figura 1: Estructura del VIH-1 (Córdoba et al., 1999).



1.1.1.3 Genoma del VIH-1.

El genoma del VIH tiene un tamaño de 9,8 kilobases. El VIH, como la mayoría de retrovirus con capacidad replicatoria, contiene sólo tres genes esenciales denominados *gag*, *pol* y *env* (Varmus, 1988). Diversos fenómenos de postranscripcionales (splicing) producen muchos ARNm subgenómicos que son importantes para la síntesis de otras proteínas virales. Se conocen genes adicionales: *tat* y *rev* que codifican proteínas reguladoras y *vpu*, *vpr*, *vif*, *nef* que codifican otras proteínas accesorias (Figura 2).

Figura 2: Genoma del VIH-1 (HIV sequence database, 2011).



Precursor Gag-Pol

El gen *gag* codifica los polipéptidos de la nucleocápside o core (Liu et al., 2010; Briggs and Krausslich, 2011). 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; Wapling et al., 2007). La proteína precursora Pol se divide proteolíticamente en cuatro proteínas: transcriptasa inversa (RT), proteasa (PR), ribonucleasa H (ARNsa H) e integrasa (IN). La PR procesa las poliproteínas Gag y Pol. La IN se ocupa de la integración del virus en el genoma de la célula huésped.

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; Malim and Emerman, 2008; Neil and Bieniasz, 2009). Para la infección de otras líneas celulares no es necesaria la proteína vif, esto sugiere la presencia de otra proteína celular que ejerce la misma función. Las cadenas de VIH que son vif-defectivas pueden entrar en las células, pero no pueden sintetizar el ADN provírico eficientemente (von Schwedler et al., 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; Gaddis et al., 2003).

Vpr

Vpr juega un importante papel en la capacidad infectiva del VIH sobre células que no se encuentran en división (Heinzinger et al., 1994; Le Rouzic and Benichou, 2005). También la proteína vpr es capaz de bloquear el ciclo celular en la fase G2 (Jowett et al., 1995; Rogel et al., 1995; Kogan and Rappaport, 2011).

Vpu

El 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 ARNm que env, pero se traduce en una frecuencia diez veces menor que env debido a un codón de inicio de traducción poco eficiente (Schwartz et al., 1990). Vpu tiene una doble función: actúa degradando los complejos intracelulares formados por CD4 y env que dificultan el ensamblaje de las partículas virales (Willey et al., 1992; Dube et al., 2010), y actúan también incrementando la liberación de partículas en la

superficie de las células infectadas (Tokarev and Guatelli, 2011). En ausencia de vpu, pueden verse un gran número de viriones unidos a la superficie de la célula (Klimkait et al., 1990).

Env

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

Nef

La proteína nef (negative factor) de 27 kD, se pensaba que actuaba inhibiendo la replicación del VIH-1 (Terwilliger et al., 1986; Luciw et al., 1987) por regulación negativa de la actividad transcripcional (Ahmad and 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; Chowes et al., 1994; Miller et al., 1994; Rhee and Marsh, 1994; Miller et al., 1995; Schaeffer et al., 2001). Nef contribuye a la evasión de la inmunidad celular adquirida modulando las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (Schwartz et al., 1996; Collins et al., 1998; Stumptner-Cuvelette et al., 2001). También impide que los receptores celulares de la envoltura viral como CD4 y CCR5 interfieran con la unión y liberación del virus (Aiken et al., 1994; Lama et al., 1999; Michel et al., 2005).

Tat

La proteína tat está implicada en inducir la replicación del VIH (Meredith et al., 2009). Según algunos estudios, tat actúa principalmente promoviendo la fase de elongación durante la transcripción (Kao et al., 1987; Feinberg et al., 1991). Otros estudios sugieren que tat incrementa la tasa de transcripción (Southgate and Green, 1991; Tiley et al., 1992; Okamoto, 2011).

Rev

La proteína reguladora rev permite junto con otras proteínas celulares el paso del ARNm no procesado desde el núcleo al citoplasma celular. Esto permite

que se sinteticen las proteínas precursoras necesarias para la producción de partículas virales. En ausencia de rev los transcritos son retenidos en el núcleo y degradados (Thomson Okatsu, 1998; Furnes et al., 2008).

1.1.1.4 Ciclo de replicación del VIH tipo 1.

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

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

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

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

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

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

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

1.1.1.5 VIH tipo 2.

La infección por VIH-2 fue originalmente descubierta en el este de África, aunque actualmente está expandida por otras partes de África, India, Europa (Soriano et al., 2000; Barin et al., 2007) y Estados Unidos (Soriano et al., 2000; Torian et al., 2010). Aunque VIH-2 es menos patogénico que VIH-1 (Popper et al., 1999), algunos pacientes infectados con VIH-2 pueden desarrollar una inmunodeficiencia avanzada. Se conoce poco sobre el manejo óptimo de ésta infección y son necesarios todavía estudios aleatorizados controlados que

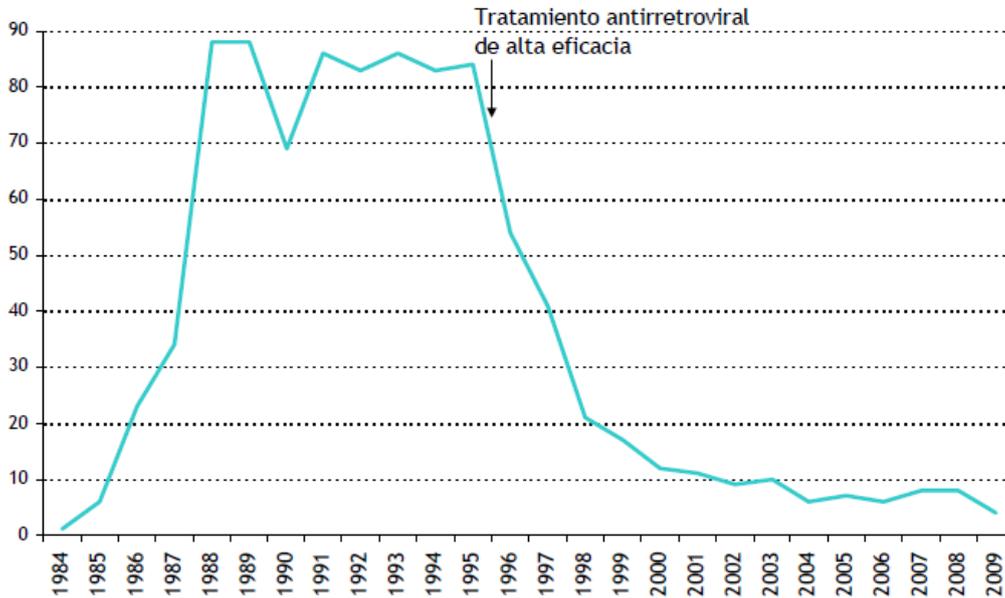
comparen diferentes opciones de tratamiento antirretroviral. También es prioritario el desarrollo de un test comercial cuantitativo para ARN VIH-2, de esta forma se podría monitorizar correctamente la efectividad de la terapia antirretroviral (Campbell-Yesufu and Gandhi, 2011). Se están intentando desarrollar un consorcio para estudiar la infección por VIH-2 y su manejo, lo cual podría mejorar el cuidado de los pacientes infectados por VIH-2 (Gottlieb et al., 2008).

1.1.2 Epidemiología.

Desde la descripción de los primeros casos a principios de la década de los ochenta, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se ha convertido en la primera pandemia del siglo XXI. A pesar de los avances terapéuticos, que han modificado la situación de la enfermedad en los países más desarrollados hasta convertirla en una "infección crónica", la epidemia sigue avanzando a nivel mundial (Cañas et al., 2003).

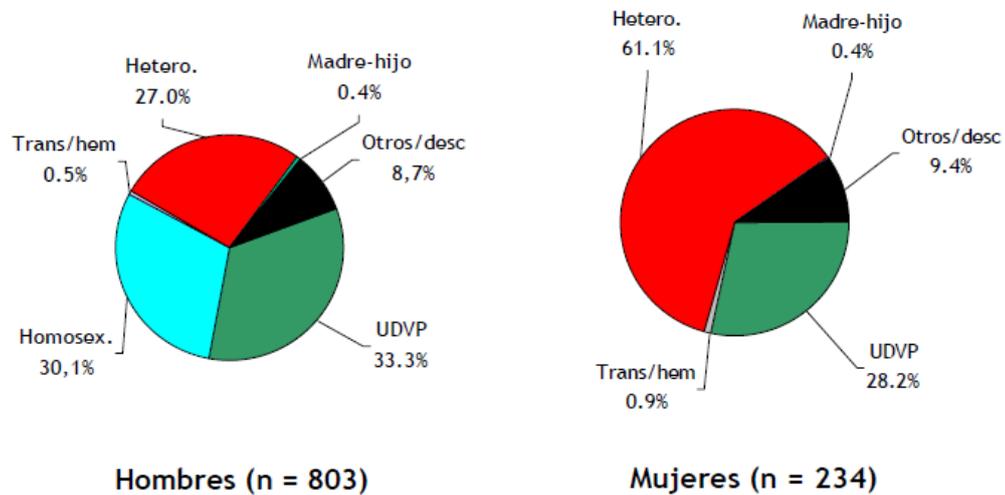
El uso generalizado de las terapias antirretrovirales de gran actividad (TARGA) en los países desarrollados ha prolongado el periodo de incubación del SIDA y ha reducido drásticamente la mortalidad de los afectados. Todo ello se ha traducido en un aumento de la supervivencia y de la calidad de vida de las personas infectadas por el VIH, y en términos epidemiológicos, en una reducción de la incidencia anual de casos de SIDA y en un incremento del número de personas que viven con la infección (prevalencia de VIH). La TARGA ha supuesto también una disminución de la transmisión materno-fetal (Fiscus et al., 1999) (Figura 3), el efecto sobre la transmisión sexual parece ser más controvertido debido a que la disminución de la transmisión puede conllevar un incremento de las conductas de riesgo (Hosseini et al., 2002).

Figura 3: Casos de SIDA de transmisión madre-hijo en España. Registro Nacional de SIDA. Actualización a 30 de Junio de 2010 (Centro Nacional de Epidemiología, 2010).



En España se han notificado un total de 79.363 casos de sida (situación a 30 de Junio de 2010) (Centro Nacional de Epidemiología, 2010). En el momento actual, las tasas de nuevos diagnósticos de VIH se encuentran en cifras similares a las de otros países del entorno de la Unión Europea, lo que supone una indudable mejora respecto a las pasadas décadas. No obstante, al examinar la tendencia de los nuevos diagnósticos de VIH en los últimos años, se aprecia un ligero incremento, que se debe al aumento entre los hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres, ya que aquellos diagnósticos en los que la infección se atribuye al uso compartido de material de inyección disminuyen en el mismo periodo, y la tendencia es estable o ligeramente descendente cuando la vía de transmisión son las relaciones heterosexuales. Este aumento en los nuevos diagnósticos en homosexuales también se aprecia en otros países de Europa occidental (Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad, 2010). En la Figura 4 queda reflejada la distribución de categorías de transmisión según el sexo.

Figura 4: Casos de SIDA diagnosticados en España en 2009. Distribución de categorías de transmisión por sexo. Registro Nacional de SIDA. Actualización a 30 de Junio de 2010 (Centro Nacional de Epidemiología, 2010).



En la Tabla 1 se muestra la distribución por comunidades autónomas y provincias de los casos de SIDA acumulados en España desde 1981 (Centro Nacional de Epidemiología, 2010).

Tabla 1: SIDA en España. Datos acumulados desde 1981. Casos por Comunidad Autónoma y provincia de residencia, según la categoría de transmisión. Registro Nacional de SIDA. Fecha de actualización: 30 de junio de 2010 (Centro Nacional de Epidemiología, 2010).

CC.AA.	Provincia	Homo/ bisex.	UDVP	Hemo- der.	Trans- fusión.	Madre- hijo	Hetero- sexual	Otros /N.C.	Total
ANDALUCÍA	Almería	57	413	11	4	7	188	46	726
	Cádiz	80	1649	28	12	17	249	82	2117
	Córdoba	30	572	11	6	6	116	17	758
	Granada	83	724	7	3	19	153	75	1064
	Huelva	47	493	6	2	9	112	22	691
	Jaén	29	369	11	1	10	97	24	541
	Málaga	454	1823	40	14	41	419	79	2870
	Sevilla	250	1741	41	8	16	334	153	2543
Total		1030	7784	155	50	125	1668	498	11310
ARAGÓN	Huesca	12	120	4	1	5	64	18	224
	Teruel	6	66	4	1	1	20	3	101
	Zaragoza	97	685	23	4	18	294	102	1223
	Total	115	871	31	6	24	378	123	1548
ASTURIAS	Total	157	836	14	14	10	277	79	1387
BALEARES	Total	488	1199	24	12	38	500	177	2438
CANARIAS	Las Palmas	402	390	14	5	18	329	117	1275
	S.C.Tenerife	318	415	13	8	6	212	46	1018
	Total	720	805	27	13	24	472	232	2293
CANTABRIA	Total	74	447	5	3	11	103	36	679
CAST-LA MANCHA	Albacete	17	106	1	1	6	38	15	184
	Ciudad Real	16	97	7	2	2	25	13	162
	Cuenca	15	99	1	.	.	18	8	141
	Guadalajara	16	159	6	5	3	47	21	257
	Toledo	49	448	9	3	5	126	33	673
	Total	113	909	24	11	16	254	90	1417
CASTILLA Y LEON	Ávila	10	90	1	2	2	29	7	141
	Burgos	25	315	5	3	9	70	29	456
	León	30	243	12	16	9	116	25	451
	Palencia	16	187	3	.	2	47	16	271
	Salamanca	20	306	6	.	10	67	21	430
	Segovia	15	49	5	.	2	21	4	96
	Soria	3	45	4	.	.	18	3	73
	Valladolid	73	547	14	2	9	114	17	776
	Zamora	10	145	6	1	2	37	10	211
	Total	202	1927	56	24	45	518	133	2905

Homo/bisex.=Hombres homo y bisexuales; UDVP=Usuarios de drogas por vía parenteral, incluidos hombres homo y bisexuales usuarios de drogas por vía parenteral;Hemoder.=Receptores de hemoderivados; Transfusión=Receptores de transfusiones sanguíneas; Heterosexual=Relaciones heterosexuales de riesgo; Otros/N.C.=No se mencionan exposiciones de riesgo.

CC.AA.	Provincia	Homo/ bisex.	UDVP	Hemo- der.	Trans- fusión.	Madre- hijo	Hetero- sexual	Otros /N.C.	Total
CATALUÑA	Barcelona	2889	7318	86	43	173	2586	629	13724
	Girona	130	512	8	6	24	254	82	1016
	Lleida	29	326	5	1	5	183	20	569
	Tarragona	120	550	15	3	9	228	33	958
	Total	3168	8706	114	53	211	3251	764	16267
COM.VALENCIANA	Alicante	347	1143	22	3	9	415	109	2048
	Castellón	50	236	3	2	7	104	14	416
	Valencia	436	2386	29	29	55	629	255	3819
	Total	833	3765	54	34	71	1148	378	6283
EXTREMADURA	Badajoz	39	445	19	5	9	79	63	659
	Cáceres	19	301	4	1	8	60	41	434
	Total	58	746	23	6	17	139	104	1093
GALICIA	A Coruña	144	1037	27	12	4	306	43	1573
	Lugo	18	190	6	4	3	79	13	313
	Ourense	41	276	8	5	1	84	19	434
	Pontevedra	139	902	21	10	6	334	86	1498
	Total	342	2405	62	31	14	801	163	3818
MADRID	Total	3161	12005	141	90	237	2382	850	18866
MURCIA	Total	273	886	18	6	18	349	103	1653
NAVARRA	Total	70	582	9	3	6	185	28	883
PAIS VASCO	Álava	51	489	6	2	4	136	23	711
	Guipúzcoa	115	1202	28	10	17	238	60	1670
	Vizcaya	218	2204	25	13	42	522	96	3120
	Total	384	3895	59	25	63	896	179	5501
LA RIOJA	Total	22	340	4	1	9	127	15	518
CEUTA	Total	4	123	.	.	3	28	16	174
MELILLA	Total	9	55	.	2	2	15	5	88
OTROS PAÍSES	Total	84	84	1	5	2	40	26	242
TOTAL		11307	48370	821	389	946	13607	3923	79363

Homo/bisex.=Hombres homo y bisexuales; UDVP=Usuarios de drogas por vía parenteral, incluidos hombres homo y bisexuales usuarios de drogas por vía parenteral;Hemoder.=Receptores de hemoderivados; Transfusión=Receptores de transfusiones sanguíneas; Heterosexual=Relaciones heterosexuales de riesgo; Otros/N.C.=No se mencionan exposiciones de riesgo.

Por último, no se ha observado una mayor prevalencia de VIH en parejas atendidas en las unidades de reproducción. Así, Wingfield y Cattel (2010) comunicaron una prevalencia de infección VIH del 0% en 13717 pacientes testados, en parejas que estaba siendo estudiadas por posible esterilidad o estaban a la espera de tratamiento de fertilidad.

1.1.2.1 Mecanismos de transmisión.

Los principios básicos para la transmisión quedaron bien establecidos desde las primeras investigaciones, las principales vías de contagio han permanecido siendo las mismas: parenteral, contacto sexual y madre-hijo. Aunque

todavía existen muchos aspectos desconocidos sobre sus fundamentos biológicos y sobre las variables impredecibles que modifican ocasionalmente los modelos matemáticos predictivos (Pasquau et al., 2003).

Además de en sangre, semen, leche materna y secreciones cérvico-vaginales, han sido aislados virus en otros 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), líquido sinovial (Withrington et al., 1987) y líquido cerebroespinal (Cheng-Mayer and Levy, 1988).

- Transmisión parenteral:

- Uso de drogas vía parenteral: es responsable de una gran parte de los casos de SIDA del mundo occidental de manera directa compartiendo jeringuillas de inyección o de manera indirecta, debido a la transmisión sexual a las parejas de los usuarios de drogas. También se ha descrito la transmisión de VIH sin compartir aguja, cuando se comparte material para preparar la mezcla a inyectar, el agua de la mezcla o el algodón que la filtra (Osmond, 1999). La eficiencia de transmisión es mayor que la de las relaciones sexuales.
- Transfusiones de sangre: las transfusiones efectuadas con sangre contaminadas por el VIH suponen la infección del receptor en más del 60-95% de los casos (Osmond, 1999; Sande et al., 2002). Desde que en 1985 se implantase el análisis de anticuerpos para VIH de todas las muestras de sangre para transferir, el riesgo de infección por transfusión se ha convertido en un riesgo teórico residual. En 1983 un 14,3 % de las pacientes con SIDA se habían contagiado por transfusión sanguínea, en 2009 sólo el 0,2% (Centro Nacional de Epidemiología, 2010).
- Transfusión de derivados sanguíneos: inicialmente provocaron la infección de hasta el 80% de los pacientes con hemofilia A y del 50% de los que tenían hemofilia B. Desde 1984-85 la mejora de los métodos de preparación de estos derivados y la posibilidad de utilizar productos obtenidos por recombinación genética, ha hecho que no se haya producido ningún nuevo caso de infección entre

estos pacientes (Osmond, 1999; Sande et al., 2002). En el caso de los hemofílicos, la transmisión es solo posible por virus libres. Los retrovirus sobreviven al proceso de liofilización (Levy and Fieldsteel, 1982; Levy et al., 1984). En la actualidad los preparados de factor VIII y factor IX son calentados a altas temperaturas (>60°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)

- Trasplantes: los órganos vascularizados de un paciente infectado obviamente podrían transmitir la infección al receptor, lo que ha ocurrido en al menos 75 casos, sobre todo antes de 1985. De nuevo, el despistaje de la infección por el VIH en el donante es el elemento crítico en la prevención. Se ha sabido que muestras no vascularizadas, liofilizadas o tratadas con alcohol, procedentes de donante infectado, no han transmitido la infección (Osmond, 1999; Sande et al., 2002).

- Transmisión sexual: la vía de transmisión predominante en el mundo es la heterosexual, la cual, además, adquiere cada vez mayor relevancia en nuestro medio. Esto se produce a pesar de que la infectividad del VIH por esta vía es baja.

El riesgo de transmisión sexual de VIH de varón a mujer por coito en parejas estables es de 0,001 y en parejas con baja carga viral este riesgo es diez veces menor (Gray et al., 2001). Otros autores, consideran un riesgo de transmisión casi nulo (1:100000) en varones VIH, siempre y cuando la carga viral sérica sea indetectable en los últimos 6 meses, el paciente tenga adherencia total a la terapia antirretroviral y no posea ninguna otra enfermedad de transmisión sexual (Vernazza et al., 2008).

En los primeros años de la epidemia, una vez conocido el vínculo entre la relación sexual y la transmisión del VIH, se puso gran énfasis en evitar nuevas infecciones, recomendándose el uso del preservativo al observarse una disminución de la transmisión del VIH asociada a su uso (Weller and Davis, 2002). Por ello, la atención a la reproducción en las personas con VIH pasó a un segundo plano: por un lado se intentaba disminuir la transmisión de la infección entre las parejas sexuales y, por otro, se “desaconsejaba” el embarazo en las mujeres

seropositivas por el riesgo de transmisión del VIH al niño. Se ha relacionado la transmisión sexual con el número de contactos sexuales no protegidos (Downs and De Vincenzi, 1996), la carga viral plasmática (Pedraza et al., 1999; Quinn et al., 2000; Attia et al., 2009) o las distintas prácticas sexuales y factores del huésped (Seidlin et al., 1993). Se ha descrito también que personas con otras enfermedades de transmisión sexual tienen mayor riesgo de transmisión debido a la mayor presencia de las células inflamatorias en los fluidos genitales (Cameron et al., 1989; Hira et al., 1990; Plummer et al., 1991; Hunter et al., 1994)

La transmisión sexual a la parejas se reduce de forma significativa cuando el miembro seropositivo de la pareja toma TARGA (Hosseinipour et al., 2002; Castilla et al., 2005; Del Romero et al., 2010). Aunque es importante destacar que algunos autores señalan una relajación en la adopción de medidas preventivas asociada a una mayor confianza en los tratamientos de la infección (Hosseinipour et al., 2002).

No todas las parejas serodiscordantes utilizan, de forma habitual, medidas de protección en todas las relaciones sexuales, estimándose que entre el 20-45% de las parejas con VIH mantiene relaciones sin protección con sus parejas sexuales, sobre todo si la pareja es estable (Buchacz et al., 2001; Kalichman et al., 2002; Klein et al., 2003). Aunque el riesgo de transmisión parece ser bajo, no significa que no exista, y la documentación de algunos casos de seroconversión tras relaciones sexuales desprotegidas en parejas que se preparaban para técnicas de reproducción asistida, pone de manifiesto que, antes de cualquier intento reproductivo, las parejas serodiscordantes deben recibir consejo y evaluación por médicos expertos (Sauer and Choi, 2006).

Se han descrito casos de transmisión de VIH mediante inseminación artificial con semen de donante en Australia (Stewart et al., 1985), Canadá y Estados Unidos (Chiasson et al., 1990; Araneta et al., 1995; Wortley et al., 1998), y Alemania (Matz et al., 1998).

- Transmisión vertical: la incidencia de la transmisión vertical varía de entre un 10-40% en países en desarrollo (De Cock et al., 2000; Fordyce et al., 2002) a menos de un 1% en Estados Unidos y Europa (Ostergren and Malyuta, 2006; Birkhead et al., 2010).

La transmisión puede producirse en el útero, durante el parto o a través de la leche materna (Chen et al., 2011). De los niños nacidos de madres positivas para VIH que no siguen tratamiento, alrededor de 15-30% se infectarán durante la gestación y el parto, y otro 5-20% a través de la lactancia materna (Ostergren and Malyuta, 2006). La transmisión en el útero casi siempre ocurre en los últimos tres meses del periodo gestacional, aunque puede ocurrir antes (Lewis et al., 1990). Las partículas virales pueden detectarse en placentas, apoyando la teoría de que la transmisión intrauterina ocurre principalmente a través de la placenta de la madre (Valente and Main, 1990). Una alta carga viral materna está asociada con una mayor tasa de transmisión uterina (Dickover et al., 1996; Garcia et al., 1999) y la infección por bacterias en la placenta, corion y amnios aumenta la transmisión (Wabwire-Mangen et al., 1999; Mwanyumba et al., 2002; Bhoopat et al., 2005). La infección bacteriana puede ayudar al virus a moverse en la cavidad amniótica materna (Fawzi et al., 2001; Mwapasa et al., 2006). Aproximadamente dos tercios de los niños expuestos al VIH adquieren la infección vía intraparto (De Cock et al., 2000). Cuando pasan a través del canal del parto, los neonatos se exponen a la sangre materna y a las secreciones genitales. La carga viral genital, las úlceras genitales y las roturas en la mucosa de la placenta se asocia con la transmisión intraparto (Chen et al., 2005; Drake et al., 2007). Factores extrínsecos, como una duración prolongada de la rotura de membranas y micro-transfusiones placentarias, se han encontrado asociadas a un aumento de la transmisión intraparto (International Perinatal HIV Group, 2001). Diversos estudios indican que la realización de una cesárea electiva antes del inicio del parto y con membranas íntegras reduce significativamente el riesgo de transmisión, que se limita al 2% (European Mode of Delivery Collaboration, 1999; International Perinatal HIV Group, 1999).

Según Chen et al. (2011), en condiciones ideales las avanzadas técnicas diagnósticas combinadas con la profilaxis antirretroviral y la alimentación de sustitución puede reducir la transmisión de un 30-35% a un 1-2%.

1.1.3 Técnicas de detección del VIH.

El diagnóstico definitivo de la infección por el VIH sólo puede establecerse por métodos de laboratorio, ya que en ningún caso las manifestaciones clínicas son lo suficientemente específicas.

Las pruebas de detección habituales de anticuerpos frente al VIH han experimentado un considerable desarrollo desde su aparición inicial. Básicamente este desarrollo ha afectado, principalmente, al antígeno o antígenos utilizados en el ensayo y al principio técnico en el que se fundamentan dichas reacciones. La mayoría de las primeras técnicas utilizaron antígenos víricos crudos más o menos purificados denominados "lisados víricos". Estos antígenos contenían gran cantidad de proteínas procedentes del sistema celular en el que se había cultivado el virus. La posibilidad de una reacción inespecífica del suero con algunos de estos componentes constituyó un problema que hizo obligado el empleo de pruebas de confirmación. En la Tabla 2 aparecen las principales técnicas de laboratorio para el diagnóstico de la infección por VIH.

Tabla 2: Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de la infección por VIH.

a. Pruebas de screening serológicas.
I. Técnicas inmunoenzimáticas (EIA). <ul style="list-style-type: none"> • EIA indirecto con antígeno obtenido de lisado vírico (EIA 1ª generación). • EIA indirecto o competitivo con antígeno obtenido de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos (EIA 2ª generación). • EIA de tipo sándwich o de inmunocaptura, con antígeno obtenido de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos y detección conjunta de anticuerpos específicos de clase IgG, IgM e IgA (EIA/ELFA 3ª generación). • Detección combinada de anticuerpos específicos y antígeno de VIH (EIA/ELFA 4ª generación). II. Otras técnicas. <ul style="list-style-type: none"> • Aglutinación. • Dot-EIA. • Inmunocromatografía.
b. Pruebas confirmatorias.
I. Western blot. II. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). III. Radioinmunoprecipitación (RIPA). IV. Inmunoensayo lineal (LIA).

La evolución de los antígenos incluidos en las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH ha permitido, por una parte, incrementar la sensibilidad sin merma de la especificidad y por otra, ha hecho posible la detección de anticuerpos frente tipos y subtipos del VIH que escapaban a los equipos de diagnóstico habituales. A pesar de las mejoras introducidas en los equipos actuales, debe tenerse en cuenta la posibilidad real de encontrar sueros de

pacientes infectados por subtipos inusuales del VIH, sobre todo en pacientes africanos o en personas con estancias prolongadas en ese continente.

Respecto al principio técnico que emplean, cabe mencionar que la gran mayoría están basados en el enzimoimmunoanálisis (EIA): indirecto, en sándwich y de captura. Existen EIA competitivos que tienen una gran especificidad aunque adolecen de cierta falta de sensibilidad en algunos momentos de la infección por el VIH, como al inicio de la seroconversión y en los pacientes en estadios terminales. Sin embargo, combinadas con otras pruebas de mayor sensibilidad en forma secuencial, pueden proporcionar excelentes resultados en la estrategia diagnóstica. Estos tipos de pruebas han sufrido también variaciones tecnológicas, siendo una de ellas la utilización de sustratos fluorescentes que han dado lugar a las pruebas denominadas ELFA (enzimelinked fluorescent assay). La última aportación a las pruebas inmunoenzimáticas ha sido la detección simultánea de antígeno p24 y anticuerpos frente al VIH, lo que acorta el período ventana.

Existen pruebas basadas en la técnica de aglutinación pasiva que ofrecen ventajas por su sencillez y simplicidad de ejecución, así como por la posibilidad de realizar titulaciones de forma sencilla. La dificultad de automatización las hace poco adecuadas para procesar gran número de sueros y están menos extendidas. Estas técnicas están diseñadas para detectar tanto anticuerpos de la clase IgG como IgM y en la actualidad son poco utilizadas.

Entre las pruebas de cribado de anticuerpos VIH, las pruebas de Dot-EIA, denominadas pruebas rápidas han experimentado un desarrollo importante; los antígenos que emplean son similares a los EIA y ELFA y el tiempo en el que se puede obtener un resultado oscila entre 5 y 20 minutos. Aunque las características operacionales son inferiores a los EIA y ELFA, deben tenerse en cuenta para situaciones de urgencia. Combinadas con otras pruebas de detección de anticuerpos, constituyen una estrategia que mejora la especificidad de los resultados de forma asequible en términos de costes laborales y de tiempo. Son preferibles aquellas que permiten detectar anticuerpos frente al VIH-1 y VIH-2 de forma separada. Su mayor inconveniente reside en la lectura que siempre es subjetiva y con algunos sueros pueden producirse reactividades que generen dudas de interpretación.

En los últimos años, han aparecido pruebas rápidas basadas en el principio de la inmunocromatografía capilar, que han mejorado de forma importante la sensibilidad y la especificidad de éstas respecto a las de Dot-EIA. Se deben elegir aquellas que tengan controles internos que verifiquen el correcto funcionamiento de la reacción.

La trascendencia de la infección por el VIH hace necesaria la confirmación de los resultados positivos obtenidos en las pruebas de detección primaria de anticuerpos, este paso es inexcusable cuando el objetivo de las pruebas sea el diagnóstico y puede ser obviado cuando aquellas se realizan para seguridad biológica. Sin embargo, en el ámbito hospitalario, es cada vez más frecuente que se confirmen todos los resultados positivos de sueros u otras muestras, incluidas aquellas en las que el objetivo principal no es el diagnóstico. Existen diferentes pruebas de confirmación; entre ellas cabe citar las basadas en los principios de inmunoelectrotransferencia o western blot (WB), de inmunofluorescencia indirecta (IFI), de radioinmunoprecipitación (RIPA) y de inmunoblot con antígenos recombinantes (LIA).

La técnica más ampliamente utilizada para confirmación es el WB. Las técnicas de IFI y RIPA por razones distintas (subjetividad de la lectura, requerimientos de laboratorio, etc.) se emplean cada vez menos, de tal forma que los resultados de confirmación por WB son considerados el estándar o patrón para confirmar la presencia de anticuerpos frente al VIH.

En lo que respecta a la detección de la viremia plasmática, todas las técnicas para la determinación de CV del VIH-1 están aprobadas para su uso en la Unión Europea y permiten la detección hasta un nivel de 50 copias de VIH por mililitro de plasma, utilizando entre 500 µL y 1 mL de plasma. Las diferencias técnicas fundamentales radican en los formatos, tiempos y capacidad de procesamiento. Las nuevas técnicas de Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR) basadas en sondas fluorescentes, son en general más rápidas y permiten rangos dinámicos más amplios ($40\text{-}10^7$ copias/mL) (Tabla 3).

Aunque la determinación de CV en semen, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos no está estandarizada, en ocasiones es necesaria su realización, por ello se

han adaptado estas técnicas para la determinación de la CV en semen, muestras cérvico-vaginales e incluso tejidos (Delgado et al., 2006).

Tabla 3: Técnicas disponibles para la detección de la carga viral plasmática.

Nombre (Compañía)	Técnica
Monitor (Roche)	RT-PCR
Taqman (Roche)	RT-PCR tiempo real
Abbott Real Time (Abbott)	RT-PCR tiempo real
Versant (Bayer)	bADN
NucliSens (BioMerieux)	NASBA

1.1.4 Terapia antirretroviral.

El acceso a la terapia antirretroviral de gran actividad ha cambiado de forma drástica la historia natural de la enfermedad por VIH, pudiendo ser considerada en este momento como una enfermedad crónica más, al menos en los países desarrollados (Gallant, 2000). El objetivo principal de la TARGA, en el momento actual, no es conseguir la erradicación del virus, sino conseguir una repuesta viral sostenida que impida o revierta el deterioro inmunitario de los pacientes y, con ello, el desarrollo de infecciones o tumores oportunistas, la progresión del SIDA y la muerte (Gatell, 1999).

En la actualidad la terapia antirretroviral engloba los siguientes grupos: Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (NRTIs), Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (NNRTIs), inhibidores de la proteasa (IP), inhibidores de la integrasa, inhibidores de fusión y inhibidor de los correceptores CCR5 (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents, 2011).

El número elevado de fármacos antirretrovirales, el hecho de que se usen en combinaciones diversas, y las complejas interacciones entre ellos y otros fármacos, determinan que el manejo de la TARGA sea complejo y especializado.

1.1.5 VIH y reproducción.

1.1.5.1 El espermatozoide y el ovocito como vehículo del VIH.

El papel del espermatozoide como conductor del virus ha despertado controversia. Mediante el uso de PCR in situ, el ADN proviral fue confirmado histológicamente en espermatogonias, espermaticitos y en casos más raros en espermátidas halladas en tejido testicular de los pacientes infectados por el VIH (Nuovo et al., 1994; Muciaccia et al., 1998). Aunque resultados posteriores no confirmaron estos hallazgos (Pudney et al., 1999). Se han encontrado señales aisladas de hibridación de progenoma viral en espermatozoides muertos o inmóviles después de la separación de espermatozoides, pero no en espermatozoides móviles, ya sea utilizando PCR in situ o PCR de alta sensibilidad (Scofield et al., 1994; Quayle et al., 1997). Con el conocimiento actual, no se pudo considerar una asociación entre el VIH y el espermatozoide maduro (Gilling-Smith et al., 2006). Detrás de esta falta de asociación puede encontrarse el hecho de no haberse observado CD4 en la superficie del espermatozoide (Gil et al., 1995).

El VIH no debería tener efecto sobre el ovocito, ya que no se han descrito receptores para VIH ni en las células del cúmulo, ni en la superficie del ovocito (Baccetti et al., 1998). La literatura que relaciona al VIH y al ovocito es muy escasa.

1.1.5.2 Influencia del VIH sobre la fertilidad.

Existen datos que soportan la hipótesis de que la infección por VIH podría tener efectos nocivos sobre la fertilidad (Thackway et al., 1997; Zaba and Gregson, 1998; Gregson et al., 1999). Por otra parte, hasta hace pocos años, las pacientes infectadas por VIH recibían recomendaciones favorables a la esterilización tubárica y a la interrupción voluntaria de la gestación. Estas prácticas han contribuido sin duda a incrementar la prevalencia de la esterilidad en esta población como consecuencia de factores iatrogénicos, no relacionados con la acción biológica del virus.

La fertilidad de los varones infectados por VIH puede verse afectada por una disminución en la función testicular, expresada tanto por la disminución de testosterona, como por el aumento de globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) (Laudat et al., 1995). Ha sido muy debatido el efecto del VIH sobre los parámetros seminales, según los valores de referencia de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999). Algunos autores encuentran que los parámetros seminales de los pacientes con VIH están por debajo de lo establecido (Muller et al., 1998; Dulioust et al., 2002; Nicopoullou et al., 2004; Bujan et al., 2007c), mientras que otros no encuentran diferencias (Semprini and Fiore, 2004; Garrido et al., 2005; Lorusso et al., 2010). En un estudio que incluyó 55 hombres que no recibían tratamiento antirretroviral, los parámetros de semen no se veían afectados durante un periodo medio de 77 semanas (van Leeuwen et al., 2008b). No se encontró efecto adverso en la calidad del semen hasta que el recuento de las células CD4 alcanzaba 200 células/mm³ o el paciente desarrollaba síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Previamente ya había sido descrito el empeoramiento progresivo de los parámetros seminales de los eyaculados de varones infectados a medida que progresa el deterioro inmunológico y la enfermedad clínica (Muller et al., 1998), constatándose reducción en el recuento espermático, la motilidad y el porcentaje de formas normales (Politch et al., 1994; Muller et al., 1998). La aplicación del tratamiento antirretroviral se ha asociado a disminución del recuento de leucocitos presentes en semen y a una mejoría de la calidad seminal (Politch et al., 1994). Aunque también se ha descrito una reducción en el porcentaje de espermatozoides progresivos móviles de un 28% a un 17% durante las 48 semanas de seguimiento en un estudio de pacientes que comenzaba con TARGA (van Leeuwen et al., 2008c) y la disminución del ADN mitocondrial en los espermatozoides de pacientes tratados con Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (NRTIs) (Pavili et al., 2010).

En mujeres infértiles seropositivas para VIH que recibían TARGA, también se ha encontrado esta reducción en el número de copias del genoma mitocondrial en los ovocitos, respecto al grupo control no infectado (Lopez et al., 2008). En un reciente estudio sobre mujeres seropositivas para VIH con deseos de reproducción (Gingelmaier et al., 2011), se observó en un 38% mujeres con fertilidad reducida. Esta disminución de la fertilidad está relacionada con menores recuentos de CD4 y con la progresión de la enfermedad. Y ha sido también descrita por otros autores (Massad et al., 2004; Coll et al., 2006). Hay cierta controversia acerca de si el VIH

podría tener cierta relación con mayores tasas de anovulación y de menopausia temprana (Semprini et al., 2008). Otros factores, asociados con cierta frecuencia a la infección por VIH, tienen efectos negativos conocidos sobre la fertilidad masculina y femenina. Entre ellos cabe citar el abuso de sustancias como el alcohol, marihuana, cocaína y opiáceos (Harlow et al., 2003).

1.1.5.3 Efecto de la infección VIH sobre la gestación y resultados obstétricos.

La infección VIH parece tener un efecto negativo sobre la gestación como consecuencia de condiciones subyacentes a la propia infección, o de su tratamiento. Un metaanálisis destinado a evaluar este aspecto sugiere que la infección por VIH, especialmente en fases avanzadas, incrementa el riesgo obstétrico, y en concreto la probabilidad de parto pretérmino, bajo peso al nacimiento, crecimiento intrauterino retardado y aborto espontáneo (Brocklehurst and French, 1998). Existe cierta controversia acerca de si la TARGA y especialmente los fármacos inhibidores de la proteasa se asocian con un mayor riesgo de partos prematuros (Powis et al., 2011), o no (Massad et al., 2004; Kourtis, 2010).

1.1.5.4 VIH y las técnicas de reproducción asistida.

En la actualidad el desarrollo de las TRA (técnicas de reproducción asistida) y de la biología molecular permite a parejas con algún miembro seropositivo para VIH materializar sus deseos reproductivos. Se obtienen buenas tasas de gestación con un riesgo mínimo de transmisión en grupos seleccionados de pacientes, en función de sus características clínicas inmunológicas y biológicas. Durante muchos años la inseminación con semen de donante era la única opción para conseguir una gestación segura en esta situación, sin embargo muchas parejas no la aceptaban (Ohl et al., 2003). Desde que se realizó la primera inseminación con semen lavado en 1992 (Semprini et al., 1992) se han realizado muchos trabajos que muestran la seguridad del lavado de semen (Tabla 4). El lavado de semen y las TRA han sido propuestas a las parejas con varón seropositivo para VIH como opción para minimizar la posibilidad de transmisión durante los intentos de concepción (Semprini et al., 2004). La combinación de las TRA con la detección rutinaria de carga viral en la muestra de semen, reduce el riesgo de transmisión significativamente logrando, en la mayoría de los casos, buenas tasas de

gestación (Tabla 5 y Tabla 6). En estas parejas, no se ha observado un efecto negativo sobre el desarrollo embrionario (Melo et al., 2008).

En mujeres seropositivas para VIH sometidas a TRA se ha descrito un menor potencial reproductivo, con menores tasas de gestación, mayores tasas de cancelación y necesidad de mayores dosis de gonadotropinas para ser estimuladas (Semprini et al., 2008). No se ha descrito menor calidad embrionaria en estas mujeres (Terriou et al., 2005).

En Europa existe una asociación de centros sin ánimo de lucro CREAThE (Centres for Reproductive Assisted Techniques for HIV in Europe) que tiene como objetivo principal mejorar la asistencia reproductiva que se ofrece a parejas serodiscordantes para VIH.

Tabla 4: Estudios que realizan lavado de semen con detección post-lavado de carga viral VIH (Vitorino et al., 2011).

Estudio	Parejas (n)	Técnica de testaje de carga viral en semen	Positividad del semen lavado
Semprini et al., 1992	29	Anticuerpo Monoclonal VIH	0%
Lee et al., 2001	16	RT-PCR	0%
Bujan et al., 2004b	56	PCR, RT-PCR	0%
van Leeuwen et al., 2005	20	-	0%
Kowalska et al., 2005	13	-	0%
Chu et al., 2005	92	-	0%
Manigart et al., 2006	38	RT-PCR	0%
Bujan et al., 2007b	84	PCR, RT-PCR	0%
Marina et al., 1998b	63	PCR, RT-PCR	5,6%
Marina et al., 2002	243	PCR, RT-PCR	2,5%
Garrido et al., 2004	91	PCR anidada, PCR	7,7%
Savasi et al., 2007	741	PCR Tiempo Real	4,0%
Nicopoulos et al., 2010a	151	PCR	3,7%

En todos los estudios el lavado consistió en: gradiente de densidad + swim-up.

Tabla 5: Resultados de inseminación intrauterina y seguridad de la técnica en parejas con varón seropositivo para VIH (Vitorino et al., 2011).

Estudio	Parejas (n)	Ciclos (n)	Gestación por ciclo (%)	Gestación acumulada (%)	Tasa de aborto (%)	Seroconversión
Semprini et al., 1992	29	59	-	28,8	29,4	No
Marina et al., 1998b	63	101	30,7	49,2	9,6	No
Veiga et al., 1999	64	155	20,6	50,0	9,3	No
Lee et al., 2001	16	27	-	25,0	-	No
Marina et al., 2002	233	458	25,3	49,7	8,6	No
Bujan et al., 2004b	56	213	17,4	66,1	18,9	No
van Leeuwen et al., 2005	20	76	13,0	50,0	20,0	No
Kowalska et al., 2005	13	49	14,3	53,8	42,8	No
Manigart et al., 2006	25	68	14,7	40,0	14,3	No
Savasi et al., 2007	581	2400	19,0	78,0	12,0	No
Bujan et al., 2007b	84	294	18,0	63,1	17,0	No

Tabla 6: Resultados de ICSI y seguridad de la técnica en parejas con varón seropositivo para VIH (Vitorino et al., 2011)

Estudio	Parejas (n)	Ciclos (n)	Tasa de fecundación (%)	Gestación por ciclo (%)	Ovocitos (media)	Embriones transferidos (media)	Gestación acumulada (%)	Tasa de aborto (%)	Seroconversión
Veiga et al., 1999	11	16	76,2	26,6	13,1	2,9	36,4	0	No
Marina et al., 2002	40	58	-	49,7	-	-	67,5	18,5	No
Sauer and Chang, 2002	34	55	-	45,4	15,8	3,4	73,5	20,6	No
Peña et al., 2003	61	113	-	38,1	17,1	3,5	50,8	25,7	No
Garrido et al., 2004	18	-	72,0	40,1	13,0	2,6	-	-	No
Chu et al., 2005	92	146	-	34,6	-	-	58,7	-	No
Mencaglia et al., 2005	25	-	50,2	-	9,6	2,5	50,2	-	No
Chu et al., 2006	78	-	71,0	47,0	-	-	-	-	No
Manigart et al., 2006	20	62	50,0	17,7	8,0	4,0	55,0	33,3	No
Savasi et al., 2007	160	288	78,0	23,0	8,0	2,0	41,0	-	No

1.2 Virus de la Hepatitis C.

1.2.1 Etiología.

1.2.1.1 Características generales.

El virus de la hepatitis C (VHC) fue identificado en 1989 como el agente causante de la hepatitis parenteral no A no B. El virus de la hepatitis C fue el primer virus identificado enteramente mediante el uso de técnicas moleculares, evitando cultivar el virus en tejido o infectar pequeños animales de laboratorio. Los genomas completos de varias cepas de VHC han sido posteriormente clonados y secuenciados. La hepatitis C es la principal causa de hepatitis aguda y enfermedad hepática crónica, y puede conducir a cirrosis y carcinoma hepatocelular (Elder et al., 2005).

1.2.1.2 Estructura del VHC.

El virus de la hepatitis C es un virus pequeño (55-65 nm) perteneciente a la familia Flaviviridae. Presenta una serie de genotipos, subtipos y cuasiespecies (Shepard et al., 2005). Está envuelto por una bicapa lipídica que proviene de las membranas del hospedador, en la que se encuentran las proteínas E1 y E2. La cápsida proteica de forma icosaédrica, mas internamente, protege al genoma.

1.2.1.3 Genoma.

El genoma de VHC es una sola cadena de ARN con polaridad positiva. Dicha molécula contiene un marco de lectura abierto único, que codifica para una poliproteína precursora de alrededor de 3010-3037 aminoácidos (Grakoui et al., 1993). Las proteínas estructurales que forman las partículas virales son: core, E1 y E2. Dichas proteínas están separadas de las no estructurales por un pequeño péptido de membrana, denominado p7 (Griffin et al., 2005). A continuación se encuentran las no estructurales: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Takamizawa et al., 1991).

El VHC presenta una gran heterogeneidad en su genoma, característica de la mayoría de los virus de cadena simple (Abe et al., 1992). Esta notable diversidad genómica puede ser explicada en primer lugar, por la alta tasa de

errores de la ARN polimerasa dependiente de ARN, ya que la misma no posee función correctora. Esta es considerada la razón principal para la generación de secuencias de gran diversidad en el genoma viral, las cuales conllevan la existencia de una población de cuasi-especies en un mismo individuo, con genomas virales que difieren entre un 1-5% en su secuencia nucleotídica. Parece haber más de 30 genotipos de VHC, que se han reclasificado en seis (1-6) con variación en su secuencia nucleotídica entre un 30 y un 50% (Hijikata et al., 1991; Kato, 2001).

1.2.1.4 Replicación.

El virus de la Hepatitis C se replica principalmente en los hepatocitos (Sugano et al., 1995), aunque se ha detectado genoma y antígenos virales en otras células del hígado, entre las que se incluyen las células de Kupffer y las células endoteliales (Blight et al., 1994). Otros estudios han demostrado que el virus puede replicarse en células mononucleadas de sangre periférica (linfocitos T y linfocitos B), en células polimorfonucleadas (en este caso monocitos), en células de los nódulos linfáticos y en células epiteliales del tracto gastrointestinal y de cerebro (Deforges et al., 2004; Forton et al., 2004). El ciclo de vida consiste en la unión a un receptor de la superficie celular y su internalización, una vez en el citoplasma de la célula hospedadora se produce la liberación del ARN viral y la traducción mediada por IRES (sitio de reconocimiento ribosomal). Una vez traducido, se produce el procesamiento de la poliproteína por proteasas celulares y virales, y la replicación del ARN, para su posterior ensamblaje y empaquetamiento. Cuando el virión este maduro será liberado de la célula huésped.

Entre los posibles receptores para la internalización del virus a la célula se encuentran: la proteína CD81 (Pileri et al., 1998), el receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI) que es el receptor de la lipoproteína de alta densidad y el receptor de lipoproteína de baja densidad (Nielsen et al., 2006), las lectinas de tipo C: L-SIGN y DC-SIGN (Cormier et al., 2004), ambas expresadas en las células endoteliales hepáticas y las células dendríticas respectivamente, el heparán sulfato presente en los glucosaminoglicanos de la superficie celular (Barth et al., 2003), el receptor de asialoglicoproteína (Saunier et al., 2003), y la proteína claudina-1 que forma parte de las uniones estrechas presentes en las células hepáticas (Evans et al., 2007). Hay trabajos que indican que el CD81 y el SR-BI se encuentran asociados a

balsas lipídicas ricas en colesterol, sugiriendo que la presencia de este lípido es crítica para la infección por el virus (Cherukuri et al., 2004).

1.2.2 Epidemiología.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor de 130-170 millones de personas, el 3% de la población mundial, puede estar infectada por la hepatitis C, aunque la mayoría puede estar clínicamente asintomática. El VHC infecta cada año a 3-4 millones de personas con distribución mundial.

En una revisión (Touzet et al., 2000) el Grupo Colaborativo Europeo para la Investigación de la Hepatitis C, analiza datos epidemiológicos sobre la infección por VHC procedentes de estudios elaborados en siete países de la Unión Europea, entre los que se incluye España. Este estudio describe una tasa global de seropositividad entre aspirantes a donante de sangre del 1%, con un rango del 0,04 al 2%. Asimismo, se identificó un gradiente geográfico determinado por aumento de la seroprevalencia en sentido norte-sur. La positividad serológica en pacientes sometidos a hemodiálisis varió entre el 20 y el 30%, y en los pacientes adictos a drogas por vía parenteral se encontraba en torno al 80%. La incidencia en pacientes transfundidos se redujo por debajo del 1% a partir de 1991.

La prevalencia de infección VHC, mediante detección de anticuerpos anti-VHC (no todos los pacientes eran positivos a la detección de ARN viral mediante PCR) en parejas que estaba siendo estudiadas por posible esterilidad o estaban a la espera de tratamiento de fertilidad fue de 0,001% en 13717 pacientes testados (Wingfield and Cottell, 2010).

A pesar de que las vías de transmisión de la infección por VHC están bien establecidas, en un 30% de los individuos con viremia existe dificultad para identificar una fuente de infección probable (Neuspiller et al., 2000). La infectividad potencial de fluidos orgánicos de pacientes infectados por VHC ha sido objeto de diversos estudios, que confirmaron la identificación del agente en leche materna y calostro (Hunt et al., 1997), líquido ascítico o saliva (Mastromatteo et al., 2001) y líquido folicular (Devaux et al., 2003).

1.2.2.1 Mecanismos de transmisión.

El mecanismo principal de transmisión es parenteral, ya que el riesgo de transmisión vertical y horizontal se considera muy bajo.

Los grupos de población más expuestos a la transmisión parenteral son los receptores habituales de sangre y hemoderivados, los enfermos renales sometidos a hemodiálisis y los toxicómanos por vía parenteral. Otros colectivos con menor riesgo de contraer la infección son los trabajadores sanitarios, los compañeros sexuales de adictos a drogas por vía parenteral, y los portadores de tatuajes o piercing realizados sin garantías de higiene (Liddle, 1996; Alvarado-Ramy et al., 2001; Mohsen, 2001).

El contagio sexual se ha considerado poco relevante epidemiológicamente, ya que el riesgo de adquisición de la infección por esta vía parece situarse en torno al 5% (Dienstag, 1997). No obstante, resulta difícil establecer la importancia de esta vía de transmisión de manera fiable, ya que la mayoría de los estudios señalan la posibilidad de que los pacientes nieguen el antecedente de contactos sexuales de riesgo como posible fuente de contagio, o que se superpongan factores de riesgo de transmisión por vía parenteral (Dienstag, 1997; Salleras et al., 1997). Un estudio de casos y controles realizado en España estudió los factores asociados a la seropositividad frente a VHC en un grupo de mujeres gestantes. Aunque la frecuencia de diversos antecedentes considerados como prácticas de riesgo era más elevada en el grupo de pacientes seropositivas, sólo tres factores se mostraron significativamente asociados a la seropositividad tras el análisis multivariante: adicción a drogas parenterales, hemoterapia previa, e historia de contactos sexuales con compañeros distintos del habitual sin protección con preservativo (Salleras et al., 1997).

El riesgo de transmisión vertical del VHC descrito en la literatura varía ampliamente en función del tipo de población estudiada y de las pruebas diagnósticas aplicadas. En general, dicho riesgo se considera muy inferior al de transmisión vertical del virus de la hepatitis B, como consecuencia de la menor carga viral presente en el plasma materno (Hsu et al., 1991; Fried et al., 1992; Chang, 1996). El riesgo de transmisión en la población general oscila entre el 0 y el 18%, y según algunos estudios, se eleva al 6-36% en pacientes seropositivas frente a VIH (Hershow et al., 1997; Hunt et al., 1997). Otros autores no han

encontrado diferencias en las tasas de transmisión relacionadas con el tipo de parto, la lactancia o la coinfección por VIH (Conte et al., 2000). Un estudio pone de manifiesto la ausencia de transmisión vertical del virus en pacientes seronegativas para VIH, incluso con replicación activa de VHC. Otro estudio sobre factores moleculares de riesgo en la transmisión perinatal concluye que la negatividad de ARN viral en plasma materno excluye la posibilidad de transmisión, aun en presencia de anticuerpos anti-VHC, por el contrario, el riesgo de transmisión aumenta significativamente a partir de una carga viral igual o superior a 10^6 copias/mL (Ohto et al., 1994).

En la actualidad, los datos disponibles sobre la transmisión vertical del virus sugieren que el riesgo puede considerarse bajo, excepto en pacientes con altas tasas de viremia, que deberían ser identificadas previamente y sometidas a consejo preconcepcional (Duffaut and Valla, 1997).

La posibilidad de propiciar la transmisión horizontal de la infección a través de los procedimientos desarrollados en los laboratorios de reproducción asistida continúa generando controversias, basadas en la inexistencia de estudios suficientemente amplios, y en la publicación de casos de contaminación viral originada inequívocamente en los laboratorios de fecundación in vitro (Lesourd et al., 2000).

1.2.3 Técnicas de detección del VHC.

En 1989 surgieron los primeros ensayos capaces de detectar anticuerpos frente al VHC. Desde entonces han evolucionado a lo largo de tres generaciones, mejorando progresivamente su sensibilidad y especificidad. Actualmente, suelen utilizar antígenos sintéticos o recombinantes, dado que el virus no ha podido ser aún cultivado a altos títulos. Su aparición se retrasa entre 4 y 6 semanas, aunque puede retrasarse más en casos puntuales. Durante ese período de “ventana serológica”, la detección de anti-VHC será negativa, por lo que la negatividad de esta prueba en una muestra única no descarta la infección. La presencia de anti-VHC en suero indica contacto previo con el virus, pero no es, en sí misma, suficiente para establecer el diagnóstico de infección crónica. Además, en pacientes con inmunodeficiencias en la respuesta humoral y en pacientes en hemodiálisis, la negatividad para anti-VHC no excluye totalmente la infección. Las pruebas confirmatorias anti-VHC se han de considerar como pruebas

confirmatorias de la presencia de anticuerpos y no necesariamente de infección activa. La confirmación de infección en curso, ya sea aguda o crónica, se realiza detectando ARN del virus mediante pruebas de amplificación genómica. Su negatividad en una muestra puntual no descarta la infección crónica, ya que la viremia puede ser intermitente. Durante el periodo ventana, estas u otras pruebas de detección directa del virus proporcionan el diagnóstico de la infección cuando las pruebas de detección de anticuerpo son aun negativas o arrojan resultados indeterminados. Existen también pruebas de genotipificación y serotipificación que se utilizan para determinar el genotipo vírico que causó la infección (Delgado-Iribarren et al., 2004).

1.2.4 Tratamiento.

El tratamiento actual de los pacientes con hepatitis C crónica es el interferón pegilado y la ribavirina. La duración del tratamiento depende del genotipo del virus, siendo necesario mayor tiempo de tratamiento para conseguir una respuesta viral sostenida. Existen pacientes no respondedores al tratamiento actual, en los que se ha ensayado dosis más altas y tiempos más prolongados, aunque para gran número de ellos no hay otra opción que esperar una nueva generación de fármacos. Se está evaluando realizar un tratamiento de mantenimiento con dosis bajas de interferón, en estos casos, para prevenir la cirrosis y/o el hepatocarcinoma (Diago, 2008).

1.2.5 VHC y reproducción.

1.2.5.1 El espermatozoide y el ovocito como vehículo del VHC.

El genoma del VHC al ser ARN y sin actividad transcriptasa inversa no puede integrarse en el ADN de gametos y embriones (Steyaert et al., 2000)

El virus de la hepatitis C ha sido detectado en semen, generalmente con una carga viral baja. Las tasas de detección viral en el eyaculado de hombres con viremia sérica difieren significativamente entre el 0% (Semprini et al., 1998; Debono et al., 2000) y el 57% (Tang et al., 1996). Estas diferencias existentes pueden ser explicadas, según algunos autores, como consecuencia de las diferencias en los procesos de obtención, almacenamiento y procesamiento de las muestras y en la sensibilidad entre los métodos de PCR empleados por los distintos laboratorios (Levy et al., 2000).

Muestras seminales positivas para la detección viral son negativas una vez fraccionadas mediante centrifugación en gradientes de Percoll (McKee et al., 1996). La Tabla 7 muestra resultados de los estudios más relevantes que han realizado detección de VHC en semen.

Tabla 7: Detección de VHC en semen.

Autor	Prueba de detección	Resultado	Población
Terada et al., 1992	PCR PCR anidada	Negativa	6 virémicos
Hsu et al., 1991	PCR PCR anidada	Negativa	19 virémicos
Fried et al., 1992	PCR PCR anidada	Negativa	14 virémicos
Liou et al., 1992	PCR PCR anidada	Positiva (24%)	34 virémicos
Fiore et al., 1995	PCR	Positiva	
McKee et al., 1996	PCR	Positiva Negativa tras Percoll	
Tang et al., 1996	PCR	Positiva (57%)	7 virémicos
Caldwell et al., 1996	PCR	Negativa	12 virémicos
Semprini et al., 1998	PCR	Negativa en células redondas, espermatozoides y plasma seminal	90 ADVP infectados
Hollingsworth et al., 1998	PCR	Negativa	8 virémicos (coinfectedos con VIH)
Pasquier et al., 2000	PCR	Positiva (20%) Negativa tras swim-up	16 virémicos (coinfectedos con VIH)
Debono et al., 2000	PCR Western blot	Negativa	25 virémicos
Levy et al., 2000	PCR Detección de inhibidores	Positiva (5%) Negativa tras Percoll	39 virémicos
Leruez-Ville et al., 2000	PCR	Positiva (30%)	

En mujeres seropositivas para VHC se ha detectado ARN viral en 89% de los líquidos foliculares y en el 25% de los medios de cultivo de los ovocitos en día 1. Esta carga viral fue indetectable después de lavados sucesivos y cambio de

medio de los ovocitos (Devaux et al., 2003). También ha sido detectado material genético viral asociado a ovocitos de zona pelúcida intacta, que se cree que pueden provenir de contaminación con líquido folicular (Papaxanthos-Roche et al., 2004).

1.2.5.2 Influencia del VHC sobre la fertilidad.

Se ha sugerido que la infección por hepatitis C crónica puede alterar los parámetros seminales y los perfiles hormonales reproductivos (Durazzo et al., 2006; Safarinejad et al., 2010). Mientras que unos autores describen peor calidad seminal en hombres seropositivos para VHC (Durazzo et al., 2006; Moretti et al., 2008; Lorusso et al., 2010; Hofny et al., 2011), otros autores encuentran resultados comparables en las características seminales de hombres seropositivos para VHC frente al grupo control (Garrido et al., 2005).

En mujeres seropositivas para VHC con cirrosis se ha referido que pueden tener unos mayores niveles estrogénicos, independientemente de la gravedad de la enfermedad, además estas pacientes pueden tener también alterado el metabolismo de la progesterona (Brown et al., 1964). Estas alteraciones en los niveles estrogénicos y en el metabolismo de la progesterona, relacionados con la replicación del VHC, podrían afectar a la fertilidad y a la concepción (Englert et al., 2004; Englert et al., 2007).

De igual modo que el VIH, el VHC se ha asociado por algunos autores a una alteración ovárica en las mujeres, lo que se pone de manifiesto por un aumento de los ciclos cancelados, menores niveles de estradiol y ovocitos recuperados y una mayor dosis de gonadotropinas administradas en ciclos de FIV/ICSI (Newell and Pembrey, 2002; Englert et al., 2004).

Sin embargo, otros autores han descrito que en mujeres con hepatitis C activa crónica no se ha observado afección del desarrollo folicular (Sifer et al., 2002).

1.2.5.3 Efecto de la infección VHC sobre la gestación y resultados obstétricos.

La hepatitis C no parece tener un curso distinto en mujeres gestantes, ni tener un efecto negativo sobre el embarazo (Smith, 2005). Un estudio (Jabeen et

al., 2000) siguió a un grupo de 36 mujeres infectadas con VHC tipo B durante 20 años, un 55% tenían alteraciones bioquímicas y un 42% fibrosis hepática, hubo un total de 100 gestaciones en las que no hubo diferencia de la incidencia de aborto, parto prematuro o necesidad de intervenciones obstétricas frente al grupo control. Tampoco se ha notado efecto sobre el número de anomalías congénitas, complicaciones obstétricas o bajo peso en niños nacidos de madres seropositivas para VHC (Hadzic, 2001)

1.2.5.4 VHC y las técnicas de reproducción asistida.

Los resultados publicados en las técnicas de reproducción asistida no parecen ser muy concluyentes tanto en hombres como en mujeres seropositivos para VHC. Pirwany et al. (2004) encontraron menores tasas de implantación y ninguna gestación en 12 parejas serodiscordantes para VHC (9 hombres y 3 mujeres seropositivas) frente a su grupo control. Por otra parte, Prisant et al. (2010) no encontraron diferencias en las tasas de gestación tanto de hombres como de mujeres seropositivos para VHC, frente a sus controles.

Otros resultados de ICSI en mujeres seropositivas para VHC muestran una peor respuesta ovárica a la estimulación (Englert et al., 2007; Hanafi et al., 2011) y menores tasas de embarazo, con mayor afección en mujeres con viremia positiva, lo cual puede deberse a una alteración hormonal asociada a la cirrosis hepática viral, como ha sido comentado anteriormente. Sin embargo, esta replicación viral no parece afectar a la calidad embrionaria (Hanafi et al., 2011). Otros autores han constatado también que no existe alteración en la calidad embrionaria de mujeres seropositivas para VHC (Sifer et al., 2002; Englert et al., 2007).

1.3 Virus de la Hepatitis B.

1.3.1 Etiología.

1.3.1.1 Características generales.

El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus pequeño (42 nm de diámetro) perteneciente a la familia Hepadnaviridae (Zuckerman, 1996) . Fue descubierto por el médico Baruch Samuel Blumberg en 1963. El virus tiene cuatro serotipos principales (adr, adw, ayr, ayw), con base en los epítopes antigénicos de las proteínas de su envoltura. En total, existen ocho genotipos del virus (A-H) según la

variación en la secuencia de nucleótidos del genoma viral. Los genotipos tienen una distribución geográfica distinta y son útiles para rastrear la evolución y la transmisión del virus. Las diferencias entre los genotipos afectan la severidad y el curso de la enfermedad, así como la probabilidad de complicaciones y la respuesta al tratamiento.

1.3.1.2 Estructura del VHB.

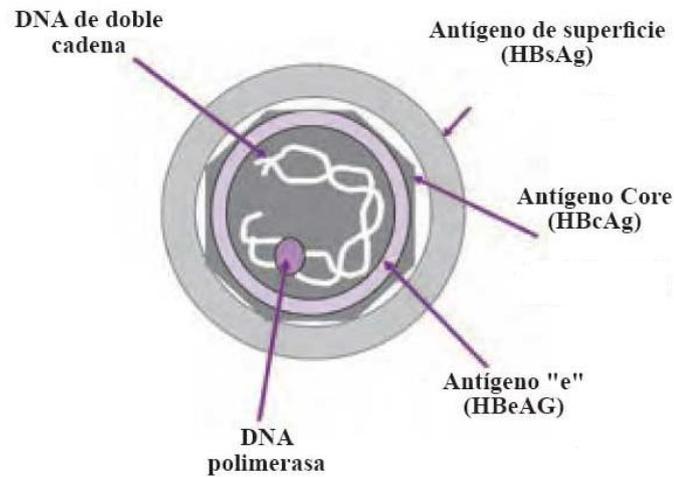
El virus de la hepatitis B tiene una nucleocápside de forma icosaédrica y presenta una envoltura exterior de lípidos. La cápside encierra un ADN viral y una ADN polimerasa con actividad de transcriptasa inversa (Locarnini, 2004). La envoltura exterior contiene proteínas que participan en la unión del virus, y a su entrada en las células susceptibles. El virus es uno de los más pequeños viriones con envoltura, aunque existen formas pleomórficas, incluidos filamentos y cuerpos esféricos que carecen de núcleo (core). Estas partículas no son infecciosas y se componen simplemente de los lípidos y proteínas que forma parte de la superficie del virión, es decir, los antígenos de superficie (HBsAg), estos antígenos se producen en exceso durante el ciclo de vida del virus (Howard, 1986).

1.3.1.3 Genoma.

El genoma del VHB está compuesto de ADN circular, y tiene la peculiaridad de que una de sus cadenas es más pequeña que la otra. El extremo de una de las hebras está asociado con la ADN polimerasa viral. El genoma contiene entre 3020-3320 (la hebra de longitud máxima) y 1700-2800 nucleótidos de longitud (la hebra de longitud mínima) (Kay and Zoulim, 2007).

Hay cuatro genes conocidos codificados por el genoma, llamados *C*, *X*, *P* y *S*. Estos genes se encargan de codificar antígeno de superficie (HBsAg), la proteína del núcleo o core (HBcAg), el antígeno e (HBeAg), la polimerasa (ADN Polimerasa) y la proteína X (Figura 5).

Figura 5: Virus de la hepatitis B con los antígenos de superficie (Cabezas, 2008).



1.3.1.4 Replicación.

El ciclo de vida del virus de la hepatitis B es complejo, aunque es uno de los pocos virus conocidos, con excepción del retrovirus, que utiliza la transcripción inversa como parte de su proceso de replicación. El virus es capaz de dominar la célula hospedadora comenzando por la unión a un receptor en la superficie de la célula y entrando a través de endocitosis. El ADN del genoma viral es transferido al núcleo de la célula huésped. La hebra del ADN que es parcialmente bicatenaria se convierte en doble hélice y se une formando un ADN circular covalentemente cerrado que sirve de matriz para la transcripción de cuatro ARNm virales. El mayor de los ARNm, que es más largo que el genoma viral mismo, se usa para hacer nuevas copias del genoma y las proteínas virales de la cápside nuclear y la ADN polimerasa. Un total de cuatro transcripciones virales se transforman en viriones, que son liberados por la célula o regresados al núcleo y reciclados para producir otras copias virales. El ARNm largo retorna al citoplasma, donde la proteína P del virus sintetiza ADN a través de la actividad de la transcriptasa inversa (Beck and Nassal, 2007).

1.3.2 Epidemiología.

La infección aguda y crónica por el virus de la hepatitis B representa uno de los mayores problemas de salud pública mundiales. Aproximadamente el 5% de población (unos 300 millones de personas) presenta infección crónica por el virus, y constituye el principal reservorio del mismo. Se cree que fallecen anualmente

entre 500.000 y un millón de personas como resultado directo de los trastornos causados por la infección. El virus de la Hepatitis B es 100 veces más infeccioso que el VIH (Everson and H, 2002), y puede sobrevivir fuera del organismo durante 7 días (Bond et al., 1981).

La prevalencia de la infección por VHB y las vías predominantes de contagio varían ampliamente en relación con factores geográficos y socioeconómicos. El 45% de la población mundial reside en áreas de alta prevalencia ($\geq 8\%$ de la población con AgHBs); otro 43% reside en zonas de prevalencia intermedia (2-7% de la población infectada) y solo un 12% en áreas con bajo nivel de endemia ($<2\%$ de la población con positividad frente a AgHBs) (Mahoney, 1999).

Los países que presentan baja tasa de infección (Europa occidental y Norteamérica) se caracterizan por un riesgo de adquisición de la infección menor del 20%, y la mayor parte de los sujetos infectados pertenecen a grupos de riesgo entre los que se incluyen: adictos a drogas por vía parenteral, mujeres y hombres homo y heterosexuales con múltiples compañeros sexuales, compañeros sexuales y convivientes con portadores de VHB, hijos de mujeres portadoras de la infección, personas ingresadas y personal de instituciones para la atención de discapacitados, receptores habituales de hemoderivados, pacientes en hemodiálisis, profesionales sanitarios que tengan contacto con sangre o hemoderivados y personas procedentes de áreas con alta frecuencia de infección y sus descendientes (Centers for Disease Control and Prevention, 1998).

Estudios realizados en España para estimar la prevalencia de la infección en grupos de riesgo describen una tasa de seropositividad del 9 al 11% entre los trabajadores de diferentes centros sanitarios de una ciudad andaluza (Alamillos Ortega and Failde Martínez, 1999). En otro colectivo de riesgo, el de los adictos a drogas por vía parenteral, describe una tasa de infección del 64,4%, con una elevada frecuencia de coinfección con VHC y VIH (49,1%). Los resultados de otro estudio realizado en la población toxicómana penitenciaria informa de tasas de coinfección VHB-VHC del 42,5% y de coinfección VHB-VHC-VIH del 37,3% de los afectados (Pallas et al., 1999). Los principales factores asociados al incremento del riesgo de infección son el nivel socioeconómico bajo y la residencia en el medio urbano (Dominguez et al., 2000).

Por otra parte, la incidencia de la seropositividad frente a AgHBs en pacientes con trastornos de la fertilidad ha sido estimada en un 0,001% (Wingfield and Cottell, 2010).

La estrategia más eficaz en la prevención de la enfermedad consiste en la aplicación de medios de prevención primaria. La inclusión de la vacuna frente al VHB en el calendario vacunal ordinario se está generalizando en los países desarrollados (Navas et al., 1992).

1.3.2.1 Mecanismos de transmisión.

Las vías de contagio más importantes son la transmisión parenteral, el contagio sexual y la vía perinatal.

Existen numerosas evidencias de la excreción viral en semen, saliva, orina, secreciones vaginales, sangre menstrual y leucocitos de pacientes con infección crónica, con capacidad infectiva que persiste después de la negativización de los marcadores plasmáticos de actividad viral (Heathcote et al., 1974; Linnemann and Goldberg, 1974; Alter et al., 1977; Scott et al., 1980; Xiang, 1983; Karayiannis et al., 1985; Fagan et al., 1986; Davison et al., 1987; Jenison et al., 1987).

La infección perinatal, es la forma más frecuente de transmisión en las regiones con alta prevalencia. El riesgo de transmisión materno-fetal en mujeres con hepatitis crónica B es de un 20-30% cuando sólo es positivo el HBsAg y del 80-90% cuando además de éste es positivo el HBeAg o se detecta ADN viral. En el caso de hepatitis aguda el riesgo es menor en el primer trimestre: 10% de los nacidos tendrá positivo el HBsAg si no se administró profilaxis, frente al 90% en el tercer trimestre. La vacunación del recién nacido frente a VHB y una dosis de inmunoglobulina tiene eficacia en la prevención de la infección del 85-95% (Giles et al., 2006).

En los países de baja o media prevalencia, la causa más frecuente de infección es por contacto sexual (Alter and Margolis, 1990). Se ha descrito que la tasa de seroconversión es alrededor de 25% en caso de pacientes con infección crónica por el VHB (Anderson, 2005), aunque la vacunación contra el VHB reduce de forma drástica este riesgo de infección por vía sexual (Mast et al.,

2005). También se han descrito infecciones mediante tatuajes, piercing, acupuntura y diálisis (Goldstein et al., 2002).

La transmisión de la infección por VHB como consecuencia de la aplicación de técnicas de reproducción asistida fue constatada después de la infección de una paciente sometida a inseminación artificial con semen de donante, en el que fue aislado retrospectivamente el AgHBs, también presente en suero (Berry et al., 1987). Este hecho sucedió a pesar de la existencia de conocimientos sobre los riesgos de la utilización terapéutica de semen procedente de donantes no evaluados en relación con el estado de portador del VHB (Mascola and Guinan, 1986). La legislación española establece la obligatoriedad de determinar el estado de infectividad por VHB como parte de los requisitos para la evaluación de candidatos a donantes de gametos y preembriones (Real Decreto 412/1996 de 1 de marzo).

En el tratamiento con técnicas de reproducción asistida a sujetos con infección crónica anterior y con aclaramiento plasmático completo de productos virales, el riesgo se consideraba nulo, hasta la publicación de presencia persistente de ADN viral en el semen de un individuo afectado por infección crónica con detección plasmática negativa del genoma, tras un tratamiento con alfa interferón (Fagan et al., 1986).

1.3.3 Técnicas de detección del VHB.

El diagnóstico definitivo de la infección por VHB es necesariamente serológico, como consecuencia de la falta de especificidad del cuadro clínico. El hallazgo serológico característico de la infección aguda es la detección persistente del AgHBs y de AgHBe, seguido de la aparición de IgM anti-HBc (presente en suero durante unas 36 semanas). Durante el periodo de convalecencia, se produce el aclaramiento plasmático del AgHBs y del AgHBe, y la aparición de anticuerpos específicos anti-HBs, anti-HBc y anti-HBe. El primero es un anticuerpo protector que indica curación e inmunidad frente a la reinfección. También es detectable entre la población vacunada frente al VHB. La presencia de anticuerpos anti-HBc tipo IgM e IgG indica exposición actual o anterior al virus, y replicación viral. La IgG anti-HBc se positiviza muy poco después del contacto con el virus, y permanece de por vida, mientras que la IgM anti-HBc es el marcador más fiable de infección aguda. En pacientes con infección crónica, el AgHBs permanece positivo de forma

generalmente definitiva. El ADN viral puede ser identificado en el suero de pacientes con infección aguda o crónica, siendo la técnica más sensible la cuantificación mediante PCR (Delgado-Iribarren et al., 2004).

1.3.4 Tratamiento.

No se dispone de tratamiento específico para la infección aguda, y la infección crónica puede beneficiarse del tratamiento con alfa-interferón, que puede mejorar las tasas de aclaramiento plasmático del AgHBe desde un 12% en sujetos no tratados hasta un 33% (Wong et al., 1993). El interferón alfa estándar se viene empleando desde hace más de veinte años, en los últimos años se han introducido también el tratamiento con los análogos de nucleósidos o de nucleótidos, primero lamivudina, y después adefovir, dipivoxil y entecavir. Sin embargo, los inhibidores del ADN polimerasa presentan dos grandes problemas: las resistencias (lamivudina) y las pocas respuestas a largo plazo tras la retirada del fármaco. El interferón alfa estándar posee un importante y complejo efecto inmunomodulador, pero su actividad frente al VHB es limitada (Pérez, 2006).

1.3.5 VHB y reproducción.

1.3.5.1 El espermatozoide y el ovocito como vehículo del VHB.

Las primeras publicaciones que ponían de manifiesto la posibilidad de aislar el denominado “antígeno Australia” (HBsAg) en semen y saliva ya invocaban una posible vía seminal para la transmisión de la infección (Buttler et al., 1974; Heathcote et al., 1974; Linnemann and Goldberg, 1974). Los siguientes estudios pusieron de manifiesto la posibilidad de aislar el genoma del VHB en el interior de las células germinales masculinas (Hadchouel et al., 1985; Naumova et al., 1986).

Hay numerosas evidencias de la presencia en semen de marcadores virales, como AgHBs y DNA viral. Todos los estudios describen presencia de virus en el semen en porcentajes variables pero inferiores al 100%. La concentración del genoma viral hallada en semen resultó muy inferior a la plasmática en un estudio cuantitativo realizado con muestras procedentes de 15 homosexuales con infección crónica por VHB (Jenison et al., 1987). La mayor parte de los estudios diseñados para la determinación de la prevalencia de la contaminación viral del semen y otros fluidos orgánicos, se han realizado sobre grupos reducidos de

pacientes con infección crónica conocida. Los resultados de dichos estudios se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8: Detección del VHB en semen.

Autor	Producto viral	Tasa de detección	Población
Ayoola et al., 1980	AgHBs	12%	50 varones (población general Nigeria)
Karayiannis et al., 1985	DNA	62%	21 sujetos con infección crónica.
Hadchouel et al., 1985	DNA	17%	17 infectados (infección aguda y portadores crónicos).
Jenison et al., 1987	DNA	73%	15 varones homosexuales con infección crónica.
Davison et al., 1987	DNA	78%	18 portadores crónicos.
Evans et al., 1988	AgHBs	4%	647 pacientes de una clínica de enfermedades de transmisión sexual.
Worm et al., 1997	AgHBs	10%	332 clientes de prostíbulos.

Las discrepancias observadas en la tasa de detección de VHB en semen se deben a las diferentes técnicas empleadas y a las diferencias entre las poblaciones estudiadas (Hadchouel et al., 1985; Davison et al., 1987; Jenison et al., 1987).

Las espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas y las células de Sertoli muestran señales de hibridación de secuencias genómicas virales (Lang, 1993). Esto sugiere que la infección de VHB en varones puede tener efectos hereditarios, incluso podría producirse transmisión vertical del padre al hijo (Huang et al., 2003). Por lo que algunos autores recomiendan informar a las parejas de esta posibilidad antes de realizarse un TRA (Honeck et al., 2006).

La bibliografía existente que relaciona al VHB y al ovocito describe que en cultivos de ovocitos de ratón, los plásmidos de ADN pueden atravesar la zona pelúcida in vitro e integrarse en el ADN del célula hospedadora (Huang et al., 2005). También se ha detectado ADN de VHB tanto en el núcleo como en el

citoplasma del ovocito en diferentes estados de la infección por VHB (Ye et al., 2006). La presencia de ADN viral tanto en ovocitos como en embriones parece estar relacionado con el nivel sérico de ADN viral, la presencia de HBsAg en el suero y la duración de la enfermedad en la madre (Hu et al., 2011). Aunque los ovocitos parecen ser capaces de integrar partículas virales, son necesarias más investigaciones para poder determinar la posibilidad de transmisión vertical de madres seropositivas VHB a sus hijos (Lutgens et al., 2009).

1.3.5.2 Influencia del VHB sobre la fertilidad.

Aunque no hay mucha literatura disponible, el VHB parece tener efectos adversos sobre la función espermática. Diferentes autores (Vicari et al., 2006; Moretti et al., 2008; Lorusso et al., 2010; Oger et al., 2011; Zhou et al., 2011) describen que los hombres seropositivos para VHB tienen peores características seminales, siendo la motilidad el parámetro más afectado.

No existen datos disponibles sobre la afectación de la función reproductiva por el VHB en las mujeres portadoras (Englert et al., 2004). Recientemente hay autores que refieren que parece improbable que la infección por VHB represente causa de infertilidad, incluso en áreas hiperendémicas (Lam et al., 2010).

1.3.5.3 Efecto de la infección por el VHB sobre la gestación y resultados obstétricos.

No existe consenso acerca de la frecuencia y gravedad de la hepatitis B en la madre (Medhat et al., 1993). Se acepta, no obstante, que en poblaciones normales y bien nutridas es similar al de la no gestante, sin embargo, el riesgo es elevado en poblaciones desnutridas.

No se ha demostrado un mayor riesgo de abortos ni de malformación fetal, sin embargo, sí parece haber un aumento hasta del 14% de partos pretérmino si la enfermedad se padece en el primer trimestre (Levy and Koren, 1991).

1.3.5.4 VHB y las técnicas de reproducción asistida.

Los resultados de la aplicación de técnicas de reproducción en parejas serodiscordantes para VHB no son muy concluyentes. Pirwany et al. (2004) fueron los primeros autores que examinaron los resultados de TRA en 13 parejas

serodiscordantes para VHB, encontrando menores tasas de implantación y gestación respecto del grupo control. Posteriormente otro estudio (Lam et al., 2010), con mayor número de parejas, describió mayores tasas de implantación y de gestación en las parejas serodiscordantes, frente al grupo control. Recientemente Zhou et al. (2011) refirieron peores resultados en tasa de fecundación, tasa de implantación y tasa de gestación en pacientes que se sometían a ICSI, frente al grupo control. Sin embargo, las parejas que se sometían a FIV tenían resultados similares que las parejas control. Y otro estudio (Oger et al., 2011) encontró mayor proporción de bajas tasas de fecundación en parejas sometida a FIV, aunque no existían diferencias significativas en la tasa fecundación ni en la de fallo total de fecundación.

2. Estudio básico de esterilidad y técnicas de reproducción asistida.

Antes de abordar las diferentes opciones reproductivas en las parejas con alguna de las enfermedades infecciosas transmisibles estudiadas (EIT) es necesario describir brevemente los fundamentos del estudio básico de esterilidad y las técnicas de básicas de reproducción asistida.

2.1. Estudio básico de esterilidad.

Es aconsejable realizarlo en parejas con deseos de reproducción que tienen alguna EIT, de tal manera que si se evidencia algún factor que se pueda asociar con una disminución del potencial reproductivo se desaconseje la reproducción natural.

Las tasas de esterilidad según distintos estudios epidemiológicos se sitúan entre un 14-16% de las parejas en edad reproductiva. El 60% de las mismas en edad fértil consiguen quedar gestantes en 6 meses, el 85% en 12 meses y un 90% en 18 meses (Matorras and Hernández, 2007). La fecundidad mensual máxima de una pareja joven, con una mujer menor de 30 años, no es superior al 30% (Edwards and Brody, 1995; Elish et al., 1996).

Se considera que una pareja padece esterilidad si tras 12 meses de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos no queda gestante. Sin embargo, distintos factores asociados podrían ser indicativos para iniciar el estudio básico de

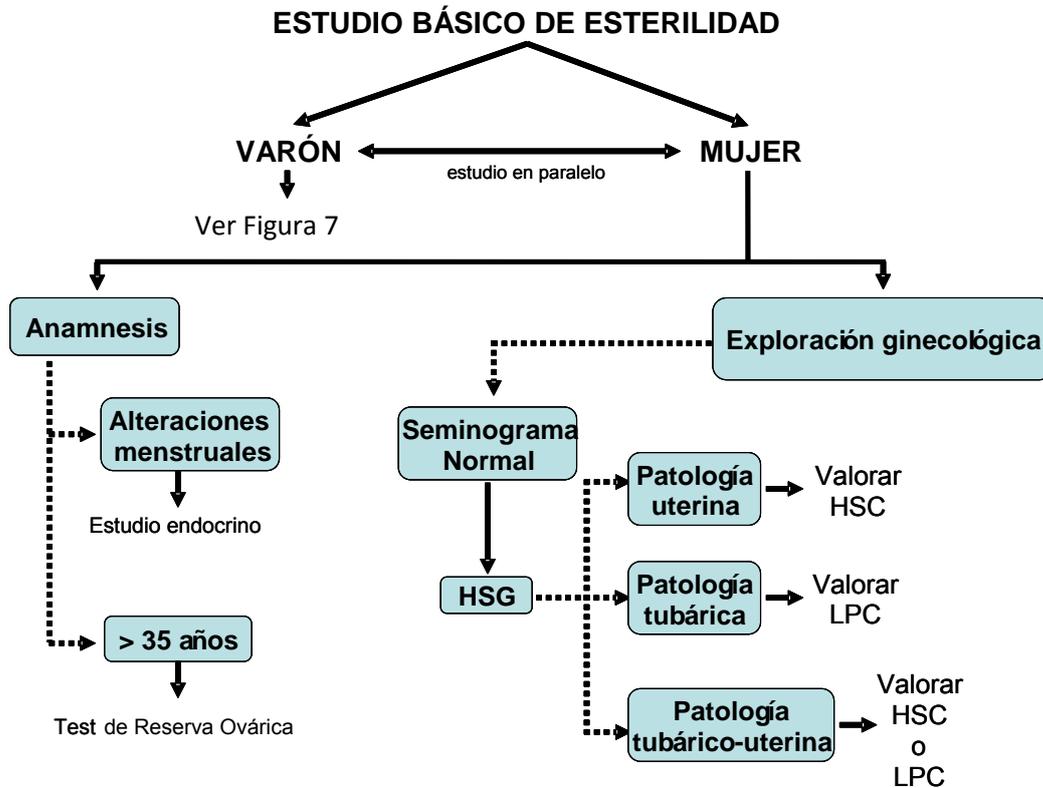
esterilidad a los 6 meses de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos y no obtención de embarazo (más de 35 años en la mujer, anormalidades menstruales, historia de enfermedad pélvica o testicular, endometriosis y cirugías a estos niveles) (WHO, 2010b).

Existe controversia respecto a los términos que se emplean en la literatura para referirse a la esterilidad, infertilidad y subfertilidad. Según algunos autores, infertilidad debe reservarse para aquellas parejas que consiguen quedar embarazadas espontáneamente pero no consiguen un embarazo a término, ya que abortan. El término subfétil lo utilizan algunos autores para referirse a aquellas que no logran gestación tras 12 meses de relaciones, pero que con tratamientos específicos pueden conseguirlo. Por último, el término estéril se refiere a causas definitivas de esterilidad tales como ausencia de útero o de espermatozoides (Remohi et al., 2004). En la mayoría de la literatura en castellano se igualan los términos de subfertilidad y esterilidad.

La esterilidad es una enfermedad de la pareja y, como tal, hay que estudiar a ambos miembros en paralelo (Figura 6). Este estudio básico engloba:

- Anamnesis en ambos miembros de la pareja.
- Exploración ginecológica a la mujer.
- Evaluación tubárica.
- Seminograma al varón.

La evaluación inicial de la esterilidad masculina es simple, y por ello la realización de un seminograma debería preceder cualquier valoración invasiva en la mujer.

Figura 6: Estudio básico de esterilidad.

HSG, histerosalpingografía; HSC, histeroscopia; LPC, laparoscopia.

2.1.1 Anamnesis de la mujer.

En la anamnesis de la mujer deberían cuestionarse y determinarse los aspectos y parámetros que se citan seguidamente.

- Historia médica
 - Identificar otras patologías no ginecológicas pero con repercusión reproductiva.
 - Identificar el consumo de medicamentos, así como de tabaco, alcohol y otras drogas.
 - Determinar el índice de masa corporal y posible sobrepeso para aconsejar programas de adelgazamiento, incluso en pacientes normoovuladoras.

- Medir la presión arterial y realizar analítica general con serologías para investigar inmunización frente a rubeola, aconsejando vacunación en caso de ser negativa. En la actualidad se debate sobre la conveniencia de investigar la inmunidad frente a toxoplasma durante el embarazo, una determinación pregestacional positiva nos permitirá considerar inmunizada a la futura gestante (González, 2001). También debe investigarse o confirmarse el estado serológico frente a lúes, VHB, VHC y VIH.
- Historia familiar
 - Ha de incluir el número de hermanos, los antecedentes de enfermedades de padres y hermanos, especialmente esterilidad y anomalías hereditarias, y la consanguinidad de los padres.
- Historia reproductiva
 - Duración de la esterilidad con la pareja actual y fertilidad previa.
 - Enfermedades de la infancia e historia del desarrollo somático y puberal.
 - Antecedentes quirúrgicos, historia sexual y genitourinaria, incluyendo enfermedades de transmisión sexual y exposición a gonadotoxinas.
 - Antecedentes de patología ovárica.
 - Frecuencia coital y posibles disfunciones sexuales.

La ovulación es un requisito imprescindible para la concepción, y por ello debe investigarse siempre. Los desórdenes ovulatorios suponen, aproximadamente, hasta un 15-25% de las causas de esterilidad (Mosher and Pratt, 1991). Una historia de ciclos menstruales regulares (21-35 días) se correspondería con una correcta ovulación en un 97% de los casos (Magyar et al., 1979).

Las determinaciones de FSH, LH, TSH, prolactina y andrógenos tienen interés en mujeres con desórdenes ovulatorios con objeto de orientar la localización de la patología (prolactina y TSH en patología hipofisaria; FSH y LH

para identificar hipogonadismos hipo o hipergonadotropos, así como criterios diagnósticos de SOP; 17-OH progesterona en hiperplasia suprarrenal; SDHEA y testosterona en hirsutismo) (González et al., 2007).

En mujeres de más de 35 años deberá investigarse la reserva ovárica y realizar un asesoramiento al respecto (Bukulmez and Arici, 2004). Para estudiar la reserva ovárica se pueden utilizar determinaciones ecográficas (recuentos foliculares antrales,...), determinaciones hormonales basales (FSH en día 3) o tests dinámicos como el de clomifeno o el de EFORT (Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test).

En caso de esterilidad secundaria ha de registrarse el tiempo requerido para lograr cada una de las gestaciones previas. Si hay abortos, ha de evaluarse la semana gestacional en la que ocurrieron y el diagnóstico etiológico si lo hubiere.

2.1.2 Exploración ginecológica.

Se realizará exploración ginecológica completa con citología cervical. En caso de sospecha clínica de enfermedades de transmisión sexual, deberán realizarse cultivos y pruebas pertinentes para su confirmación.

2.1.3 Evaluación tubárica.

Si los resultados de la exploración ginecológica y la ecografía vaginal son normales, y el resultado del seminograma también, se debe realizar una histerosalpingografía –HSG- (visualización radiológica de la cavidad uterina y de las trompas, mediante la introducción de un contraste radiopaco a través del cérvix) para evaluar útero y trompas. Antes de la introducción de cualquier medio de contraste en el útero, se recomienda profilaxis antibiótica, debido a que entre un 30 y un 60% de las pacientes con problemas de fertilidad presentan anticuerpos positivos en suero para *Chlamydia tracomatis* (Land et al., 2002).

Si el resultado de la HSG muestra anomalías tubáricas se debe estudiar la presencia de *Chlamydia tracomatis* en el tracto genital femenino mediante estudio serológico de anticuerpos anti-*Chlamydia* o cultivo microbiológico. Si no presenta infección por este microorganismo se puede valorar la realización de una laparoscopia terapéutica, pero si el resultado es positivo se recomienda realizar FIV/ICSI.

Si el resultado de la HSG muestra anomalías intrauterinas se debe recomendar la histeroscopia. Esta técnica permite visualizar la cavidad uterina de forma precisa, tras ser distendida con un medio salino. No obstante, se trata de un método invasivo y costoso, por lo que se reservará para ser realizada con fines terapéuticos (resección de tabique uterino, de pólipo o mioma submucoso). Sólo se realizará con fines diagnósticos cuando la HSG de resultados dudosos.

Si la HSG muestra anomalías tanto en las trompas como en el útero se puede valorar realizar una laparoscopia. Esta técnica deberá realizarse tan solo bajo fuerte sospecha de patología, con objeto de confirmarla e intentar tratarla en el mismo acto quirúrgico (adhesiolisis, quistectomía de endometriomas) (Opsahl et al., 1993; Jacobson et al., 2002).

Algunos hallazgos del estudio básico de esterilidad llevarán a realizar otras pruebas diagnósticas (cariotipo, estudio de fibrosis quística, etc.).

2.1.4 Esterilidad por factor masculino.

El factor masculino está presente, ya sea como factor único o de manera combinada con otro factor, en aproximadamente el 45% de las parejas estériles. La esterilidad masculina puede tener su origen en diversas causas o factores de riesgo que a menudo actúan conjuntamente. Algunas de ellas son identificables (obstrucción de los conductos eyaculadores o hipogonadismo hipogonadotrófico) y otras identificables pero no reversibles (atrofia testicular bilateral secundaria a orquitis urliana). Cuando no resulta posible esclarecer la etiología de la alteración se califica de esterilidad idiopática.

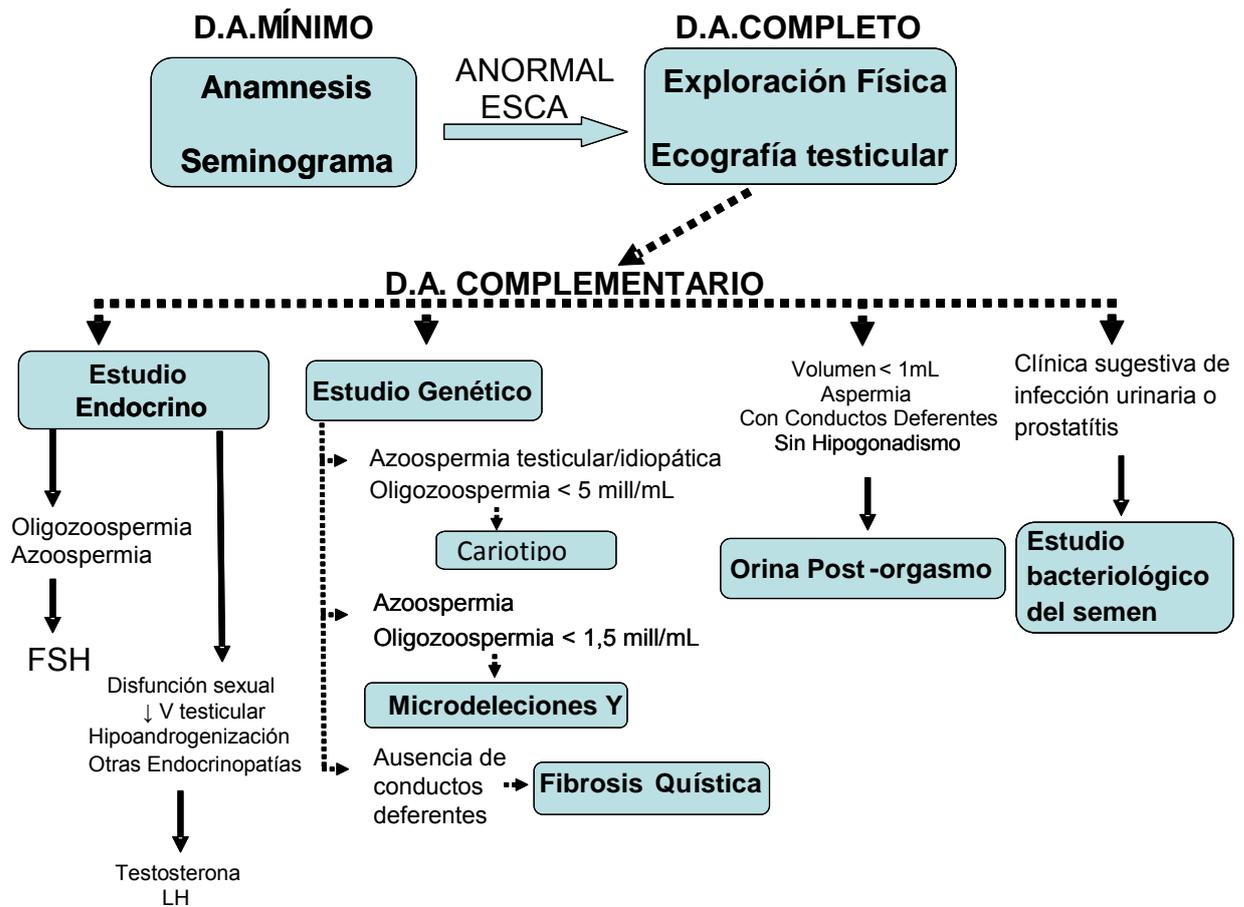
El propósito de la evaluación del varón es la identificación de alteraciones causantes de esterilidad. El tratamiento de las alteraciones reversibles puede incrementar la posibilidad de concepción mediante relaciones naturales o reproducción asistida. La identificación de causas irreversibles y sin posibilidad de tratamiento evita a la pareja la incomodidad de realizar tests diagnósticos inadecuados o intentar terapias ineficaces (Jarrow and Sigman, 1999).

Por tanto, para el estudio de la esterilidad masculina se deben cumplir los objetivos que se describen a continuación.

- Identificar patologías y factores de riesgo que causan esterilidad masculina o que contribuyen a ella (Nieschlag and Behre, 1997).
- Orientar la estrategia terapéutica, tratando o corrigiendo las causas cuando sea posible, o bien proponiendo las mejores alternativas en reproducción asistida (Weidner et al., 2002).
- Identificar anomalías genéticas transmisibles a la descendencia (Shah et al., 2003).
- Identificar patologías relevantes para la salud del varón (Honig et al., 1994).

La evaluación del varón programada y basada en criterios de medicina basada en la evidencia debe ser escalonada, iniciándose con el diagnóstico andrológico mínimo, continuándose con el diagnóstico andrológico completo, y complementándose con aquellos tests o estudios que el clínico recomiende en base a los resultados de la evaluación completa (Figura 7). La evaluación inicial del varón debe incluir la anamnesis y un seminograma (si el resultado del mismo está por debajo de los valores de referencia deberá repetirse transcurridas 1-3 semanas) (Rowe et al., 2000).

Figura 7: Diagnóstico andrológico en el estudio de la pareja estéril.



2.1.5 Anamnesis del varón.

- Historia médica

Se realiza para identificar factores de riesgo y patrones de comportamiento que pueden tener impacto significativo en la esterilidad masculina (desarrollo y pubertad, historia genitourinaria, patologías de riesgo).

- Historia reproductiva
 - Duración de la esterilidad con la pareja actual y fertilidad previa.
 - Enfermedades de la infancia e historia de desarrollo somático y puberal.
 - Antecedentes quirúrgicos, historia sexual y genitourinaria, incluyendo enfermedades de transmisión sexual y exposición a gonadotoxinas (incluyendo altas temperaturas).

- Antecedentes de patología testicular (mal descenso, inflamación, traumatismos).
 - Frecuencia coital y posibles disfunciones sexuales.
- Historia familiar
- Ha de incluir el número de hermanos, los antecedentes de enfermedades de padres y hermanos, especialmente esterilidad y anomalías hereditarias.

En caso de esterilidad secundaria, ha de registrarse el tiempo requerido para lograr cada una de las gestaciones previas. Si hay abortos previos, ha de evaluarse la semana gestacional en la que ocurrieron y el diagnóstico etiológico si lo hubiere. Ha de registrarse el consumo previo y actual de medicamentos y sustancias tóxicas.

2.1.6 Análisis de semen.

Para una correcta realización e interpretación de un análisis de semen, deben tenerse presentes diferentes aspectos previos y posteriores al análisis, así como la utilización de técnicas y criterios reconocidos internacionalmente como los editados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (Kvist and Björndahl, 2002), y aplicar procedimientos de control de calidad interno y externo.

Es importante tener en cuenta que los parámetros clásicos de semen, reflejan el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y nos orientan sobre patologías del sistema genital. Sólo excepcionalmente, como en casos de ausencia total de espermatozoides (azoospermia) o movilidad (astenozoospermia total), predicen la fertilidad de un varón, ya que dichos estados pueden ser transitorios y la esterilidad es un concepto que hace referencia a la pareja.

Los espermatozoides se acumulan en el epidídimo una vez que han sido liberados a la luz de los túbulos seminíferos. Cuando el contenido del epidídimo supera la capacidad del mismo, los espermatozoides rebosan y pasan a la uretra para ser eliminados con la orina (Cooper et al., 1993; De Jonge et al., 2004). La

viabilidad del espermatozoide y de su cromatina se pueden ver afectadas por mayores tiempos de abstinencia sexual, si existe algún trastorno funcional en el epidídimo (Correa-Perez et al., 2004). Por ello es importante conocer el tiempo transcurrido desde la última actividad sexual, recomendándose el análisis de semen tras un período de abstinencia sexual de 2 a 7 días (WHO, 2010b).

Sin embargo, también es importante investigar el período de abstinencia sexual desde la penúltima eyaculación, debido a que el contenido del epidídimo no se vacía por completo tras una eyaculación (Cooper et al., 1993; Amann, 2010).

La OMS, en sus recomendaciones para el análisis de semen, divide las magnitudes biológicas a estudiar en estándares, opcionales y de investigación (Tabla 9).

Tabla 9: Clasificación de parámetros a incluir en un análisis de semen según OMS-10 (WHO, 2010b).

Estándares	Examen macroscópico: licuefacción, viscosidad, aspecto, volumen, pH
	Presencia de agregados y aglutinaciones de espermatozoides
	Movilidad espermática
	Vitalidad espermática
	Número de espermatozoides y otras células
	Morfología espermática
Opcionales	Detección de anticuerpos antiespermatozoide unidos a la superficie espermática
	Índices de defectos múltiples espermáticos
	Técnica inmunocitoquímica para la detección de leucocitos
	Interacción entre espermatozoide y moco cervical
	Análisis bioquímicos del líquido seminal
Investigación	Análisis automático de la movilidad espermática
	Especies reactivas de oxígeno
	Test de unión a zona pelúcida
	Evaluación de la reacción acrosómica
	Test del ovocito de hámster

Un seminograma debe, como mínimo, incluir los parámetros estándares que se han denominado parámetros clásicos de semen: valoración macroscópica (licuefacción, viscosidad, aspecto, volumen, y pH), presencia de agregados y aglutinaciones, movilidad espermática, vitalidad espermática, número de

espermatozoides y otras células, morfología espermática y detección de anticuerpos antiespermatozoide unidos a la superficie espermática, cuyos límites inferiores de referencia se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Límites inferiores de referencia en los parámetros de semen según manual de la OMS-10 de análisis de semen (WHO, 2010b).

Propiedades	Límite inferior de referencia (Intervalo de confianza)
Volumen (mL)	1,5 (1,4 – 1,7)
Movilidad total (progresivos + no progresivos, %)	40 (38 – 42)
Movilidad progresiva	32 (31 – 34)
Vitalidad (vivos, %)	58 (55 - 63)
Nº total de espermatozoides (10^6 /eyaculado)	39 (33 - 46)
Concentración de espermatozoides (10^6 /mL)	15 (12 - 16)
Morfología espermática (normal, %)	4 (3,0 – 4,0)

En función del resultado obtenido en el seminograma se distinguen las patologías que se describen a continuación.

- **Aspermia:** ausencia de semen (o eyaculación retrógrada).
- **Astenozoospermia:** porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite inferior de referencia.
- **Astenoteratozoospermia:** porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y espermatozoides morfológicamente normales por debajo del límite inferior de referencia.
- **Azoospermia:** ausencia de espermatozoides en el eyaculado, definido como el límite inferior de cuantificación por el método de conteo utilizado.

- **Criptozoospermia:** ausencia de espermatozoides en la muestra en fresco y presencia en el botón celular tras centrifugado de la muestra.
- **Hemospermia:** presencia de eritrocitos en el eyaculado (hematospermia).
- **Leucospermia:** presencia de leucocitos en el eyaculado por encima del valor umbral (leucocitospermia, piospermia).
- **Necrozoospermia:** bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado.
- **Normozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado) *, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y espermatozoides con morfología normal igual o por encima del límite inferior de referencia.
- **Oligoastenozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado) * y porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite inferior de referencia.
- **Oligoastenoteratozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado) *, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y espermatozoides con morfología normal por debajo del límite inferior de referencia.
- **Oligoteratozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado) * y porcentaje de espermatozoides con morfología normal por debajo del límite inferior de referencia.
- **Oligozoospermia:** número total de espermatozoides (o concentración, dependiendo del resultado reportado) * por debajo del límite inferior de referencia.

- **Teratozoospermia:** porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales por debajo del límite inferior de referencia.

* Se debe dar preferencia siempre al número total, ya que este parámetro tiene prioridad sobre la concentración

2.1.7 Causas de esterilidad.

Si tras la realización de un correcto estudio de esterilidad, se encuentran alteraciones en la historia clínica, exploración física del varón o análisis de semen, se clasifica como esterilidad por factor masculino.

Ante alteraciones endocrinas femeninas hablaremos de esterilidad por factor endocrino. La HSG y/o ecografía vaginal detectará alteraciones tubáricas o uterinas, constituyendo entonces la esterilidad por factor tubárico (tuboperitoneal) o factor uterino respectivamente. Los factores cervicales son una causa inusual de esterilidad, aunque vaginitis, cervicitis, traumatismos cervicales o cualquier situación que modifique el cérvix pueden tener un impacto negativo en el volumen o calidad del moco cervical y con ello imposibilitar la concepción (Matorras and Hernández, 2007).

No siempre hay una única causa de esterilidad, encontrándose dos o más causas en casi un 30% de los casos (Rantala, 1988).

No obstante, incluso tras la realización de las más sofisticadas pruebas diagnósticas, la etiología de la esterilidad se desconoce en el 15-30% de las parejas estériles (esterilidad sin causa aparente -ESCA-) (Vanrell et al., 1993). En la ESCA de menos de 3 años de evolución y mujer menor de 35 años el pronóstico es bueno, incluso sin tratamiento (ESHRE Capri Workshop Group, 2009).

De manera global, el 35% de las parejas presentan esterilidad de causa femenina (endocrina, tubárica, uterina o cervical) y otro 35% de causa masculina. El 15% presentan alteraciones en ambos miembros de la pareja (esterilidad de causa mixta). Y por último, otro 15% no muestran alteraciones tras el estudio básico de esterilidad (ESCA) (Nicolás et al., 2004).

2.2. Técnicas de reproducción asistida.

El 50% de las parejas estériles resolverán su enfermedad mediante tratamientos médicos adecuados (antibioterapia en caso de infecciones, tratamientos farmacológicos en caso de alteraciones endocrinas leves, cirugía, etc.) o medidas sexuales apropiadas (coito programado, apoyo psicológico, educación sexual, etc.) (González et al., 2007). Aproximadamente el 50% restante necesitará de técnicas de reproducción asistida para obtener una gestación.

La reproducción asistida engloba un conjunto de técnicas encaminadas a facilitar la fecundación del ovocito. Dentro de estas TRA se encuentran la inseminación artificial (IA), la fecundación in vitro (FIV) y la microinyección espermática intracitoplasmática (ICSI). En la mayoría de las técnicas de reproducción asistida es necesario realizar previamente tratamientos para la estimulación de la ovulación en la mujer, pues esto va a permitir aumentar considerablemente la tasa de éxito (ya que en vez de madurar un solo ovocito por ciclo se consigue que maduren varios). El seguimiento de la estimulación ovárica se realiza mediante ecografía ovárica vía vaginal únicamente (inseminación artificial) o acompañado de determinación de niveles séricos de estradiol (FIV/ICSI) (Matorras and Hernández, 2007).

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

- Inseminación artificial conyugal (IAC): inseminación artificial con semen de la pareja.
- Inseminación artificial de donante (IAD): inseminación artificial con semen de donante.

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

En la IAC la muestra de semen se obtiene por masturbación, en el mismo día en que se va a realizar la inseminación. Se recomienda al varón una

abstinencia sexual previa, con el objetivo de maximizar la calidad de la muestra seminal en número y calidad de los espermatozoides. En la IAD el semen se descongela el mismo día de la inseminación, previa asignación del donante, según las características fenotípicas de la pareja (Clavero et al., 2007).

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

Entre las técnicas más utilizadas para seleccionar espermatozoides móviles se encuentran los gradientes de densidad y el swim-up. En pacientes sin EIT se suele utilizar una de ellas previamente a la TRA. Y en el caso de pacientes con EIT se suele realizar primero la técnica de gradiente de densidad y a continuación la de swim-up, denominándose a esta combinación de ambas técnicas lavado seminal (ver sección 2.2.4).

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

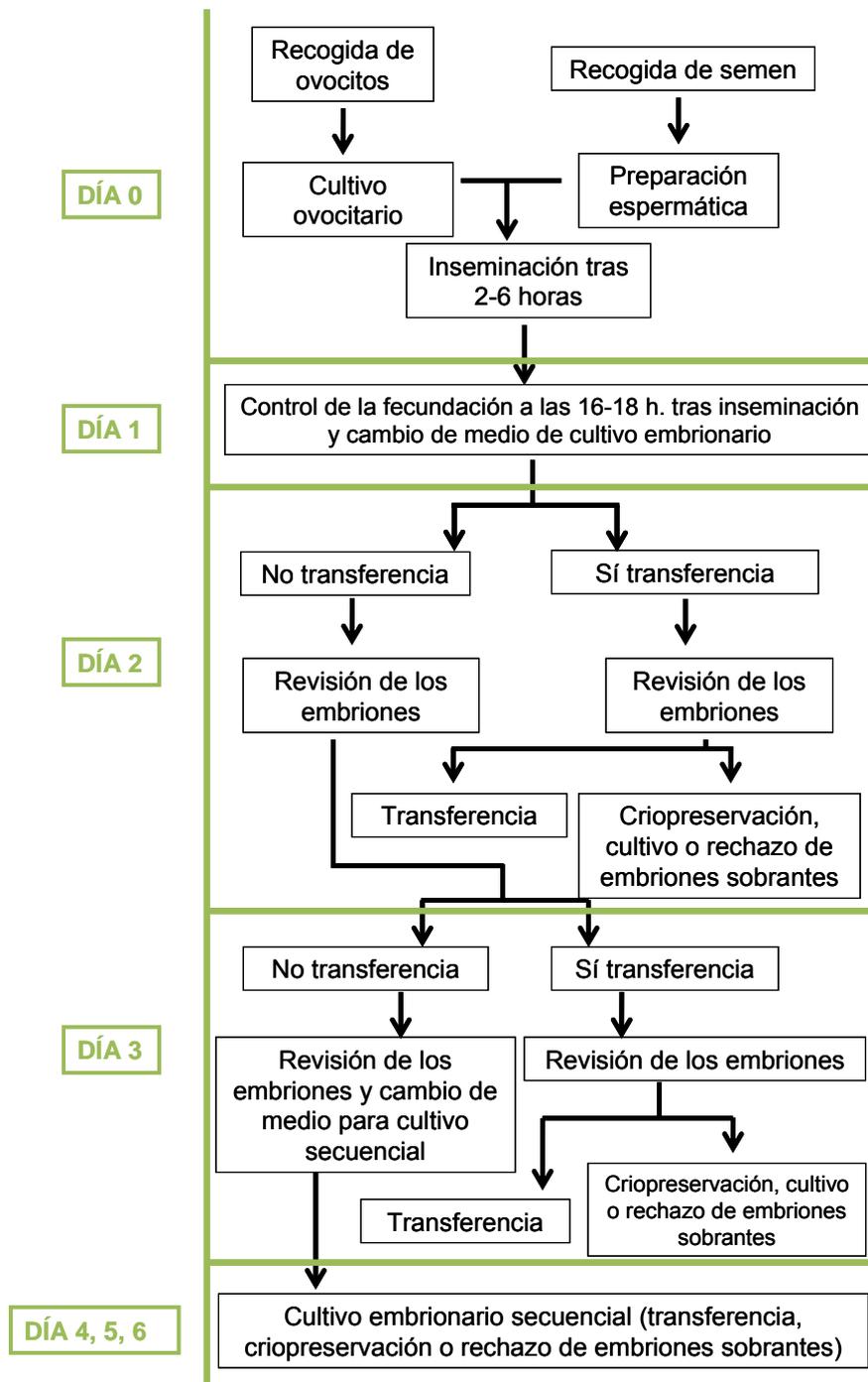
Como se ha comentado anteriormente, para llevar a cabo estas TRA es necesario realizar una estimulación de la ovulación en la mujer. Cuando, tras estimulación, los folículos ováricos ha alcanzado un tamaño de 17 mm se procede a desencadenar la ovulación mediante la hormona gonadotropina coriónica (hCG),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

En función de la técnica que se vaya a emplear, FIV o ICSI, el tratamiento del complejo cúmulo-corona-ovocito será diferente. En la FIV convencional se cultiva cada complejo con los espermatozoides a una concentración determinada, mientras que en ICSI se decumulan los complejos y cada ovocito será microinyectado con un espermatozoide. Al día siguiente se comprueba la fecundación, realizándose la transferencia de embriones al útero dos o tres días después de la punción folicular. Los embriones sobrantes se crioconservan en nitrógeno líquido. En la Figura 8 se esquematizan las diferentes etapas de laboratorio en FIV/ICSI.

En pacientes con fallos repetidos de implantación tras transferencias de embriones de buena calidad, se ha sugerido la realización de transferencia de blastocistos, eclosión asistida o diagnóstico genético preimplantacional con screening de aneuploidías (PGS). Actualmente la indicación de estas técnicas está en revisión, pues no existe evidencia suficiente para recomendarlas. La primera consiste en prolongar el cultivo de los embriones hasta el día+5 de su desarrollo mediante técnicas de cocultivo, con diferentes líneas celulares o utilizando medios de cultivo secuenciales. La eclosión asistida consiste en realizar una apertura en la zona pelúcida del embrión que le facilite su abandono en el proceso de eclosión. Dicha apertura puede realizarse mediante láser, mecánica o químicamente (ácido tyrode) (Aragonés et al., 2004).

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

Figura 8: Etapas de laboratorio en FIV/ICSI.



2.2.1 Evaluación ovocitaria.

La valoración de la calidad ovocitaria se realiza mediante la evaluación de aspectos morfológicos del ovocito previa realización de la ICSI y su correlación con el resultado del ciclo de tratamiento.

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

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

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

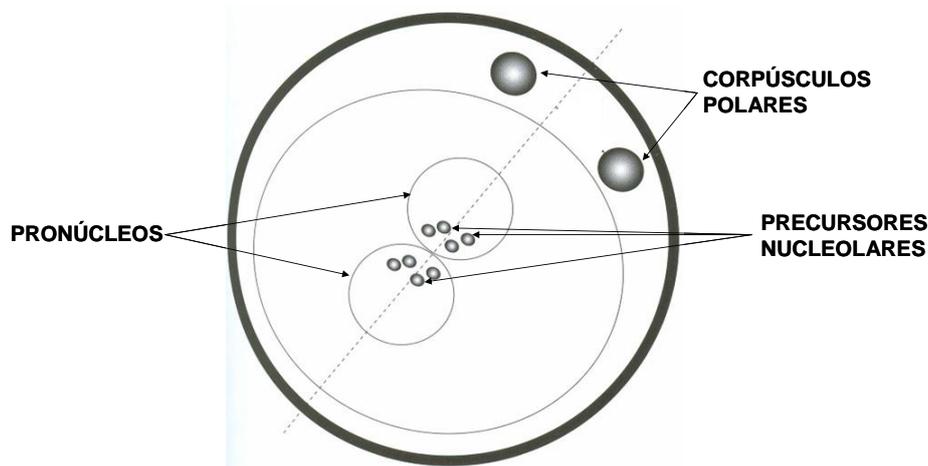
Serhal et al. (1997) y Loutradis et al. (1999) reportaron mayores tasas de embarazo en pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos normales frente a pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos con anomalías citoplasmáticas. Otros autores encontraron menores tasas de embarazo a término en pacientes con ovocitos con citoplasma granuloso (Kahraman et al., 2000).

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

2.2.2 Evaluación del cigoto.

La valoración del cigoto se realiza mediante la evaluación de parámetros morfológicos de los pronúcleos masculino y femenino, así como de sus precursores nucleolares tras 16-18 horas post inseminación mediante FIV o ICSI (Figura 9).

Figura 9: Esquema de un cigoto.



Los acontecimientos que se han podido observar en el ovocito tras una fecundación normal mediante ICSI se describen a continuación. Tras realizar la ICSI, el ovocito muestra “ondas” circulares de granulación en el ooplasma con una periodicidad de 20 a 53 minutos. Durante esta fase de granulación la cromatina del espermatozoide se descondensa. A continuación el segundo corpúsculo polar es extruido y el pronúcleo masculino se forma en la zona central del ovocito. Acto seguido se forma el pronúcleo femenino que migra hacia la zona central del ovocito para encontrarse con el pronúcleo masculino. Ambos pronúcleos aumentan su tamaño y los precursores nucleolares se desplazan por el interior de cada pronúcleo para alinearse y quedar enfrentados.

Los pronúcleos se clasifican en base a la simetría, posición y localización de los mismos y los precursores nucleolares se evalúan también en base al número,

simetría y localización. Otras características observadas para la clasificación del cigoto son la morfología y alineamiento de los corpúsculos polares, la morfología del citoplasma (presencia vs. ausencia de halo citoplasmático) y finalmente una segunda evaluación embrionaria a las 25-27 horas post-inseminación para constatar la presencia o ausencia de los pronúcleos y/o la división temprana.

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

El alineamiento de los pronúcleos y los corpúsculos polares está relacionado con el eje polar de la primera división embrionaria, pudiendo producirse anomalías cromosómicas en el desarrollo embrionario si el alineamiento es incorrecto (Garello et al., 1999).

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

Los estudios que evalúan la división temprana a las 25-27 horas post-inseminación, intentan correlacionar este parámetro con la morfología embrionaria en día+2 y día+3 (Lundin et al., 2001; Ciray et al., 2006), el desarrollo a blastocisto (Neuber et al., 2003), la viabilidad embrionaria (Shoukir et al., 1997; Salumets et al., 2003) y la tasa de implantación (Rienzi et al., 2005; Ciray et al., 2006), pero sus conclusiones son contradictorias.

Numerosos sistemas de gradación pronuclear han sido propuestos (Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999; Ludwig et al., 2000; Wittemer et al.,

2000), pero actualmente no está en uso ningún sistema estandarizado para la gradación del cigoto, ya que el desarrollo pronuclear es un proceso dinámico y excluir un embrión basándose en una observación puntual puede llevar a errores (James et al., 2006). La selección embrionaria será el resultado de la evaluación global del embrión, desde el estadio de cigoto hasta el día de la transferencia.

2.2.3 Calidad embrionaria.

La valoración morfológica del preembrión ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria. Para realizar esta valoración, el embrión se observa en el intervalo de 44-47 horas post inseminación (día+2) y 67- 71 post inseminación (día+3).

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

Número de células y ritmo de división.

La cinética de división embrionaria hace referencia al número de células que se pueden observar en el embrión en sus diferentes estadios de desarrollo. Estos valores esperados quedan reflejados en la Figura 10.

Figura 10: Cinética de división embrionaria esperada en FIV/ICSI.

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

Fragmentación citoplasmática.

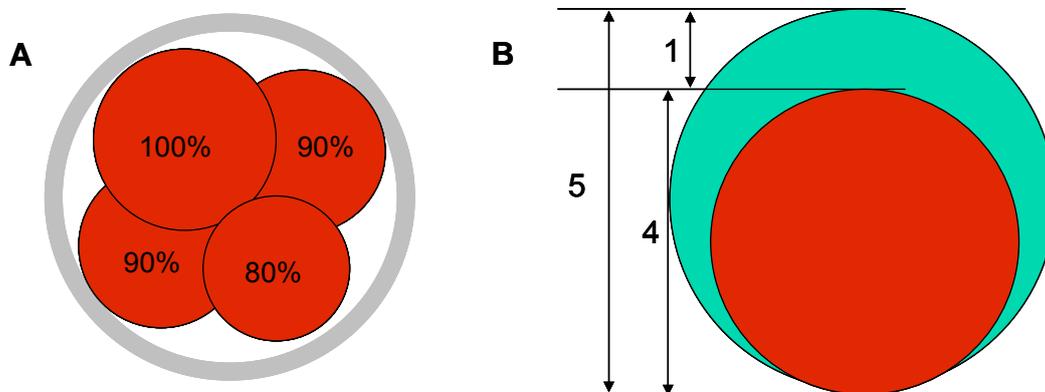
Es necesario evaluar el grado de fragmentación, el tamaño y la distribución de los fragmentos. Respecto al grado de fragmentación citoplasmática, éste puede oscilar entre 0 y 100%, no repercutiendo en la tasa de implantación si es inferior al 20-25% (Ziebe et al., 1997; Van Royen et al., 1999; Alikani et al., 2000; Hardarson

et al., 2001; Racowsky et al., 2003). En lo que respecta al tamaño y distribución de los fragmentos, son los de gran tamaño y los repartidos por todo el embrión los que mayor influencia negativa tienen sobre la tasa de implantación (Alikani and Cohen, 1995; Alikani et al., 2000).

Simetría celular.

El tamaño de las blastómeras también es un factor útil para estudiar el potencial de desarrollo e implantación de los embriones (Hardarson et al., 2001). Una división desigual origina blastómeras de diferente tamaño con distinta distribución del material genético, lo cual repercute negativamente en el potencial de implantación (Steer et al., 1992; Veeck, 1999; Van Blerkom et al., 2000; De Placido et al., 2002; Hnida et al., 2004). Según Hardarson et al. (2001), un preembrión de 4 células con división asimétrica es aquel en el que la diferencia entre el diámetro de las blastómeras mayor y menor supera el 20%. En la Figura 11 se muestra un esquema de un embrión que presenta asimetría entre sus blastómeras.

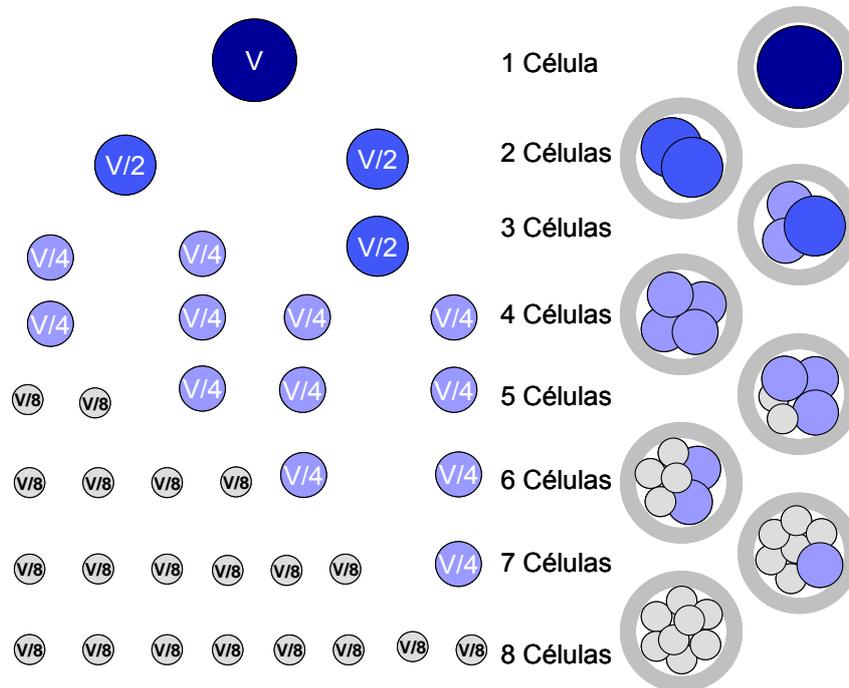
Figura 11: Asimetría en la división celular embrionaria (Arday et al., 2008).



En la figura 11.A se muestra un embrión en el que existe una diferencia de volumen del 20% entre sus blastómeras. Y en la figura 11.B se superponen 2 blastómeras con una diferencia de tamaño del 20%.

No obstante, a veces la asimetría entre blastómeras puede ser normal, pues se debe a una asincronía en la división celular. En la Figura 12 se muestra la asimetría embrionaria que corresponde con asincronía en la división celular para embriones en día+2 y día+3 (Roux et al., 1995; Holte et al., 2007).

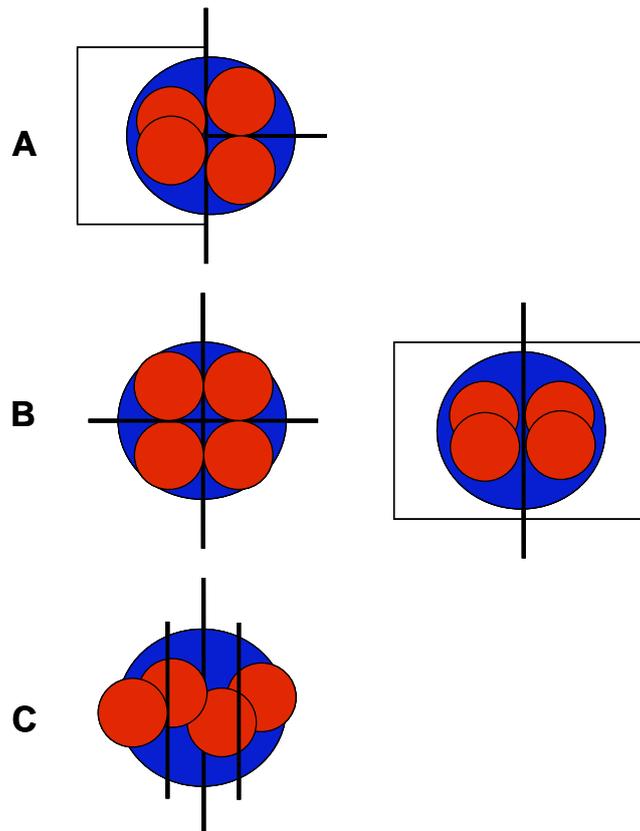
Figura 12: Embriones con asimetría entre sus blastómeras por asincronía en la división celular.



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

Otro aspecto de la división celular que se puede evaluar en el embrión en día+2 es el plano de división de las blastómeras. El embrión presentará una determinada disposición de las blastómeras, en función de la orientación de los planos de división para pasar de 2 a 4 células (Figura 13).

Holte et al. (2007) encontraron mayores tasas de implantación cuando los planos de la segunda división son perpendiculares entre sí, como se muestra en la Figura 13.A. En la Figura 13.B y 13.C los planos de la segunda división celular son paralelos entre sí, y perpendiculares (13.B) o paralelos (13.C) al plano de la primera división celular.

Figura 13: Planos de división embrionaria.**Visualización de núcleos y grado de multinucleación.**

La multinucleación cuando está en una blastómera se denomina binucleación cuando tiene dos núcleos o micronucleación cuando tienen más de 3 núcleos en una sola célula, cuando está en más de una blastómera se denomina multinucleación (Meriano et al., 2004).

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

Sistemas de clasificación en evaluación embrionaria.

Numerosos sistemas de clasificación embrionaria han sido propuestos teniendo en cuenta diversos aspectos de los comentados anteriormente, con la finalidad de seleccionar para la transferencia los embriones con mayor potencial de implantación (Cummins et al., 1986; Hill et al., 1989; Staessen et al., 1992; Steer et

al., 1992; Giorgetti et al., 1995; Bras et al., 1996; Rijnders and Jansen, 1998; Alikani et al., 1999; Antczak and Van Blerkom, 1999; Avery and Brinsden, 1999; Veeck, 1999). Sin embargo, aunque existe cierto acuerdo sobre qué es un buen preembrión y qué es un mal preembrión, la ausencia de criterios comunes afecta tanto a los parámetros a evaluar como a los puntos de corte entre categorías.

Con la intención de unificar criterios de evaluación embrionaria, la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) ha desarrollado un sistema de gradación de la calidad embrionaria para las transferencias en día+2 y día+3 de desarrollo embrionario (Arday et al., 2008). En la Figura 14 y Figura 15 se muestran los esquemas de esta clasificación morfológica para transferencias en día+2 y día+3.

Figura 14: Calidad embrionaria en día+2 según ASEBIR (Arday et al., 2008).

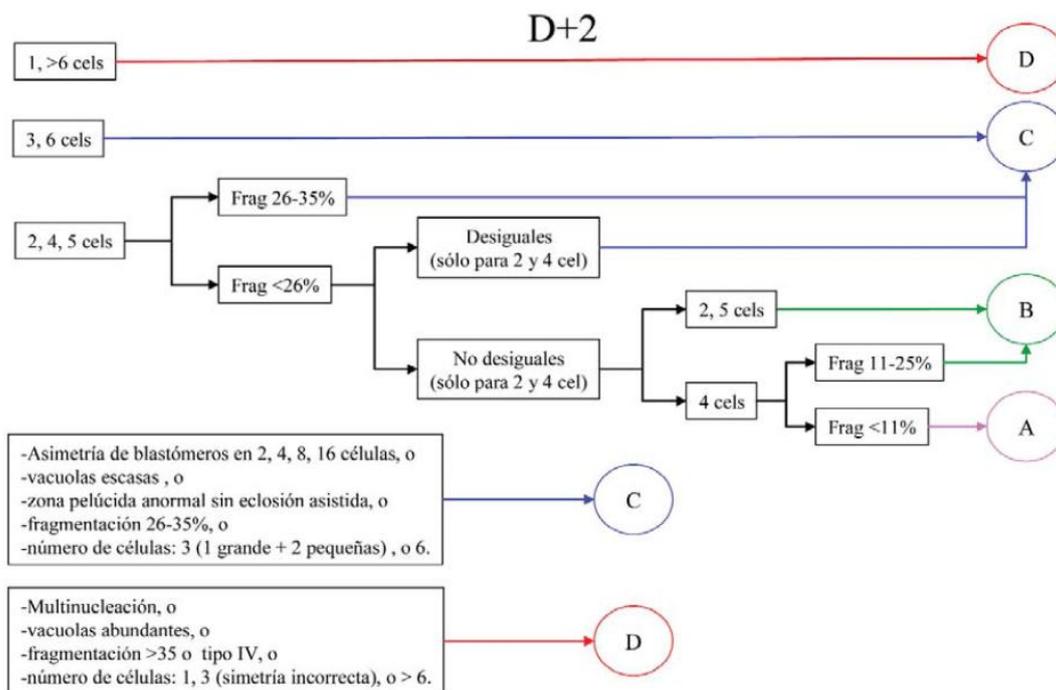
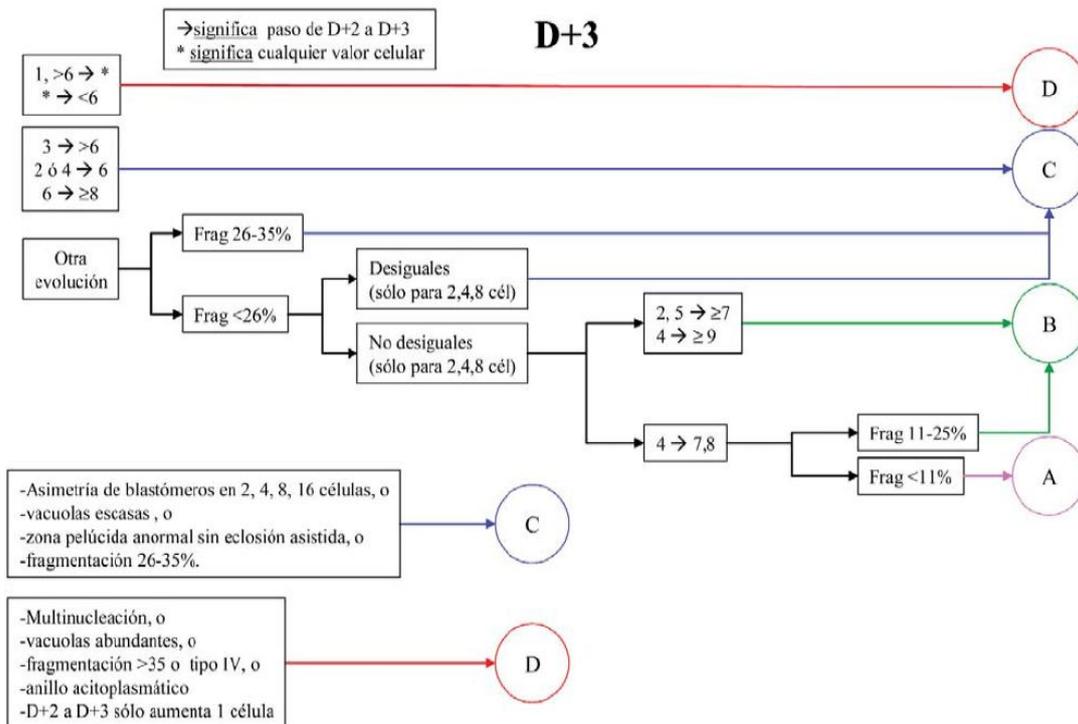


Figura 15: Calidad embrionaria en día+3 según ASEBIR (Arday et al., 2008).



2.2.4 Lavado de semen.

La técnica de lavado de semen consiste en someter al semen a una doble selección de espermatozoides: primero haciendo que atraviese por un gradiente de varias densidades mediante centrifugación y luego dejando que naden hacia arriba los espermatozoides móviles, que son los que se utilizan para la inseminación. Se basa en el supuesto de la no presencia de partículas víricas en la fracción de espermatozoides móviles, por lo que al separarlos del resto de componentes del semen, que sí puede contener virus, se consigue lograr la fecundación con menor riesgo de contagio para la mujer y su descendencia.

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

Las técnicas de gradiente de densidad y swim-up se utilizan habitualmente en reproducción humana para separar y seleccionar los espermatozoides móviles,

que son los aptos para fecundación. La novedad es, como ya hemos comentado previamente, que en el lavado seminal para parejas con enfermedades infecciosas se utilizan las dos técnicas conjuntamente.

Gradiente de densidad.

Consiste en formar diferentes capas de densidades variables. La capa de mayor densidad estará en el fondo del tubo de centrifuga y sobre ésta se colocan otras capas en densidad decreciente. El número de capas, la densidad y el volumen de las mismas variarán dependiendo de los componentes de la muestra a separar. Cuando se realiza la centrifugación, cada componente celular comienza a descender por el gradiente hasta que llega a la zona en la que la densidad de la solución es igual a su propia densidad. La velocidad a la que sedimenta cada uno de los componentes depende fundamentalmente de su tamaño y de su forma. Los componentes de menor tamaño necesitan mayor fuerza de centrifugación y mayor tiempo para alcanzar la capa de su misma densidad (Gorus and Pipeleers, 1981).

Para conseguir la separación de los espermatozoides se pone la muestra de semen en la parte de arriba de un tubo de ensayo, donde se han preparado los gradientes a diferentes porcentajes. Se suelen realizar dos o tres capas de gradientes.

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

Se centrifuga a una velocidad y tiempo que varían según los diferentes estudios, oscilando entre los 300-400 g durante 20-30 minutos. Después de la centrifugación, los espermatozoides móviles se localizaran en la capa de mayor densidad, es decir, al fondo el tubo. Para recuperarlo se debe tener cuidado de que no se contamine con las otras capas superiores donde pueden estar presentes las partículas virales. El botón celular obtenido tras ser lavado en un medio de cultivo de espermatozoides una o dos veces, es recuperado y sometido a la técnica de swim-up.

Swim-up estándar.

Esta técnica se basa en una selección de los espermatozoides por su movilidad. El botón celular recuperado del gradiente de densidad, se coloca en un tubo estéril al que se le añade cuidadosamente medio de cultivo, luego se coloca inclinado 45° en la incubadora a 37°C de temperatura y 6,3% de CO₂ durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se recoge el sobrenadante donde estarán los espermatozoides móviles, que habrán nadado desde el botón celular.

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

2.2.4.1 Detección del virus en la muestra lavada.

La detección del virus en la muestra obtenida tras el lavado se realiza mediante PCR. Esta técnica consiste en amplificar enzimáticamente secuencias específicas del material genético a estudiar.

La negatividad de la prueba de detección de virus tras el lavado de la muestra, no permite excluir con total certeza la presencia de virus, cuya concentración en la muestra podría ser inferior al umbral de sensibilidad de la técnica. No obstante, no se ha descrito hasta la actualidad ningún caso de contagio, ni en las mujeres tratadas con este tipo de semen ni en los recién nacidos obtenidos, lo que nos sugiere que no es imprescindible realizar técnicas de detección de virus más complejas como la nested-PCR, que detecta hasta una copia del virus (Meseguer et al., 2002).

Diversos trabajos han puesto de manifiesto una alta variabilidad en los resultados de los test de detección de VIH en líquido seminal entre distintos laboratorios (Fiscus et al., 2000) y VHC (Bourlet et al., 2003), por lo que se ha propuesto la necesidad de desarrollar programas de control de calidad externo entre laboratorios que realicen estas técnicas (Bourlet et al., 2003; van Leeuwen et al., 2007).

3. Opciones reproductivas en parejas con EIT.

Ante parejas con enfermedades infecciosas transmisibles, el consejo reproductivo integral y riguroso es prioritario, asumiendo que la reproducción asistida no siempre es la vía más idónea.

3.1 Reproducción natural.

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

En casos de varones con hepatitis la pareja debe recibir la información adecuada, ya comentada en secciones anteriores, para de esta forma poder tomar una decisión informada, tal como propone la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, 2008).

Consideración aparte merece esta opción en parejas con VIH. Se ha estimado que aproximadamente el 20-45% las parejas con serodiscordantes para VIH tienen relaciones con deseos reproductivos, es decir, sin protección mediante métodos de barrera (Buchacz et al., 2001; Kalichman et al., 2002; Klein et al., 2003), lo que no deja de ser sorprendente si se considera que en la mayoría de los casos el riesgo de transmisión no se ha evaluado previamente (van Leeuwen et al., 2008a). Partiendo de esta realidad epidemiológica y de datos que demuestran que la transmisión heterosexual depende de la carga viral en sangre periférica y parece nula por debajo de 1500 copias/mL (Quinn et al., 2000), algunos grupos han iniciado estudios en parejas con varón seropositivo para VIH con deseos reproductivos recomendando reproducción natural en pacientes escogidos. En España, un estudio realizado en 40 parejas con varones con anticuerpos anti-VIH positivos en tratamiento con terapia antirretroviral de alta actividad y menos de 50 copias ARN-VIH/mL al menos durante 6 meses, ha registrado más de 50 gestaciones sin seroconversiones en sus parejas seronegativas, recomendando a las parejas mantener relaciones no protegidas solo en días alternativos y en el periodo próximo a la ovulación (Barreiro et al., 2006a).

Estos resultados deben ser valorados con cautela y reafirmados por estudios más extensos antes de generalizar dicha práctica, tal como los propios

autores recomiendan (Barreiro et al., 2006b). En este sentido, un informe de la Comisión Federal del SIDA de Suiza (Vernazza et al., 2008) señala que la transmisión sexual del VIH se puede asumir nula en varones seropositivos para VIH que cumplan las siguientes condiciones: carga viral sérica indetectable en los últimos 6 meses, adherencia total a la terapia antirretroviral y ausencia de enfermedades de transmisión sexual. No obstante, la OMS y ONUSIDA (2008) respondieron a dicho informe, desaconsejando en estos pacientes las relaciones sexuales sin preservativo. En el mismo sentido se ha pronunciado la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, 2008).

La oposición a la reproducción natural en determinados varones seropositivos para VIH se sustenta por los hallazgos de Dornadula et al., (1999) que detectan la presencia de VIH en semen en varones con anticuerpos anti-VIH y menos de 50 copias/mL en suero. En el aparato genital, al igual que en el sistema nervioso central, distintos factores locales pueden afectar a la infección por VIH. Entre estos factores estarían la coinfección con otros patógenos de transmisión sexual, que pueden provocar condiciones inflamatorias que conlleven una mayor replicación del VIH (p. ej. Citomegalovirus) (Speck et al., 1999; Xu et al., 2005) o que algunos antirretrovirales no puedan alcanzar determinadas regiones del tracto genital masculino (Solas et al., 2003).

Para adoptar decisiones aplicando criterios de medicina basada en la evidencia deberíamos usar como medida de efecto el NNH (número de pacientes que se necesita tratar para prevenir un efecto adverso), que proporciona una medida de efecto fácilmente relacionable con la relación coste/eficacia. Debemos recordar que el riesgo de transmisión sexual de VIH de varón a mujer por coito en parejas estables es de 0,001 y que en parejas con baja carga viral este riesgo es diez veces menor (Gray et al., 2001). Si las parejas tratadas con técnicas de reproducción asistida son precisamente aquéllas con baja o nula carga viral, demostrar que el riesgo de contaminación utilizando lavado seminal es menor que con relaciones naturales requeriría un estudio sobre 3000 casos, y para un riesgo de 0,0001 se necesitarían 30.000 casos (Englert et al., 2004). La casuística más completa publicada hasta el momento asciende a unos 4000 ciclos (Bujan et al., 2007a), que representan una cifra muy lejana de los 30.000 casos comentados. No existe evidencia científica de calidad que demuestre la utilidad del lavado seminal, y será difícil obtenerla, ya que, considerando el actual estado de la práctica clínica,

parece poco probable que se emprendan ensayos clínicos con metodología adecuada para generar la evidencia necesaria (Englert et al., 2004).

El Panel Español de Estudio de Parejas VIH-discordantes (Labarga et al., 2007) desaconseja el embarazo en mujeres seropositivas para VIH con:

- Proceso oportunista activo (SIDA).
- Complicaciones relacionadas con la infección por VIH (procesos autoinmunitarios, toxicidad por antirretrovirales, enfermedades de transmisión sexual, etc.).
- Recuento de linfocitos CD4 < 200 células/ μ L.
- ARN-VIH plasmático detectable (> 50 copias/mL) en los 3-6 meses previos.
- Mala tolerabilidad o adherencia a los antirretrovirales, independientemente de la carga del VIH.

En mujeres VIH positivas con deseos reproductivos y que no presenten las circunstancias enumeradas, puede recomendarse autoinseminaciones, tal como establece el Panel Español de Estudio de Parejas VIH-discordantes (Labarga et al., 2007).

3.1.1. Profilaxis pre-exposición.

En el caso de parejas seropositivas para VIH con buena adherencia al tratamiento con TARGA, estudios recientes han unido reproducción natural con coito programado y profilaxis pre-exposición (PREP) (Matthews et al., 2010). Ya que la TARGA ha eliminado virtualmente el riesgo de transmisión sexual (Vernazza et al., 2008), la PREP se plantea como una opción para reducir aún más este posible riesgo. Vernazza et al. (2011) ha descrito en parejas serodiscordantes con varón seropositivo para VIH, mayores tasas de gestación con PREP que mediante inseminación intrauterina.

3.2 Autoinseminación.

Se trata de una opción “intermedia” entre la RN y las TRA en aquellas parejas con varón sano y mujer seropositiva para VIH, VHC y/o VHB. Esta técnica es realizada por las parejas sin necesidad de intervención médica, sólo con unas recomendaciones e instrucciones que le son dadas a las parejas (Rivero et al., 2009).

Se han descrito 7 gestaciones en 12 mujeres seropositivas para VIH que estuvieron realizando autoinseminaciones mensuales en ciclos naturales, con una tasa de gestación del 7% por intento (Savasi et al., 2001).

3.3 Reproducción Asistida.

Las TRA (detalladas en la sección 2.2) además de utilizarse como tratamiento para parejas con problemas de fertilidad tienen la indicación de satisfacer los deseos reproductivos de parejas con enfermedades infecciosas transmisibles para reducir al mínimo el riesgo de contagio del otro miembro de la pareja o de la descendencia, tal y como hemos comentado anteriormente.

Una vez que la pareja ha optado por reproducción asistida, debemos decidir si realizar inseminaciones intrauterinas o FIV/ICSI. La mayoría de autores creen que la IAC es una técnica segura, siempre que se haya comprobado la ausencia de virus en el semen lavado (Marina et al., 1998a; Bujan et al., 2004b). Solo tendrá sentido hacer siempre ICSI en el caso de tener que criopreservar la muestra, en espera del resultado de estudio vírico del semen lavado, ya que la congelación afectará negativamente la calidad seminal, probablemente ya deteriorada por los varios lavados a los que se ha visto sometida.

Los resultados obtenidos al aplicar TRA a parejas con algún miembro con alguna EIT han sido comentados en los apartados 1.1.5.4, 1.2.5.4 y 1.3.5.4.

4. Atención a los deseos reproductivos en nuestro medio.

Como hemos comentado, las opciones reproductivas en estas parejas son varias, dependiendo estas de factores relacionados con la EIT y con las características clínicas de la pareja (edad, causas asociadas de esterilidad, etc.). La mayoría de Sociedades Científicas considera adecuada la atención a los deseos reproductivos de parejas con EIT (CDC, 2001; Shenfield et al., 2004; ; FIGO, 2006; Matorras and Hernández, 2007; ASRM, 2008). En lo que discrepan es en el abordaje terapéutico. A modo de ejemplo, en la Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13 se presentan las recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) sobre este tema (SEF, 2011).

Tabla 11: Orientación del tratamiento a parejas con infección por VIH (SEF, 2011).

	Carga viral (CV) sérica	
	Negativa (paciente controlado)	Positiva
Varón Ac VIH+	Relaciones naturales en días alternos fértiles*	Reproducción asistida con lavado seminal y determinación CV posterior.
Mujer Ac VIH+	Autoinseminación o relaciones naturales en días alternos fértiles*	Desaconsejar embarazo y evaluar estado viral e inmunológico.
Ambos Ac VIH+	Ambos CV sérica negativa: Autoinseminación	Ambos CV sérica positiva: desaconsejar embarazo.

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

Tabla 12: Orientación del tratamiento a parejas con infección por VHC (SEF, 2011).

	Carga viral sérica	
	Negativa (repetida)	Positiva
Varón Ac VHC+	Relaciones naturales	<p>Opción informada:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ $<10^6$ copias/mL: relaciones sexuales dirigidas. ▪ $>10^6$ copias/mL: Reproducción asistida con lavado con/sin necesidad de detectar CV postlavado*.
Mujer Ac VHC+	Relaciones naturales	<p>Opción informada:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ $<10^6$ copias/mL: relaciones sexuales dirigidas. ▪ $>10^6$ copias/mL: Desaconsejar embarazo.
Ambos Ac VHC+	Ambos CV sérica negativa: relaciones naturales	<p>Ambos CV sérica positiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ambos $<10^6$ copias/mL: relaciones sexuales dirigidas. ▪ Varón $>10^6$ copias/mL: Reproducción asistida con lavado con/sin necesidad de detectar CV postlavado*. ▪ Mujer $>10^6$ copias/mL: Desaconsejar embarazo.

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

Tabla 13: Orientación del tratamiento a parejas con infección por VHB (SEF, 2011).

	CV serica negativa repetida	CV serica positiva
Varón AgHBs+	Relaciones naturales	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mujer Ac antiHBs+: Relaciones naturales. ▪ Mujer Ac antiHBs-: Vacunar. ▪ Mujer antiHBs- por fallo vacunación: Reproducción asistida con lavado seminal y detección carga viral.
Mujer AgHBs+	Relaciones naturales	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Varón Ac antiHBs+: Relaciones naturales. ▪ Varón Ac antiHBs-: Vacunar. ▪ Varón Ac antiHBs- por fallo vacunación: Autoinseminación. ▪ Mujer $>10^{6-9}$ copias/mL: Desaconsejar embarazo*.
Ambos AgHBs +	Ambos CV sérica negativa: Relaciones naturales	<p>Ambos CV sérica positiva*:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ambos $<10^6$ copias/mL: relaciones naturales. ▪ Varón $>10^6$ copias/mL: Reproducción asistida con lavado seminal y detección carga viral. ▪ Mujer $>10^{6-9}$ copias/mL: Desaconsejar embarazo.

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

La falta de un criterio homogéneo ha llevado al Servicio Andaluz de Salud (SAS) a la elaboración de unos protocolos específicos para atender a estas parejas, incluidos en la Guía de Reproducción Asistida del SAS (Albusac et al., 2006) y en el Proceso Asistencial Integrado VIH/SIDA (Rivero et al., 2009). Se describen en la Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16.

Tabla 14: Procedimiento general del SAS en pacientes con infección por VIH (Albusac et al., 2006; Rivero et al., 2009).

	Carga viral sérica	
	Negativa (paciente controlado)	Positiva
Varón Ac VIH+	Reproducción asistida con lavado seminal y determinación CV posterior.	Reproducción asistida con lavado seminal y determinación CV posterior.
Mujer Ac VIH+	Reproducción asistida con lavado seminal y determinación CV posterior (mujer CD4 > 200/mm ³).	Desaconsejar embarazo y evaluar estado viral e inmunológico.
Ambos Ac VIH+	Ambos CV sérica negativa: Reproducción asistida con lavado seminal y determinación CV posterior (mujer CD4 > 200/mm ³).	Ambos CV sérica positiva: desaconsejar embarazo.

Tabla 15: Procedimiento general del SAS en pacientes con infección por VHC (Albusac et al., 2006).

	Carga viral sérica	
	Negativa (repetida)	Positiva
Varón Ac VHC+	Relaciones naturales	Reproducción asistida con lavado con/sin necesidad de detectar CV postlavado.
Mujer Ac VHC+	Relaciones naturales	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <10⁶ copias/mL: Reproducción asistida. ▪ >10⁶ copias/mL: Desaconsejar embarazo.
Ambos Ac VHC+	Ambos CV sérica negativa: relaciones naturales	<p>Ambos CV sérica positiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mujer <10⁶ copias/mL: Reproducción asistida con lavado con/sin necesidad de detectar CV postlavado. ▪ Mujer >10⁶ copias/mL: Desaconsejar embarazo.

Tabla 16: Procedimiento general del SAS en pacientes con infección por VHB (Albusac et al., 2006).

	CV serica negativa repetida	CV serica positiva
Varón AgHBs+	Relaciones naturales	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mujer Ac antiHBs+: Relaciones naturales. ▪ Mujer Ac antiHBs-: Vacunar. ▪ Mujer antiHBs- por fallo vacunación: Reproducción asistida con lavado seminal y detección carga viral.
Mujer AgHBs+	Relaciones naturales	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Varón Ac antiHBs+: Relaciones naturales. ▪ Varón Ac antiHBs-: Vacunar. ▪ Varón Ac antiHBs- por fallo vacunación: Reproducción asistida. ▪ Mujer $>10^6$ copias/mL: Desaconsejar embarazo.
Ambos AgHBs +	Ambos CV sérica negativa: Relaciones naturales	<p>Ambos CV sérica positiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mujer $<10^6$ copias/mL: Reproducción asistida con lavado seminal y detección carga viral. ▪ Mujer $>10^6$ copias/mL: Desaconsejar embarazo.

OBJETIVOS

Como hemos visto en la Introducción, los cambios en las expectativas de vida en pacientes con VIH, han hecho que exista una creciente demanda de consejo reproductivo por estas parejas. Además, debido a la elevada prevalencia de hepatitis en nuestro medio, es relativamente frecuente la presencia de estas parejas en las Unidades de Reproducción.

Por todo lo anterior en este estudio nos proponemos analizar diferentes aspectos sobre la atención a los deseos reproductivos de parejas con enfermedades infecciosas transmisibles (VIH, Hepatitis C, Hepatitis B):

1. Analizar las opciones reproductivas escogidas y riesgos asumidos por parejas con algún miembro seropositivo para VIH.
2. Determinar la eficacia de la reproducción natural y de las técnicas de reproducción asistida en parejas con enfermedades infecciosas transmisibles, así como la accesibilidad en nuestro medio a las técnicas de reproducción asistida.
3. Determinar la eficacia de las técnicas de cuantificación de VIH en semen.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Opciones reproductivas escogidas por parejas con al menos un miembro positivo para VIH.

Se diseñó un estudio no experimental descriptivo de sentido retrospectivo para determinar las opciones reproductivas escogidas en parejas con al menos un miembro positivo para VIH. Se incluyeron parejas que acudieron regularmente a la consulta en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada para su seguimiento, y que manifestaron deseos de reproducción, entre enero de 2004 y diciembre de 2009 y las que sin manifestar previamente estos deseos llegaron a consulta con la mujer embarazada en este periodo.

En estas parejas se analizó: la opción reproductiva (reproducción natural o técnicas de reproducción asistida) y su evolución (se conseguía o no gestación, y en este último caso se analizó si se cambiaba la opción reproductiva elegida inicialmente).

1.1 Características sociodemográficas y hábitos tóxicos.

Las variables comparadas en los dos grupos de parejas (reproducción natural o reproducción asistida) fueron: edad de ambos miembros de la pareja, miembro de la pareja seropositivo para VIH, seropositividad o coinfección con VHC y/o VHB, hábitos tóxicos (consumo de tabaco, abuso de alcohol, consumo de drogas inyectadas o no inyectadas en el pasado y actualmente) y tratamiento sustitutivo con morfínicos. Estas dos últimas variables sólo se estudiaron en pacientes positivos para VIH.

1.2 Características de la infección VIH.

Se analizaron en los dos grupos de parejas (reproducción natural o reproducción asistida) los datos epidemiológicos referentes a la infección del VIH: tiempo desde el que el/la paciente conocía que era seropositivo al VIH, vía de contagio de la enfermedad, carga viral basal cuando se diagnosticó el VIH y CD4 Nadir.

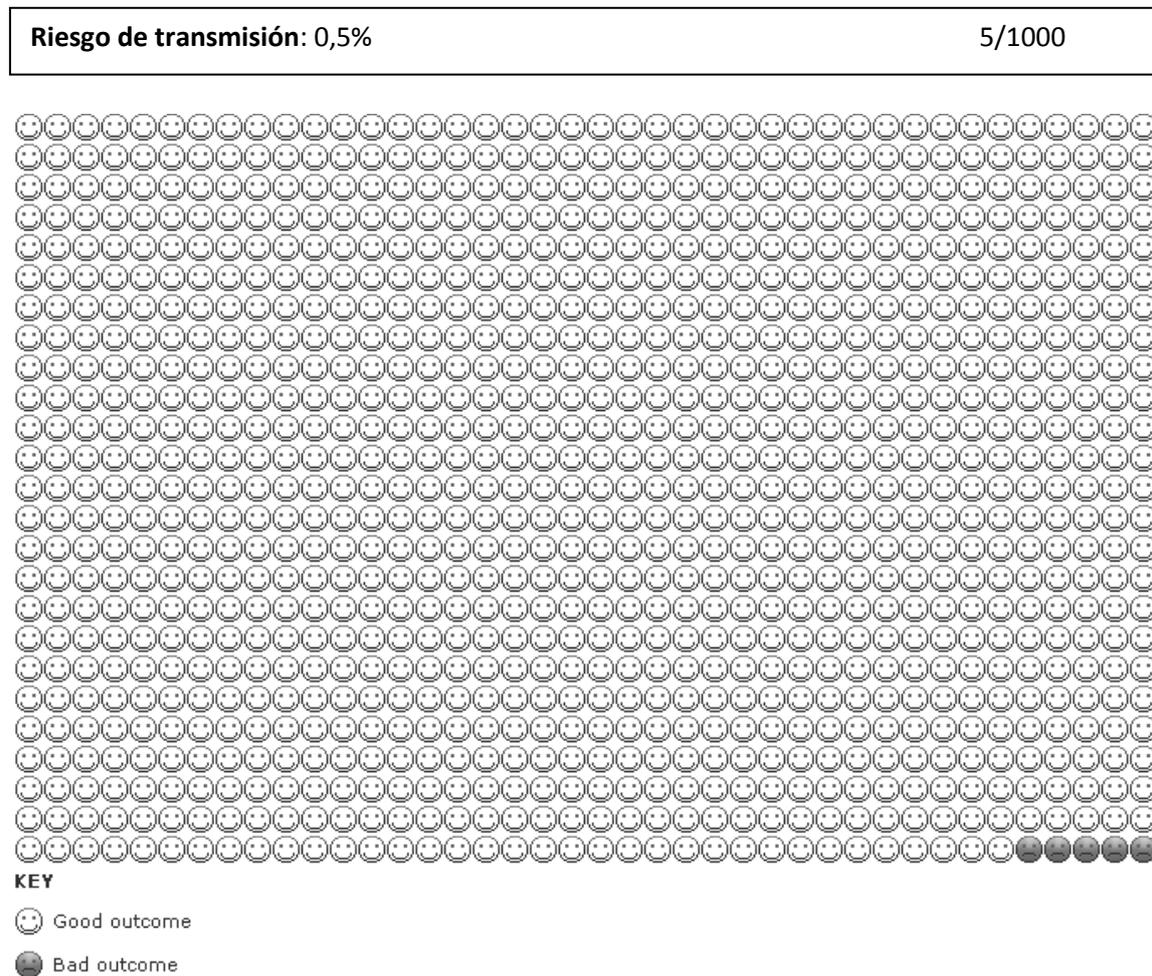
2. Asunción de riesgos en parejas con varón seropositivo para VIH que demandan atención reproductiva.

Para este objetivo, se diseñó un estudio no experimental analítico de casos y controles, en el que se analizó el riesgo que son capaces de asumir las parejas con varón positivo para VIH. Se incluyeron las parejas que acudieron a la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves entre marzo de 2010 y septiembre de 2011 demandando atención reproductiva y que aceptaron responder a una encuesta previamente explicada a la pareja (tiempo total medio de explicación y contestación de la encuesta: 10 minutos).

Durante la primera visita a la Unidad de Reproducción, tras completar la historia médica de la pareja, fueron informados de las opciones reproductivas. Dentro de la información que se les dio a los pacientes, se incluyó los factores de riesgo que influyen en la transmisión horizontal y vertical, tanto por TRA como por RN (Del Romero et al., 2004; Del Romero et al., 2010). Al final de esta visita se les propuso realizar un encuesta, basada en la diseñada por van Leeuwen et al. (2008a), en la que se les preguntaba a ambos miembros de la pareja el riesgo máximo de transmisión horizontal que eran capaces de asumir, tanto por TRA como por RN, a partir del cual no aceptarían las TRA o no mantendrían relaciones naturales. Los posibles riesgos máximos de transmisión expuestos a la pareja fueron: 0; 0,5; 1; 3; 5 y 10 %. Para facilitar la comprensión de la información probabilística, ésta se le mostró a la pareja de tres formas diferentes: una figura que representaba mediante imágenes en color la probabilidad de transmisión (Edwards et al., 2002), como porcentaje y como frecuencia (Figura 16).

Los resultados obtenidos en el grupo anterior se compararon con los obtenidos en el grupo control de parejas seronegativas a EIT que acudieron a la consulta de la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Las parejas de este grupo control fueron escogidas por el grupo investigador de entre las parejas con características clínicas similares (± 2 años de edad, igual número de abortos e hijos previos y ± 2 años de esterilidad), que acudieron a la Unidad de Reproducción la misma semana que se le realizó la encuesta a una pareja con varón seropositivo para VIH.

Figura 16: Riesgo de transmisión horizontal sobre mil personas, el paciente que no se infecta aparece en blanco y de gris el que se infecta tras someterse a TRA o mantener RN.



3. Reproducción natural en parejas con VIH.

Se realizó un estudio no experimental analítico de casos y controles en el que se incluyeron las parejas con al menos un miembro positivo para VIH que acudieron regularmente a consulta en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada para su seguimiento, y que manifestaron su deseo de reproducción mediante reproducción natural entre enero de 2004 y diciembre de 2009, o las que sin manifestar previamente este deseo, llegaron a la consulta con la mujer embarazada mediante RN en esta fecha.

3.1 Características de la infección VIH.

Se recogieron los datos sobre el estado del VIH del paciente en la revisión más próxima a la concepción: la carga viral y el recuento de linfocitos CD4. También se tuvo en cuenta si el paciente había sido diagnosticado en algún momento de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y si tomaba o no tratamiento. Se consideró que el paciente estaba en tratamiento cuando tomaba terapia combinada de alta actividad antirretroviral, y se consideró que no estaba recibiendo cuando no existía una buena adherencia al tratamiento (se les había indicado tratamiento pero no lo cumplían correctamente o lo tomaba de forma intermitente) o no se les había indicado. Sólo se tuvo en cuenta el tratamiento cuando había sido tomado durante al menos 3 meses seguidos.

En las parejas que tuvieron más de una gestación, se recogieron los siguientes datos para cada gestación: recuento de carga viral y recuento de linfocitos CD4 que había tenido el/ la paciente seropositivo para VIH en la revisión más próxima a la concepción y si estaba en tratamiento.

3.2 Resultados obstétricos y neonatales de los partos.

En primer lugar se describe la evolución de las gestaciones (aborto y tipo, término). En segundo lugar se compararon los resultados obstétricos y neonatales de los partos en parejas con al menos un miembro positivo para VIH con los de grupo control. Para configurar esta población, el equipo investigador seleccionó el parto más próximo que hubiera ocurrido ese mismo día en el Hospital Materno Infantil de una mujer seronegativa, siendo la diferencia de edad (± 2 años).

Cuando las gestaciones fueron evolutivas se analizaron las siguientes variables obstétricas: abortos e hijos previos de la mujer, rotura de la bolsa amniótica, si se realizó cardiotocografía durante el parto, presentación del feto, si durante el comienzo o al final del parto fue necesario oxitocina, operatoria vaginal o si se realizó cesárea, así como la indicación de estos procedimientos. También se incluyó si se administró anestesia a la mujer y de qué tipo.

En el recién nacido se estudió: peso, sexo, días de gestación, percentil, Apgar al primer minuto y Apgar a los 5 minutos, presencia de estreptococo grupo

B, examen de sangre fetal, color del líquido amniótico y cuál fue el destino del recién nacido tras el parto.

Se comparó, por un lado, los embarazos de mujeres que eran positivas para VIH con sus controles, y por otro lado, los embarazos en los que al menos uno de los miembros de la pareja era positivo para VIH (independiente de si era la mujer o el hombre), frente a su grupo control.

4. Técnicas de Reproducción Asistida en parejas seropositivas para VIH, VHC y/o VHB en el Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA).

Se analizaron parejas con hombre seropositivo para VIH, VHC o VHB que se sometieron a un tratamiento de reproducción asistida en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

Para ser incluidas, las parejas debían firmar un consentimiento informado donde se comprometían a la utilización sistemática de preservativos en los cuatro meses previos a la aplicación de la técnica de reproducción y a no mantener relaciones sexuales desde el mes anterior al inicio de la técnica de reproducción asistida hasta un mes posterior a la finalización de esta.

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

Para incluir a mujeres VIH-seropositivas era necesario que tuvieran carga viral indetectable y recuento de células CD4 >200 células/mm³. Las mujeres seronegativas debían proveer un estudio serológico reciente y carga viral para VIH.

Las mujeres seronegativas para VHB, cuyos varones eran positivos para VHB eran vacunadas y si no conseguía desarrollar inmunidad, el semen de su pareja era lavado y analizado la presencia de carga viral, previamente a su utilización. Las parejas tenían que esperar una media de 2 años para poder ser

tratadas (tiempo medio de lista de espera en HUVN). Cada pareja tenía un máximo de dos intentos (dos ciclos con transferencia embrionaria) para quedar gestante, según establece la guía de reproducción asistida de Servicio Andaluz de Salud (SAS) (Albusac et al., 2006).

El estudio básico de esterilidad consistió en: anamnesis, evaluación física general y ginecológica, ecografía vaginal de útero y anejos, toma de muestra vaginal y cervical para cultivos bacteriológicos y/o evaluación microscópica de la secreción vaginal. También se hizo determinación de hormonas basales en sangre el día 3 del ciclo. Los hombres fueron evaluados mediante análisis seminal según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 1999). El laboratorio de TRA utilizado para todos los procedimientos estaba separado del laboratorio utilizado para el resto de parejas seronegativas para VIH, VHC y VHB.

Para poder iniciar las TRA los pacientes con VHC y/o VHB que estaban siguiendo tratamiento con ribavirina debían tener un periodo de aclaramiento previo de al menos 6 meses.

4.1 Análisis de la demanda.

4.1.1 Demanda observada.

Se analizó mediante un estudio no experimental descriptivo con un sentido retrospectivo, el total de parejas solicitantes de TRA en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, las parejas incluidas y las no incluidas, así como el motivo de exclusión entre noviembre de 2005 y diciembre de 2009, según los criterios de inclusión detallados en la Guía del SAS (Albusac et al., 2006).

Se estudió también el porcentaje de ciclos de Reproducción Asistida realizados a parejas con varones seropositivos para VIH, VHC y/o VHB en la Unidad de Reproducción del HUVN (Centro de referencia del SSPA para el tratamiento de estas parejas), respecto al total de ciclos realizados en el SSPA (dato facilitado por el Servicio de Cartera de Servicios de la Dirección General de Asistencia Sanitaria de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía).

4.1.2 Demanda teórica.

Se realizaron dos estimaciones de la demanda que debía haber tenido nuestro centro en este tiempo, una se realizó a partir de la población general de Andalucía, y la otra a partir de la población estéril de esta misma comunidad.

Para estimar en nuestra región, a partir de la población general, la demanda teórica de atención a sus deseos reproductivos de parejas con varones VIH positivos se tuvo en cuenta: número de varones en edad reproductiva (1,3 millones en 2008) (Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía, 2009), prevalencia de VIH en varones de esa edad (0,42%) (Castilla, 2001) y la mediana del porcentaje de estas parejas que tienen deseos reproductivos (17,5%) (Chen et al., 2001; Panozzo et al., 2003; Frodsham et al., 2006; Heard et al., 2007). Para estimar la demanda teórica en caso de VHC y VHB, tuvimos en cuenta: la prevalencia de estas infecciones, 1,9% para VHC (Riestra et al., 2001) y 0,9% para VHB (Salleras et al., 2007) y porcentaje de parejas con deseos reproductivos (80%) (Instituto Nacional de Estadística, 2004).

Para estimar en nuestra región, a partir del número de parejas subfértiles, la demanda teórica de parejas con varón infectado por VIH, VHC y VHB que deberían ser tratadas en nuestra Unidad se tuvo en cuenta: número de habitantes en Andalucía (8,2 millones), número de parejas estériles por cada millón de habitantes (1200 parejas) (Thonneau et al., 1991), el porcentaje de parejas estériles que buscan atención sanitaria (50%)(ESHRE Capri Workshop Group, 2001), la prevalencia de estas enfermedades en nuestro medio para varones en edad reproductiva. El número obtenido se ajusto por la mediana del porcentaje de estas parejas que tienen deseos reproductivos (17,5% en el caso de varón VIH positivo y 80% para las parejas con varón con hepatitis B y/o C), comentado anteriormente.

4.1.3 Variables que influyen en la demanda.

Las variables que influyen en la demanda, que se analizaran de forma univariante, fueron: inmigración y distancia a nuestro centro desde otras provincias de Andalucía. Para el análisis de la accesibilidad de la población inmigrante a este tratamiento se comparó el porcentaje de inmigrantes en los varones seropositivos en España para VIH, VHC y/o VHB: 12 % para VIH (Castilla and Guevara, 2009), 3

% para VHC y 20 % para VHB (European Centre for Disease Prevention and Control, 2010) y el porcentaje de inmigrantes observado en las parejas con varón con EIT que acudieron a la Unidad de Reproducción del HUVN.

También se estudió la influencia que podía tener residir lejos de nuestro centro (> 200 km) sobre la demanda observada (número ciclos realizados en nuestro centro).

4.2 Calidad seminal y resultados de lavado de semen en varones con EIT.

Se diseñó un estudio no experimental analítico de casos y controles, en el que se analizaron muestras de semen de varones con virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis C y/o virus de la hepatitis B que acudieron a la Unidad de Reproducción de HUVN, entre noviembre de 2005 y mayo de 2011 y sus resultados se compararon con los obtenidos en muestras de semen de un grupo control.

La población control consistió en hombres seronegativos para VIH, VHC y VHB de parejas estériles que habían acudido a nuestro centro por problemas de esterilidad femeninos (factor endocrino, endometriosis, síndrome de ovárico poliquístico, factor ovárico o factor tubárico), la edad de estas parejas debía ser ± 2 años de la edad media del otro grupo. Estas muestras de semen no fueron lavadas mediante gradiente de densidad y posterior swim-up, sólo fueron procesadas mediante swim-up (ver sección 4.2.3).

Las variables analizadas fueron: edad del varón, estado serológico, carga viral, recuento de linfocitos CD4 en caso de VIH, tratamiento antirretroviral, hábitos tóxicos (consumo de tabaco, consumo de alcohol), estación del año en la que se recogió la muestra de semen y días de abstinencia sexual.

En los casos en los que el hombre era positivo para VHB y la mujer no presentaba inmunización para este virus tras vacunación, el semen de su pareja era lavado mediante gradiente de densidad y swim-up, y la carga viral determinada.

4.2.1 Análisis de semen.

Todas las muestras de semen fueron manejadas y evaluadas siguiendo las recomendaciones de la OMS (WHO, 1999). El manejo de las muestras de semen de varones con EIT fue realizado en una cabina de seguridad biológica Clase II.

La concentración seminal fue determinada usando un hemocitometro Neubauer Improved, pipeta de desplazamiento positivo y conteo por duplicado. Para la evaluación de la movilidad, el campo microscópico fue escaneado sistemáticamente y la motilidad de cada espermatozoide fue clasificada en a, b, c o d en función de si mostraba motilidad: (a) progresiva rápida, (b) progresiva lenta, (c) no progresiva ($<5 \mu\text{m/s}$) y (d) inmóviles. Se contaron al menos 200 espermatozoides en dos preparaciones. Para la evaluación morfológica se realizaron extensiones seminales que fueron teñidas mediante la tinción rápida Diff-Quick. Se contaron 200 espermatozoides en 2 extensiones.

4.2.2 Lavado de semen y detección de carga viral.

El protocolo de lavado de semen está basado en la publicación inicial de Semprini et al. (1992). La muestra de semen fue procesada mediante la técnica de gradiente de densidad 80%-40% (PureSperm 100 y PureSperm Buffer, Nidacon, Mölndal Sweden), cada capa de 1 mL. El semen era pipeteado directamente encima de la capa superior. Tras centrifugación (20 min a 300 g) se eliminaron los restos de plasma, semen y los gradientes de densidad, a continuación se recogió el botón celular con una nueva pipeta. Este botón celular fue resuspendido 1:2 (vol: vol) con PureSperm Wash (Nidacon, Mölndal Sweden) y centrifugado durante 8 min a 300 g. Posteriormente esta muestra era decantada y se le añadía 1 mL de PureSperm Wash para la realización de swim-up, se centrifugaba la muestra unos segundos a 300 g y se dejaba en la incubadora a 37°C y 6,3% de CO₂ durante 45 minutos con una inclinación de 45°. Pasado este tiempo se aspiraba cuidadosamente el sobrenadante (1 mL). La muestra de espermatozoides obtenida se dividió en varias partes: una parte se usó para la valoración de la muestra mediante recuento y movilidad espermática, otra para la determinación viral mediante PCR y una última fracción fue congelada y almacenada hasta su utilización tras descartar la presencia de partículas víricas en la muestra lavada.

La técnica utilizada para cuantificar ARN VIH-1, ARN VHC y ADN VHB en la muestra final procesada fue PCR a tiempo real, un ensayo adaptado de VIH-1 COBAS Ampliprep/Taqman assay (Pasquier et al., 2006b), HCV Cobas Ampliprep/Taqman y HBV Cobas Ampliprep/Taqman (Roche Diagnostics).

La congelación se realizó mezclando la muestra de semen lavada con el crioprotector Sperm Freezing Medium (Irvine Scientific, Waalwijk, Netherlands) en relación 1:1, este crioprotector era añadido gota a gota en un tiempo medio de 15 minutos. La mezcla fue cargada en pajuelas termosellables de alta seguridad biológica (Cryo Bio System, París, Francia) de 0,3 mL correctamente identificadas, esto se realizaba mediante un embudo (punta amarilla) y una jeringa de 0,5 mL, para evitar el contacto entre el semen y el exterior de la pajuela. Estas pajuelas eran termoselladas (Cryo Bio System, París, Francia) y congeladas utilizando un congelador vertical (Nicool LM10, Labortechnik, Marne la Vallee, France). Para la utilización de las muestras, el número de pajuelas que previamente se habían estimado necesarias se descongelaban a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación se diluía progresivamente 1:1 con G-IVF Plus suplementado con HSA (Vitrolife, Göteborg Sweden), y se centrifugaba 8 minutos a 300 g. Posteriormente se realizaba swim-up que consistía en descartar el sobrenadante y añadir 0,5 mL de G-IVF Plus (Vitrolife, Göteborg Sweden). La muestra era centrifugada unos segundos a 300 g. Se incubaba 45 minutos a 37°C y 6,3% de CO₂ con una inclinación de 45° (Mortimer, 1994), pasado este tiempo se aspiraba cuidadosamente la capa superficial del medio de cultivo con una pipeta Pasteur.

Se estudió la relación entre los parámetros seminales en fresco y tras lavado obtenidos en hombres positivos para VIH, VHC, VHB y los marcadores de enfermedad de VIH (contaje de células CD4, carga viral y duración de la enfermedad), la carga viral de VHC y la carga viral de VHB.

4.2.3 Swim-up.

En las parejas con mujer inmunizada para VHB y en el grupo control la técnica de preparación de espermatozoides utilizada fue swim-up, tal y como se ha explicado en la sección anterior. La muestra era utilizada en fresco para TRA.

4.3 Control de calidad externo para la cuantificación de VIH ARN.

4.3.1 Laboratorios.

Con objeto de analizar la variabilidad entre laboratorios en la determinación de ARN-VIH en semen, se realizó un control de calidad externo organizado por CREAThE. Consistió en un estudio no experimental analítico en el que participaron dieciocho laboratorios. 15 pertenecían a países europeos, Francia (7), Bélgica (2), España (2), Dinamarca (1), Italia (1), Suiza (1), Reino Unido (1), dos de Israel y otro de Australia. Todos estos laboratorios realizaban rutinariamente determinación de VIH-1 en muestras de semen y proveían TRA a parejas serodiscordantes para VIH.

4.3.2 Panel de muestras.

Los paneles de muestras fueron preparados en el laboratorio de andrología y en el laboratorio de virología del centro coordinador (Toulouse University Hospital, France). Ese día, diez hombres que habían dado su consentimiento informado, seronegativos para VIH proporcionaron muestras de semen al laboratorio de andrología. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio dentro de las 3 horas siguientes a la recogida y mezcladas para conseguir un volumen y recuento seminal suficiente. El plasma seminal se obtuvo mediante centrifugación a 11000 g de una parte del pool de semen y los espermatozoides se obtuvieron de la otra parte del pool de semen mediante centrifugación a 300 g y posterior resuspendido del botón celular en PBS. El plasma seminal procesado (alícuotas de 450 μ L) y los espermatozoides recogidos (5×10^6 /vial) fueron alícuotados en viales de 1,5 mL, donde se le añadió el virus VIH-1. El VIH-1 (subtipo B) utilizado fue un estándar cuantificado que provee el Instituto Nacional de Estándares y Control Biológico (NIBSC) de Reino Unido, que era diluido en el plasma obtenido de hombres seronegativos para obtener concentraciones adecuadas de ARN VIH-1 en 50 μ L. A cada centro se le mandaron dos paneles de muestras con una concentración de virus desconocida para ellos. El primero contenía 6 muestras de 500 μ L de plasma seminal nombrados QC-PLS-01 hasta el 06, que contenían 0, 100, 200, 500, 500 y 1000 copias de ARN VIH-1 por mL. El segundo panel contenía 5 botones celulares de 5×10^6 células seminales, marcadas como QC-

CEL-01 hasta el 05, que contenían 0, 100, 200, 500 y 1000 copias de ARN por cada 10^6 células. Todas las muestras fueron congeladas y almacenadas a -80°C . Se enviaron a los laboratorios participantes en hielo seco. Todos los paneles se recibieron congelados. Las muestras fueron testadas por cada laboratorio de igual forma que se hacía rutinariamente para las muestras de semen provenientes de hombres infectados con VIH.

4.4 Resultados de estimulación ovárica e ICSI en parejas con varones con EIT.

Se diseñó un estudio no experimental, analítico, de casos y controles, con sentido retrospectivo de parejas con hombre seropositivo para VIH, VHC o VHB que se sometieron a un tratamiento de reproducción asistida en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves entre noviembre de 2005 y diciembre de 2009.

Se analizaron las siguientes características de las parejas: edad, estado serológico, carga viral, recuento de linfocitos CD4 en caso de VIH y tratamiento antirretroviral.

Los protocolos de estimulación ovárica en estas parejas se establecieron en función de los datos clínicos, la edad de la paciente, perfil hormonal y los resultados obtenidos en estimulaciones previas. Los dos protocolos utilizados fueron:

- Protocolo con agonistas de la GnRH (“análogo largo”). Consiste en administrar desde el día 22 del ciclo 0,1 mg/día de análogo de la GnRH (Decapeptyl 0,1; Lasa, Barcelona, España) hasta el día en que se inicia la administración de gonadotrofina, en el que se reduce la dosis al 50% hasta el día de la hCG. Tras 10-14 días de administración del agonista se procede a comprobar la frenación hipofisaria mediante ecografía vaginal ovárica (ausencia de folículos y quistes) y determinación sérica de estradiol (<50 pg/mL). Si se confirma dicha hipofisectomía médica se comienza a administrar 300 UI de FSH recombinante (FSHr) al día (Gonal F, Serono, Madrid, España; o Puregón, Organón, Barcelona, España) durante dos días, y 150 UI de FSHr desde el 3º al 7º día. En este día se realiza control ecográfico del desarrollo folicular y determinación sérica de estradiol con el fin de ajustar nuevamente la dosis de FSHr a cada paciente.

- Protocolo con antagonistas de la GnRH. Se inicia el día 2º del ciclo con 300 UI de FSHr, el 3º día del ciclo se administra igual dosis y a partir del 4º día del ciclo se administra 150 UI de FSHr. A partir del día 6º se administra 0,25 mg/día de antagonista Cetrorelix (Cetrotide; Serono Laboratorios SA, Aubonne, Switzerland) o ganirelix (Orgalutran; Organon Laboratorios, Oss, The Netherlands). El día 9º se realiza control ecográfico del desarrollo folicular y determinación sérica de estradiol con el fin de ajustar nuevamente la dosis de FSHr a cada paciente.

Normalmente el primer ciclo fue realizado con el protocolo de análogo largo y el segundo ciclo con antagonistas de la GnRH. Los ciclos eran monitorizados mediante exámenes transvaginales con ultrasonidos y mediciones de los niveles séricos de estradiol.

Una vez que la respuesta folicular es adecuada (más de 3 folículos ováricos mayores de 17 mm de diámetro) se procede a desencadenar la ovulación mediante 250 microgramos de coriogonadotrofina alfa recombinante (r-hCG) (Ovitrelle, Serono, Madrid, España). A las 34-36 horas después, se realizaba la punción folicular guiada con ultrasonidos. Los ovocitos recogidos eran incubados en G-IVF Plus suplementado con HSA (Vitrolife, Göteborg Sweden) y posteriormente los ovocitos maduros que habían extruido su primer corpúsculo polar eran microinyectados con espermatozoides móviles seleccionados, como se ha comentado en las secciones 4.2.2 y 4.2.3. Este procedimiento se realizó como previamente ha sido descrito (Palermo et al., 1995).

Los embriones fueron incubados (37°C, 6,3% CO₂) en G-1 Plus suplementado con HSA (Vitrolife, Göteborg Sweden) en incubadoras independientes del resto de parejas infértiles y seronegativas que acuden a nuestro centro. La transferencia embrionaria tuvo lugar en día 2-3 en Embryogluce (Vitrolife, Göteborg Sweden). A la mujer se le administro Progesterona (400 mg/día) y ácido fólico (0,4 mg/día) a partir del día de la punción, y se le indicaba que debía mantenerlo hasta que le fuera comunicado.

En caso de haber embriones sobrantes, estos eran vitrificados en día+3 para futuras transferencias. La vitrificación se realizó con los medios de vitrificación Medicult Vitrification Cooling (Origio, Måløv, Denmark), tras un doble lavado en medio G-MOPS (Vitrolife, Göteborg Sweden) se dejaban 6 minutos en medio Equilibration, trascurrido este tiempo los embriones eran depositados en el sistema

McGill Cryoleaf contenidos en medio Vitrification (Origio, Måløv, Denmark). La desvitrificación se realizó con los medios de desvitrificación Medicult Vitrification Warming (Origio, Måløv, Denmark), el protocolo consiste en sumergir el crioleaf en medio Warming y una vez recuperado el/los embrión/es se dejaba durante 3 min en medio DM1 y posteriormente este mismo tiempo en medio DM2. Después de eso los embriones eran lavados en medio Washing y en G2 Plus (Vitrolife, Göteborg Sweden). La transferencia embrionaria se realizaba el día siguiente a la descongelación, siempre y cuando el embrión hubiera mostrado signos de evolución.

Se anotaron posibles complicaciones tales como el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). La gestación clínica fue considerada como la visualización ultrasonográfica de uno o más sacos gestacionales o signos clínicos definitivos de la presencia de gestación tal y como describe el Comité Internacional de Monitorización de las Técnicas de Reproducción Asistida (ICMART) (Zegers-Hochschild et al., 2009). Se consideró parto la expulsión o extracción de uno o más fetos de la madre una vez completadas las 20 semanas de gestación, y nacido vivo la expulsión o extracción completa de su madre, como fruto de la fecundación, independientemente de la duración de la gestación, el cual, después de la separación respiró o mostró alguna otra evidencia de vida tales como latido cardiaco, pulsaciones del cordón umbilical o movimiento de los músculos voluntarios, independientemente de que el cordón umbilical hubiera sido cortado o la placenta permaneciese unida (Zegers-Hochschild et al., 2009).

4.4.1 Calidad embrionaria y ovocitaria.

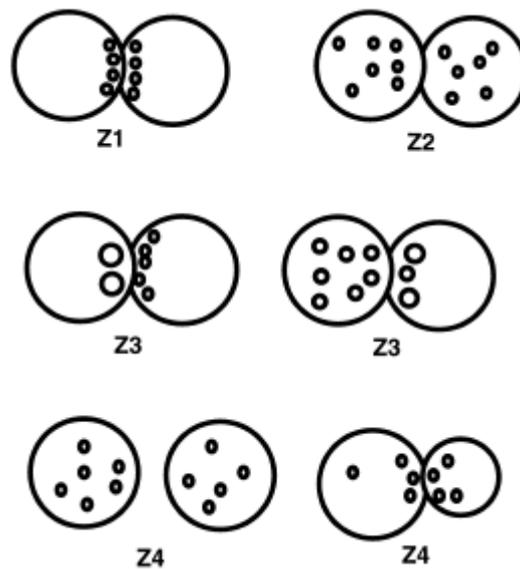
Para realizar ésta valoración y de esta manera transferir el/los mejores embriones, se evaluaron los ovocitos y los siguientes estadios del desarrollo: cigoto, división temprana, segundo día (D+2) y tercer día de cultivo (D+3) en caso de que la transferencia se realice en D+3, siguiendo las recomendaciones de ASEBIR (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción) (Arday et al., 2008).

En el ovocito se evaluaron las posibles alteraciones citoplasmáticas como granulosidad central, agregación del retículo endoplasmático liso y vacuolas e inclusiones citoplasmáticas, así como las alteraciones morfológicas extracitoplasmáticas como exudados en el espacio perivitelino, anomalías de la

zona pelúcida, espacio perivitelino aumentado y alteraciones del primer corpúsculo polar.

En el cigoto (16-19 horas post-ICSI) se evaluó la fecundación mediante: número de corpúsculos polares (CP) y apariencia, número pronuclear, apariencia de los pronúcleos (PN) según la clasificación de Scott et al. (2000) (Figura 17) y presencia de halo citoplasmático.

Figura 17: Esquema de gradación pronuclear propuesto por Scott (2000).



En D+1 también se evaluó la división temprana a las 25-27 horas. En D+2 (44-47 horas post inseminación) y D+3 (67-71 horas post inseminación) se tuvo en cuenta: número celular, simetría celular, sincronía de división celular, el porcentaje y tipo de fragmentación, la desigualdad de los blastómeros, anillo acitoplasmático, presencia de vacuolas, grado de compactación temprana, moteado y grado de multinucleación.

La clasificación utilizada es una combinación entre las descritas por Rijnders y Jansen (1998) y Veeck (1999). Se establecen 5 grupos en función de la simetría celular y el porcentaje de fragmentación:

- Tipo I: blastómeras semejantes y porcentaje de fragmentación menor del 20%.

- Tipo II: blastómeras semejantes y porcentaje de fragmentación mayor del 20%.
- Tipo III: blastómeras de diferente tamaño y porcentaje de fragmentación menor del 20%.
- Tipo IV: blastómeras semejantes y porcentaje de fragmentación mayor del 20%.
- Tipo V: pocas blastómeras de cualquier tamaño y fragmentación mayor del 50%.

4.4.2 Test de seroconversión.

La carga viral en sangre de las mujeres sometidas a TRA con semen de varón con EIT fue analizada usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a las 3 semanas, 3 meses y 6 meses después de la TRA. Si la mujer quedó embarazada la carga viral en sangre se testó cada 2 meses y se realizaron serologías cada 3 meses. Los niños fueron evaluados al nacer y a los 3 meses de edad.

5. Método estadístico.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este estudio se realizó mediante los paquetes estadísticos SPSS 15.0 para Windows. (SPSS Inc., Chicago, USA) y MedCalc 12.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), dándose los siguientes pasos:

a. Análisis descriptivo.

Para describir las variables cualitativas se utilizó el valor absoluto y relativo. Para el porcentaje de inmigrantes atendidos en la unidad de reproducción durante el periodo de estudio se calculó el intervalo de confianza al 95% mediante el método exacto. Las variables cuantitativas se describieron utilizando la media, desviación estándar (SD), valor máximo y mínimo.

b. Estudio de normalidad de las variables.

Para comprobar si las variables seguían una distribución normal se utilizó el test de Shapiro-Wilk, rechazándose la hipótesis de normalidad por debajo de un $p < 0,05$.

c.- Comparación de variables cualitativas entre grupos.

Para la comparación de variable cualitativas entre grupos se utilizo el test chi-cuadrado y en caso de no cumplirse las condiciones de validez de esta test se utilizó el test de Fisher. Al haber un número muy grande de comparaciones, se realizó una penalización de la significación (corrección de Bonferroni), dándose como significativas solo aquellas que lo fueran por debajo de un $p < (0,05/n^\circ$ de comparaciones).

d.- Comparación de variables cuantitativas entre grupos.

Para la comparación de variables cuantitativas, que se ajustaban a una distribución normal, entre dos grupos realizamos el test de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas. Si dicho test resultaba significativo se realizaba el test de Welch, y si el test de Levene resultaba no significativo se calculaba la t de Student clásica.

La comparación entre variables cuantitativas, que seguían una distribución normal, entre tres o más grupos se realizó mediante el análisis de la varianza de una vía. Cuando este resultaba significativo se analizaban las diferencias entre las medias de cada grupo. Para ello, y dado que el tamaño muestral era diferente en cada grupo se utilizó el método de Bonferroni, aplicándose el método secuencial de Newman y Keuls.

La comparación de variables cuantitativas que no seguían una distribución normal o en las que alguno de los grupos a comparar presentaba una $n < 10$, se realizó mediante técnicas no paramétricas. En el caso de la comparación de dos grupos se utilizo la prueba U de Mann-Whitney. Dado el elevado número de comparaciones se aplico la corrección de Bonferroni al nivel de significación, considerando significativa $p < (0,05/n^\circ$ de comparaciones). Para la comparación de tres o más grupos se aplicó el test Kruskal-Wallis, y en caso de resultar significativo se analizaron las diferencias entre grupos.

e.- Correlaciones.

Se calcularon para comprobar si dos variables aleatorias x e y obtenidas en n individuos están relacionadas. Dado que parte de las variables cuantitativas analizadas no seguían una distribución normal se optó por el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman, dándose la significación de cada uno de estos coeficientes con una precaución (corrección de Bonferroni): al haber un número muy grande de correlaciones, se realizó una penalización de la significación, dándose como significativas solo aquellas que lo fueran por debajo de un $p < (0,05/ n^{\circ} \text{ de correlaciones})$.

f.- Validez de los test de cuantificación de VIH en semen.

Los análisis globales de los resultados de todos los laboratorios y los parámetros estadísticos están expresados en Log₁₀ copias/mL (o 10^6 células). Los parámetros presentados son medias, desviaciones estándar y el coeficiente de variación. El test de la chi-cuadrado se utilizó para comparar las frecuencias de detección de los diferentes ensayos.

RESULTADOS

1. Opciones reproductivas escogidas por parejas con al menos un miembro positivo para VIH.

De las 132 parejas que acudieron regularmente a consulta en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada para su seguimiento entre 2004 y 2009, 29 parejas (22%) mostraron deseos reproductivos (o llegaron embarazadas a consulta). Un 75,9% (22) de las parejas escogieron la reproducción natural como opción reproductiva, un 17,2% (5) eligieron someterse a un tratamiento de reproducción asistida y se desconoce la opción escogida por un 6,9% (2) de las parejas (Tabla 17). El tiempo medio de seguimiento de estas parejas desde que manifestaron sus deseos reproductivos fue de 36 meses (3-68 meses).

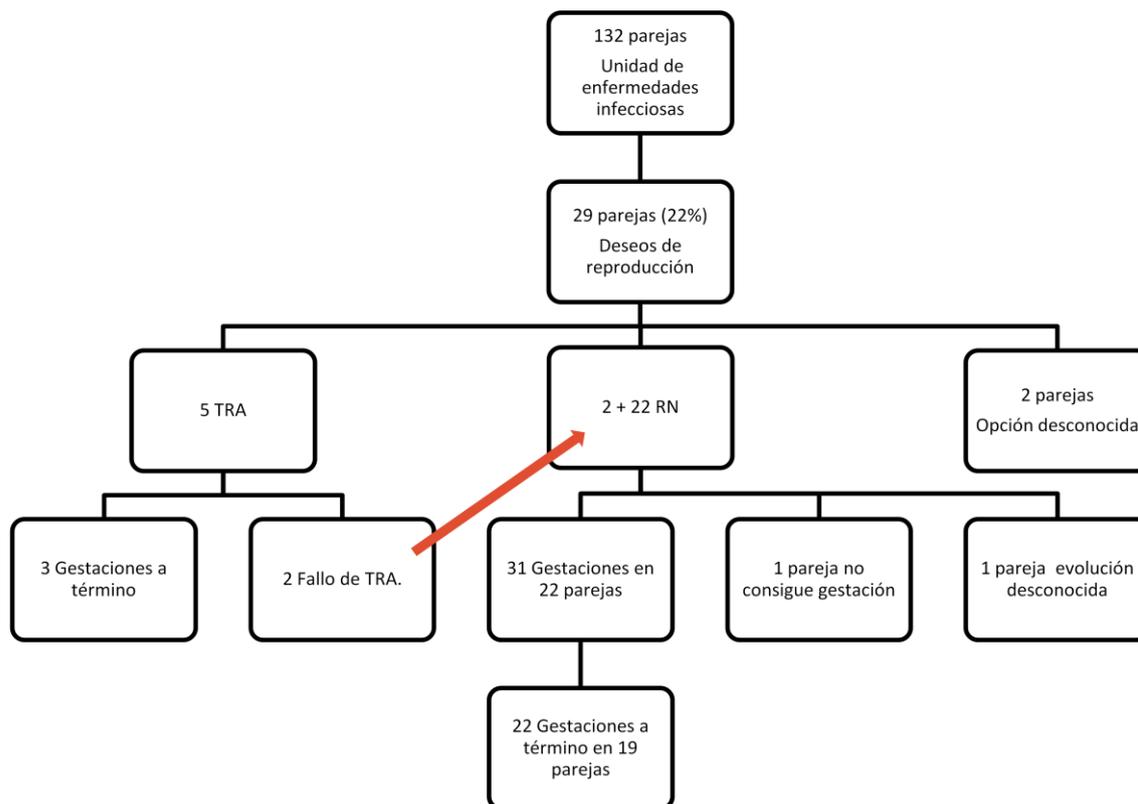
De las 5 parejas que inicialmente intentaron tener descendencia mediante TRA, 2 (40%) parejas fracasaron en su intento y lo intentaron posteriormente mediante RN. Por lo que finalmente 24 parejas intentaron RN, se consiguieron 31 gestaciones en 22 parejas que dieron lugar a 22 nacidos vivos en 19 parejas (Figura 18). Una de las 24 parejas (4,2%) no consiguió gestación, y la otra pareja tuvo evolución desconocida.

1.1 Características sociodemográficas y hábitos tóxicos.

La edad media de los hombres fue de $38,2 \pm 7,5$ años, y la de las mujeres era $32,9 \pm 5,7$ años en las parejas que optaron por RN. En las parejas que se decidieron por TRA la edad media del hombre fue de $39,2 \pm 5,8$ años y de la mujer $34,6 \pm 4,6$ años. No se encontró ninguna diferencia significativa en las características sociodemográficas ni en los hábitos tóxicos entre las parejas que optaban por RN y las que optaban por TRA (Tabla 18). Si se encontró en parejas de RN, que en los varones seropositivos para VIH era más frecuente haber consumido drogas en el pasado, sobre todo drogas vía parenteral, que en mujeres seropositivas para VIH (83,3% vs. 37,5%; $p < 0,05$).

1.2 Características de la infección VIH.

No se observaron diferencias significativas en el tiempo que llevaban diagnosticados de VIH los pacientes, en el modo de infección, en la carga viral basal, ni en las CD4 Nadir, entre el grupo que escogió RN y el que escogió TRA (Tabla 19).

Figura 18: Opciones reproductivas y resultados en parejas con al menos un miembro seropositivo para VIH.**Tabla 17: Deseos de reproducción y opción reproductiva en parejas con al menos un miembro de la pareja seropositivo para VIH.**

	Hombre VIH		Mujer VIH		Ambos VIH		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Nº parejas	65		34		33		132	
Deseos de reproducción	10	(15,4)	9	(26,5)	10	(30,3)	29	(22,0)
<i>RN</i>	6	(60)	8	(88,9)	8	(80)	22	(75,9)
<i>TRA</i>	3	(30)	1	(11,1)	1	(10)	5	(17,2)
<i>Desconocido</i>	1	(10)			1	(10)	2	(6,9)

Tabla 18: Características sociodemográficas y hábitos tóxicos de las parejas con al menos un miembro seropositivo para VIH que optaron por RN o por TRA.

	RN						TRA					
	Hombre (n=22)		Mujer (n=22)		Total (n=44)		Hombre (n=5)		Mujer (n=5)		Total (n=10)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Edad (años), media ± SD	38,2 ± 7,5		32,9 ± 5,7		35,6 ± 7,1		39,2 ± 5,8		34,6 ± 4,6		36,9 ± 5,5	
<25	1	(4,5)	3	(13,6)	4	(9,1)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
25-29	2	(9,1)	4	(18,2)	6	(13,6)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
30-35	4	(18,2)	6	(27,3)	10	(22,7)	2	(40)	3	(60)	5	(50)
>35	15	(68,2)	9	(40,9)	24	(54,5)	3	(60)	2	(40)	5	(50)
VIH positivo	12/22	(54,5)	16/22	(72,7)	28/44	(63,6)	4/5	(80)	2/5	(40)	6/10	(60)
Hepatitis C	8/22	(36,4)	5/22	(22,7)	13/44	(29,5)	3/5	(60)	2/5	(40)	5/10	(50)
Hepatitis B	2/22	(9,1)	0/22	(0)	2/44	(4,5)	0/5	(0)	0/5	(0)	0/10	(0)
Tabaco	7/12	(58,3)	11/16	(68,8)	18/28	(64,3)	3/4	(75)	1/2	(50)	4/6	(66,7)
Abuso alcohol	2/12	(16,7)	1/16	(6,3)	3/28	(10,7)	0/4	(0)	0/2	(0)	0/6	(0)
Consumo pasado de drogas	10/12	(83,3)	6/16 ^a	(37,5)	16/28	(57,1)	4/4	(100)	0/2	(0)	4/6	(66,7)
<i>Inyectadas</i>	8/10	(80)	4/6	(66,7)	12/16	(75)	1/4	(25)			1/4	(25)
<i>Sí, pero nunca inyectadas</i>	2/10	(20)	2/6	(33,3)	4/16	(25)	3/4	(75)			3/4	(75)
Consumo actual de drogas	1/12	(8,3)	2/16	(12,5)	3/28	(10,7)	0/4	(0)	0/2	(0)	0/6	(0)
<i>Inyectadas</i>	0/1	(0)	0/2	(0)	0/3	(0)						
<i>Sí, pero nunca inyectadas</i>	1/1	(100)	2/2	(100)	3/3	(100)						
Metadona	5/12	(41,7)	1/16	(6,3)	6/28	(21,4)	0/4	(0)	0/2	(0)	0/6	(0)

^a p<0,05 Hombre vs. Mujer.

Tabla 19: Características de la infección por VIH en las parejas con al menos un miembro seropositivo para VIH que optaron por RN o por TRA.

	RN						TRA					
	Hombre (n=12)		Mujer (n=16)		Total (n=28)		Hombre (n=4)		Mujer (n=2)		Total (n=6)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Diagnostico de VIH (años), media ± SD	11,3 ± 6		7,9 ± 5,8		9,7 ± 6,0		8,3 ± 3,0		11,5 ± 4,9		9,3 ± 3,6	
<5	1	(8,3)	7	(43,8)	8	(28,6)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
5-10	4	(33,3)	3	(18,8)	7	(25)	4	(100)	1	(50)	5	(83,3)
>10	7	(58,3)	6	(37,5)	13	(46,4)	0	(0)	1	(50)	1	(16,7)
Modo infección												
Sexual	4/12	(33,3)	12/16	(75)	16/28	(57,1)	3/4	(75)	2/2	(100)	5/6	(83,3)
Drogas vía parenteral	8/12	(66,7)	3/16	(18,8)	11/28	(39,3)	1/4	(25)	0/2	(0)	1/6	(16,7)
Sexual/DVP	0/12	(0)	1/16	(6,3)	1/28	(3,6)	0/4	(0)	0/2	(0)	0/6	(0)
Desconocido	0/12	(0)	0/16	(0)	0/28	(0)	0/4	(0)	0/2	(0)	0/6	(0)
Carga viral basal (copias/mL)												
<50	1/12	(8,3)	1/16	(6,3)	2/28	(7,1)	0/4	(0)	0/2	(0)	0/6	(0)
50-10000	4/12	(33,3)	6/16	(37,5)	10/28	(35,7)	3/4	(75)	1/2	(50)	4/6	(66,7)
>10000	7/12	(58,3)	9/16	(56,3)	16/28	(57,1)	1/4	(25)	1/2	(50)	2/6	(33,3)
CD4 Nadir												
<200	9/12	(75)	5/16	(31,3)	14/28	(50)	2/4	(50)	2/2	(100)	4/6	(66,7)
200-500	3/12	(25)	10/16	(62,5)	13/28	(46,4)	2/4	(50)	0/2	(0)	2/6	(33,3)
≥500	0/12	(0)	1/16	(6,3)	1/28	(3,6)	0/4	(0)	0/2	(0)	0/6	(0)

2. Asunción de riesgos en parejas con varón seropositivo para VIH que demandan atención reproductiva.

De las 21 nuevas parejas a las que se les propuso realizar la encuesta, 16 parejas aceptaron realizarla. De estas, 2 entrevistas resultaron incompletas o no válidas, y 14 entrevistas fueron válidas. En el grupo control aceptaron hacer la entrevista 17 de las 35 parejas a las que se les ofreció y de ellas 14 entrevistas fueron válidas y 3 no válidas o incompletas. Ambos grupos tenía características clínicas similares, tal y como se detalla en la Tabla 20. En las 14 parejas el varón era seropositivo para VIH y la mujer seronegativa. Un 57,1% (8) de las parejas con VIH habían tenido RN previas sin protección.

En la Tabla 21 están reflejados los riesgos de transmisión máximos que eran capaces de asumir cada miembro de la pareja mediante TRA y manteniendo relaciones naturales. Un mayor porcentaje de parejas con varón seropositivo para VIH asumieron un riesgo de transmisión mayor a 0%, frente a las parejas control, tanto si se le ofrecía TRA (42,9% vs. 14,3%, $p < 0,05$) como RN (21,4% vs. 0%, $p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres, en ninguno de los dos grupos analizados, en el riesgo de transmisión que eran capaces de asumir tanto para reproducción asistida como para reproducción natural. Aunque si se observó una tendencia de las mujeres a asumir mayores riesgos que los hombres. Por otra parte, se observa también que las parejas asumen más riesgos cuando se van a someter a TRA que cuando van a mantener RN (28,6% miembros de parejas que asumen más del 0% en TRA vs. 10,7% miembros de parejas que asumen más del 0% en RN; $p < 0,05$). Sólo 2 mujeres (14,3%), y ningún hombre aceptaron un riesgo máximo de 10% mediante TRA, y una (7,14%) de ellas aceptó también el 10% mediante RN, esta mujer finalmente quedó gestante mediante RN antes de haber iniciado las TRA.

Tabla 20: Características de los grupos analizados en el estudio de asunción de riesgos en parejas con varón seropositivo para VIH que demandan atención reproductiva.

	VIH (n=14)		CONTROL (n=14)	
	media	SD	media	SD
Edad varón	42,3 ± 2,9		42 ± 2,6	
Edad mujer	35,5 ± 2,6		35 ± 2,8	
Años esterilidad	4,5 ± 0,7		3,5 ± 0,7	
Abortos, n (%)	2	(14,3)	2	(14,3)
Varón con hijos previos, n (%)	6	(42,9)	3	(21,4)
Mujer con hijos previos, n (%)	0		0	
Relaciones naturales previas	8	(57,1)	14	(100)

NS

Tabla 21: Riesgos de transmisión asumibles por las parejas con varón seropositivo para VIH que demandan atención reproductiva.

REPRODUCCIÓN ASISTIDA										
Riesgo (%)	VIH (n=28)					CONTROL (n=28)				
	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer	Total	
0	10 (71,4)	6 (42,9)	16 (57,1)	13 (92,9)	11 (78,6)	24 (85,7) ^a				
0,5 - 3	2 (14,3)	2 (14,3)	4 (14,3)	1 (7,1)	3 (21,4)	4 (14,3)				
>3	2 (14,3)	6 (42,9)	8 (28,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)				

REPRODUCCIÓN NATURAL										
Riesgo (%)	VIH (n=28)					CONTROL (n=28)				
	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer	Total	
0	12 (85,7)	10 (71,4)	22 (78,6)	14 (100)	14 (100)	28 (100) ^b				
0,5 - 3	2 (14,3)	2 (14,3)	4 (14,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)				
>3	0 (0)	2 (14,3)	2 (7,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)				

^a p<0,05 Porcentaje de miembros de parejas con varón seropositivo para VIH que asume un riesgo mayor del 0% en TRA vs. porcentaje de miembros de parejas con ambos miembros seronegativos para VIH que asume un riesgo mayor del 0% en TRA.

^b p<0,05 Porcentaje de miembros de parejas con varón seropositivo para VIH que asume un riesgo mayor del 0% en RN vs. porcentaje de miembros de parejas con ambos miembros seronegativos para VIH que asume un riesgo mayor del 0% en RN.

3. Reproducción natural en parejas con VIH.

Se analizaron 22 parejas que entre enero de 2004 y diciembre de 2009 decidieron tener descendencia mediante reproducción natural: en 7 (31,8%) de estas parejas el hombre era el miembro de la pareja seropositivo para VIH, en 7 (31,8%) era la mujer y en 8 (36,4%) ambos eran seropositivos. Estas parejas dieron lugar a 31 gestaciones de las que nacieron 22 niños en 19 parejas.

3.1 Características de la infección VIH.

Se recogieron las características de la enfermedad en cada gestación de 13 varones y 15 mujeres seropositivas para VIH. De las 31 gestaciones, en 20 el hombre era seropositivo para VIH y en 19 gestaciones era la mujer. Un 69,2% (9) de los hombres y 33,3% (5) de las mujeres habían sido diagnosticadas de SIDA. También eran seropositivos para VHC un 36,4% (8) de los hombres y un 18,2% (4) de las mujeres.

No hubo diferencias entre sexos en ninguno de los parámetros estudiados: diagnóstico de SIDA, recuento de células CD4 y carga viral (Tabla 22). Se aprecia que no hay influencia aparente de la TARGA sobre el número de pacientes en los que la infección por VIH había derivado en síndrome de inmunodeficiencia, ni sobre el recuento de células CD4 que había tenido el paciente en la revisión más próxima a la concepción. Sin embargo, si existe diferencia en la carga viral en sangre de ARN VIH en la revisión más próxima a la concepción, donde era más frecuente cargas virales no detectables en pacientes que tenían buena adherencia al tratamiento frente a los que no tomaban tratamiento, tanto en varones (100% vs. 25%; $p < 0.01$), como en mujeres (72,7% vs. 12,5%; $p < 0,05$).

Una mujer seronegativa inicialmente, fue diagnosticada de seropositiva para VIH en un embarazo, su pareja no seguía tratamiento, a pesar de habersele indicado, y tenía una carga viral de 5580 copias/mL en la revisión más próxima a la concepción. Esto supone un 8,3% (1/12) de tasa de seroconversión en gestaciones con mujeres seronegativas para VIH. No se produjo ninguna seroconversión en hombres seronegativos para VIH.

3.2 Resultados obstétricos y neonatales de los partos.

Tuvieron lugar 31 gestaciones, de las cuales 22 terminaron en parto y las 9 restantes en aborto, 8 (25,8%) de ellos fueron espontáneos y uno (3,2%) interrupción voluntaria del embarazo. De las 31 gestaciones, en 12 gestaciones (38,7%) era seropositivo para VIH el hombre de la pareja, en 11 (35,5%) la mujer, y en 8 (25,8%) eran seropositivos ambos. Respecto a los abortos espontáneos 5 (62,5%) tuvieron lugar en parejas con varón seropositivo para VIH y los 3 restantes en mujeres seropositivas (37,5%).

En 15 de estos partos la mujer era seropositiva para VIH. En la Tabla 23 se muestran los resultados de estos 15 partos y en la Tabla 24 los resultados de los 22 partos en las que al menos uno de los miembros de la pareja era seropositivo para VIH.

Entre las 15 mujeres seropositivas para VIH estudiadas, la edad media fue de $31,2 \pm 5,3$ años, muy similar a los $31,1 \pm 4,5$ años de los controles. Las mujeres seropositivas para VIH tenía un mayor porcentaje de antecedentes de abortos, un 73,3% frente al 26,7% del grupo control ($p < 0,05$).

En los dos grupos la mayor parte de las mujeres se realizó cardiotocografía (CTG) durante el parto y la bolsa amniótica fue rota intraparto. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en el tipo de presentación, comienzo y finalización del parto, indicación de la inducción, de la operatoria vaginal y de la cesárea, ni en el tipo de anestesia utilizada.

En lo que se refiere a los datos neonatales se observaron un menor peso ($2651,3 \pm 573$ gramos vs. $3400 \pm 459,9$ gramos; $p < 0,001$) y partos más prematuros ($263,8 \pm 23,6$ días vs. $278,1 \pm 8,1$ días; $p < 0,05$) en los recién nacidos que procedía de madres seropositivas para VIH, frente a los controles. Hubo también diferencias significativas en el color del líquido amniótico, siendo más frecuente el hallazgo de líquido meconial en los hijos de madres con VIH (40% vs. 0%; $p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas en el índice de Apgar de los recién nacidos, la morbilidad, pH arterial ni en el porcentaje de recién nacidos con un percentil menor de 10 o mayor de 90. Aunque no se pudieron obtener los resultados de todas las parejas en cuanto al análisis del estreptococo grupo B, los obtenidos no presentaron diferencias entre grupos.

Los hijos de madres seropositivas requirieron más cuidados neonatales que los hijos de las parejas control (100% vs. 20%; $p < 0,001$), que pudieron quedarse mayoritariamente con la madre en la zona de partos.

Al analizar los partos de las parejas con al menos un miembro positivo para VIH también se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de mujeres con antecedentes de abortos (59,1% vs. 18,2; $p < 0,05$), en el peso del recién nacido ($2825,0 \pm 569,4$ gramos vs. $3356,6 \pm 455,6$ gramos; $p < 0,01$), días de gestación del parto ($265,4 \pm 19,5$ días vs. $276,3 \pm 8,8$ días; $p < 0,05$). Los hijos de parejas con VIH requirieron también más cuidados neonatales tras el parto que los hijos de las parejas control (95,5% vs. 27,3%; $p < 0,001$).

No se encontró ninguna seroconversión en ninguno de los recién nacidos (testados al nacimiento y a los 3 meses de edad).

Tabla 22: Datos referentes al VIH en la revisión más próxima a la concepción en función de la TARGA en parejas con al menos un miembro seropositivo para VIH que conciben mediante RN.

	Hombre (n=20)						Mujer (n=19)					
	Total		No TARGA		TARGA		Total		No TARGA		TARGA	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Recuento de células CD4 en la concepción												
<200	3	(15)	2	(16,7)	1	(12,5)	1	(5,3)	0	(0)	1	(9,1)
200-500	10	(50)	8	(66,7)	2	(25,0)	9	(47,4)	5	(62,5)	4	(36,4)
>500	7	(35)	2	(16,7)	5	(62,5)	9	(47,4)	3	(37,5)	6	(54,5)
ARN VIH (copias por mL) en la concepción												
ARN VIH No detectable	11	(55)	3	(25,0)	8	(100) ^a	9	(47,4)	1	(12,5)	8	(72,7) ^b
<100	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
100-10000	4	(20)	4	(33,3)	0	(0)	8	(42,1)	6	(75)	2	(18,2)
>10000	5	(25)	5	(41,7)	0	(0)	2	(10,5)	1	(12,5)	1	(9,1)

^a p<0,01 No TARGA vs TARGA.

^b p<0,05 No TARGA vs TARGA.

Tabla 23: Análisis comparativo de los resultados obstétricos y neonatales de los partos en parejas con mujer seropositiva para VIH que conciben mediante RN.

		Control (n=15)		Mujer VIH (n=15)	
		n	%	n	%
Edad	Media ± SD	31,1	± 4,5	31,2	± 5,3
	Rango	(23	- 40)	(24	- 41)
Abortos previos		4	(26,7)	11	(73,3) ^a
Hijos previos		10	(66,7)	8	(53,3)
Bolsa rota	Anteparto	7/15	(46,7)	5/15	(33,3)
	Intraparto	8/15	(53,3)	10/15	(66,7)
CTG		15/15	(100)	13/15	(86,7)
Presentación	Cefálica	15/15	(100)	15/15	(100)
	Nalgas	0/15	(0)	0/15	(0)
Comienzo	Inducido	2/15	(13,3)	4/15	(26,7)
	Espontáneo	13/15	(86,7)	11/15	(73,3)
	Cesárea electiva	0/15	(0)	0/15	(0)
Terminación	Operatoria vaginal	2/15	(13,3)	4/15	(26,7)
	Cesárea	1/15	(6,7)	1/15	(6,7)
	Espontáneo	12/15	(80)	10/15	(66,7)
Indicación inducción					
	Rotura de membranas	1/2	(50)	2/4	(50)
	Oligoamnios	1/2	(50)	0/4	(0)
	Meconio	0/2	(0)	1/4	(25)
	Test no estresante patológico	0/2	(0)	1/4	(25)
Indicación operatoria vaginal					
	Acortamiento en expulsivo	2/2	(100)	3/4	(75)
	Riesgo de pérdida de bienestar fetal	0/2	(0)	1/4	(25)
Indicación cesárea					
	Fracaso inducción	0/1	(0)	0/1	(0)
	Riesgo de pérdida de bienestar fetal	1/1	(100)	0/1	(0)
	No progresión parto	0/1	(0)	1/1	(100)
Anestesia	Sin anestesia	1/15	(6,7)	4/15	(26,7)
	Epidural	11/15	(73,3)	8/15	(53,3)
	Local	3/15	(20)	3/15	(20)
	Raquianestesia	0/15	(0)	0/15	(0)
	General	0/15	(0)	0/15	(0)
Sexo	Varón	7/15	(46,7)	9/15	(60)
	Mujer	8/15	(53,3)	6/15	(40)
Apgar1	<4	0/15	(0)	0/15	(0)
	Rango	(9	- 9)	(6	- 9)
Apgar5	<7	0/15	(0)	1/15	(6,7)
	Rango	(9	- 10)	(7	- 9)
Morbilidad		0/15	(0)	2/15	(13,3)
EGB	Positivo	1/9	(11,1)	3/4	(75)
	Negativo	8/9	(88,9)	1/4	(25)
pH arterial	Media ± SD	7,3	± 0,1	7,3	± 0,1
	Rango	(7,1	- 7,4)	(7,1	- 7,3)
Líquido amniótico					
	Claro	15/15	(100)	9/15	(60) ^a
	Meconial	0/15	(0)	6/15	(40)
Destino recién nacido					
	Con madre partos	12/15	(80)	0/15	(0) ^p
	Cuidados mínimos	3/15	(20)	11/15	(73,3)
	Cuidados medios	0/15	(0)	3/15	(20)
	Cuidados intensivos	0/15	(0)	1/15	(6,7)
Mortalidad		0/15	(0)	0/15	(0)
Peso (gramos)	Media ± SD	3400	± 459,9	2651,3	± 573,0 ^b
	Rango	(2680	- 4240)	(980	- 3510)
Percentil	<10	1/15	(6,7)	3/15	(20)
	>90	2/15	(13,3)	0/15	(0)
Días de gestación	Media ± SD	278,1	± 8,1	263,8	± 23,6 ^a
	Rango	(266	- 290)	(196	- 288)

^a p<0,05 Control vs. Mujer VIH, ^b p<0,001 Control vs, Mujer VIH.

Tabla 24: Análisis comparativo de los resultados obstétricos y neonatales de los partos en parejas con al menos un miembro seropositivo para VIH que conciben mediante RN.

		Control (n=22)		VIH (n=22)	
		n	%	n	%
Edad	Media ± SD	31,9 ± 5,4		32,4 ± 6,1	
	Rango	(20 - 40)		(21 - 41)	
Abortos previos		4	(18,2)	13	(59,1) ^a
Hijos previos		13	(59,1)	11	(50)
Bolsa rota	Anteparto	12/22	(54,5)	6/22	(27,3)
	Intraparto	10/22	(45,5)	16/22	(72,7)
CTG		21/22	(95,5)	15/22	(68,2)
Presentación	Cefálica	21/22	(95,5)	21/22	(95,5)
	Nalgas	1/22	(4,5)	1/22	(4,5)
Comienzo	Inducido	5/22	(22,7)	5/22	(22,7)
	Espontáneo	16/22	(72,7)	14/22	(63,6)
	Cesárea electiva	1/22	(4,5)	3/22	(13,6)
Terminación	Operatoria vaginal	4/22	(18,2)	4/22	(18,2)
	Cesárea	3/22	(13,6)	5/22	(22,7)
	Espontáneo	15/22	(68,2)	13/22	(59,1)
Indicación inducción					
	Rotura de membranas	3/5	(60)	2/5	(40)
	Oligoamnios	1/5	(20)	1/5	(20)
	Hipertensión	1/5	(20)	0/5	(0)
	Meconio	0/5	(0)	1/5	(20)
	Test no estresante patológico	0/5	(0)	1/5	(20)
Indicación operatoria vaginal					
	Acortamiento en expulsivo	3/4	(75)	3/4	(75)
	Riesgo de pérdida de bienestar	1/4	(25)	1/4	(25)
Indicación cesárea					
	Fracaso inducción	1/3	(33,3)	0	(0)
	Riesgo de pérdida de bienestar	2/3	(66,7)	0	(0)
	No progresión parto	0/3	(0)	0	(0)
Anestesia	Sin anestesia	1/22	(4,5)	5/22	(22,7)
	Epidural	16/22	(72,7)	10/22	(45,5)
	Local	3/22	(13,6)	3/22	(13,6)
	Raquianestesia	1/22	(4,5)	3/22	(13,6)
	General	0/22	(0)	1/22	(4,5)
Sexo	Varón	11/22	(50)	11/22	(50)
	Mujer	11/22	(50)	11/22	(50)
Apgar1	<4	0/22	(0)	0/22	(0)
	Rango	(8 - 9)		(6 - 10)	
Apgar5	<7	0/22	(0)	1/22	(4,5)
	Rango	(9 - 10)		(7 - 10)	
Morbilidad		0	(0)	2	(9,1)
EGB	Positivo	1/13	(7,7)	4/9	(44,4)
	Negativo	12/13	(92,3)	5/9	(55,6)
pH arterial	Media ± SD	7,3 ± 0,1		7,3 ± 0,1	
	Rango	(7,1 - 7,4)		(7,1 - 7,3)	
Líquido amniótico					
	Claro	21/22	(95,5)	15/22	(68,2)
	Meconial	1/22	(4,5)	7/22	(31,8)
Destino recién nacido					
	Con madre partos	16/22	(72,7)	1/22	(4,5) ^b
	Cuidados mínimos	5/22	(22,7)	16/22	(72,7)
	Cuidados medios	0/22	(0)	4/22	(18,2)
	Cuidados intensivos	1/22	(4,5)	1/22	(4,5)
Mortalidad		0/22	(0)	0/22	(0)
Peso (gramos)	Media ± SD	3356,6 ± 455,6		2825,0 ± 569,4 ^c	
	Rango	(2510 - 4240)		(980 - 3640)	
Percentil	<10	1/22	(4,5)	3/22	(13,6)
	>90	3/22	(13,6)	0/22	(0)
Días de gestación	Media ± SD	276,3 ± 8,8		265,4 ± 19,5 ^a	
	Rango	(258 - 290)		(196 - 288)	

^a p<0,05 Control vs. pareja con al menos un miembro seropositivo para VIH.

^b p<0,001 Control vs. pareja con al menos un miembro seropositivo para VIH.

^c p<0,01 Control vs. pareja con al menos un miembro seropositivo para VIH.

4. Resultados de Reproducción Asistida en parejas VIH, VHC y VHB.

4.1 Análisis de la demanda.

En la Tabla 25 se presenta el total de parejas con hombre seropositivo para VIH, VHC y/o VHB que han solicitado TRA en nuestro centro, las parejas no incluidas y el motivo de exclusión. En total fueron descartadas 36 parejas: dos hombres consumían drogas de forma activa, tres no tenían adherencia al TARGA, dos hombres tenían alguna infección oportunista, 5 mujeres eran mayores de 40 años y en 24 parejas el semen no fue apto para lavado. No se observaron diferencias significativas en el número de parejas excluidas, ni en el motivo de exclusión.

En la Tabla 26 se observa el número de total de ciclos realizados por año, este número se ha ido incrementando anualmente. El porcentaje medio anual de ciclos realizados en parejas con EIT respecto al total de ciclos realizados en el SSPA fue de 0,69% (excluyendo el año 2005). Como era de esperar la demanda teórica estimada de ciclos de TRA por año en varones con EIT fue mucho mayor a partir de datos de población general que de parejas subfértiles, pues en la primera situación se incluye además de las parejas subfértiles, a las parejas fértiles con esterilidad voluntaria (Tabla 27).

Al comparar la media anual de parejas atendidas en la Unidad de Reproducción con la demanda teórica anual estimada de la población general y de la población subfértil se observa que, en el caso del VIH es una cuarta parte de la estimada de la población general y que se atendió el triple de parejas de las estimadas a partir de la población estéril.

Sin embargo, los ciclos realizados en parejas con hepatitis representan una pequeña parte de los ciclos estimados a partir de la población general y aproximadamente la quinta parte de lo estimado para parejas subfértiles.

4.1.1 Variables que influyen en la demanda.

El porcentaje de varones inmigrantes dentro del grupo de varones con EIT atendidos en nuestra unidad se muestra en la Tabla 28, observándose un porcentaje similar al porcentaje de inmigrantes en los varones con EIT en España.

Aunque se observa una tendencia a un mayor porcentaje de ciclos realizados en parejas con residencia próxima a la Unidad de Reproducción (< 200 km), ésta no fue estadísticamente significativa (Tabla 29).

Tabla 25: Parejas solicitantes de TRA en el HUVN.

	VIH		VHC		VHB		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Parejas solicitantes de TRA	51		36		38		125	
Media anual aprox. (4 años)	13		9		9		31	
Parejas no incluidas	18	(53,3)	15	(41,7)	3	(7,9)	36	(28,8)
<i>Mujer >40 años</i>	1	(5,6)	2	(13,3)	2	(66,7)	5	(13,9)
<i>Abuso drogas</i>	1	(5,6)	1	(6,7)	0	(0)	2	(5,6)
<i>Infección oportunistas</i>	1	(5,6)	1	(6,7)	0	(0)	2	(5,6)
<i>No adherencia a TARGA</i>	3	(16,7)					3	(8,3)
<i>Semen no apto para lavado</i>	12	(66,7)	11	(73,3)	1	(33,3)	24	(66,7)
<i>Semen no apto post-lavado</i>	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)

Tabla 26: Número total de ciclos realizados en el Sistema Sanitario Público de Salud de Andalucía.

Año	Ciclos totales de TRA	Ciclos de TRA realizados a varones con EIT						Total	
		VIH		VHC		VHB		n	%
		n	%	n	%	n	%		
2005	4121	1	(0,02)	0	(0,00)	2	(0,05)	3	(0,07)
2006	5329	9	(0,17)	10	(0,19)	11	(0,21)	30	(0,56)
2007	6314	6	(0,10)	17	(0,27)	12	(0,19)	35	(0,55)
2008	6654	21	(0,32)	7	(0,11)	16	(0,24)	44	(0,66)
2009	6267	24	(0,38)	14	(0,22)	23	(0,37)	61	(0,97)
Total	28685	61	(0,21)	48	(0,17)	64	(0,22)	173	(0,60)

Tabla 27: Demanda teórica anual de parejas con varón con EIT y deseos reproductivos

	Estimación a partir de la población general		Demanda a partir de la población subfértil		Media anual observada parejas solicitantes/año
VIH	49	(4/1)	4	(1/3)	13
VHC	1021	(113/1)	75	(8/1)	9
VHB	484	(54/1)	35	(4/1)	9

Los números entre paréntesis son los ratios pareja teórica/observada (Ej.: una ratio 4/1 significa que por cada 4 parejas que en teoría demandaría atención sólo se atendió una pareja)

Tabla 28: Prevalencia de hombres inmigrantes con EIT atendidos en nuestra Unidad de Reproducción.

	% de inmigrantes en los varones con EIT en España		% de varones inmigrantes atendidos en nuestra Unidad		
VIH	12%	(Castilla and Guevara, 2009)	7/51	13,7%	(5,7-26,2)
VHC	3%	(European Centre for Disease Prevention and Control, 2010)	2/38	5,3%	(0,7-17,8)
VHB	20%	(European Centre for Disease Prevention and Control, 2010)	4/40	10%	(2,8-23,7)

Valores entre paréntesis: IC al 95% del porcentaje de varones inmigrantes atendidos en nuestra Unidad.

Tabla 29: Número de ciclos realizados en parejas con EIT según su localidad de residencia.

	Ciclos VIH		Ciclos hepatitis	
<200km				
Granada	18		32	
Jaén	3		8	
Málaga	14		9	
Almería	3		16	
TOTAL	38	62%	65	58%
>200km				
Córdoba	0		9	
Sevilla	18		15	
Cádiz	2		16	
Huelva	3		7	
TOTAL	23	38%	47	42%

NS

4.2 Calidad seminal y los resultados de lavado de semen en parejas que se someten a TRA.

Se recogieron 116 muestras, de ellas pudieron ser lavadas: 43 que procedían de hombres seropositivos para VIH (29 muestras procedían de hombres que eran también seropositivos para VHC, 2 muestras de hombres positivos para VHB y 2 muestras de hombres positivos para ambos VHC y VHB), 33 que pertenecían a hombres seropositivos para VHC (1 muestra provenía de un hombre también positivo para VHB) y 7 que procedían de hombres seropositivos para VHB. Como hemos comentado anteriormente, no pudieron ser lavadas 33 (28,44%) de estas muestras (procedentes de 27 hombres) debido a que eran sémenes de baja calidad (14 pertenecientes a varones seropositivos para VIH, 18 para VHC y 1 para VHB) y 22 sémenes más tampoco fueron lavados al pertenecer a hombres seropositivos para VHB y estar sus mujeres inmunizadas para esta infección. Ninguna de las muestras lavadas resultó positiva a la detección de partículas víricas post-lavado. No se ha encontrado ninguna diferencia en las características y hábitos tóxicos actuales del varón ni en la proporción de muestras no aptas entre los distintos grupos (Tabla 30).

4.2.1 Características seminales dependiendo de la infección.

La comparación de la calidad de semen entre hombres seropositivos y controles está reflejada en la Tabla 31. No se encontraron diferencias significativas en el volumen seminal, concentración y número de espermatozoides totales en el eyaculado entre varones seropositivos y el grupo control. Estos valores están por encima de valores de referencia considerados por la OMS (1999).

Comparado con el grupo control la movilidad progresiva está disminuida de forma significativa en varones sólo VIH seropositivos ($28,7\% \pm 13,6$ vs $44,7\% \pm 9,5$; $p < 0,001$) y VIH/VHC ($34,5\% \pm 13,7$ vs $44,7\% \pm 9,5$; $p < 0,001$). Las formas normales de los tres grupos con EIT: VIH ($7,5\% \pm 3,0$ vs, $11,2\% \pm 4,5$; $p < 0,001$), VHC ($6,7\% \pm 1,9$ vs, $11,2\% \pm 4,5$; $p < 0,001$) y VHB ($7,8\% \pm 3,7$ vs, $11,2\% \pm 4,5$; $p < 0,01$) está significativamente disminuida respecto al grupo control. En lo que respecta a la concentración post-lavado en hombres con VIH se recuperaba significativamente menos espermatozoides que en hombres con VHC ($3,0 \pm 3,4$ vs, $5,7 \pm 8,0$ millones de espermatozoides por mL; $p < 0,05$).

4.2.2 Correlación entre la infección por VIH y los parámetros seminales.

El test de correlación de Spearman (Tabla 32) demuestra una significativa correlación negativa ($r=-0,72$, $p=0,0001$) entre la duración de la enfermedad y la movilidad no progresiva (C).

La Tabla 33 muestra que no hay ninguna diferencia significativa en ningún parámetro seminal entre muestras de hombres cuyo recuento de células CD4 era menor o mayor de 450 células/ μL en varones positivos para VIH. Tampoco se encontró ninguna diferencia significativa en estos parámetros si el hombre estaba tomando tratamiento antirretroviral de gran actividad, ni si la carga viral era detectable o no.

En cuanto a los varones seropositivos para VHC y VHB, se estudió si existía alguna correlación entre los parámetros seminales y la carga viral sanguínea, no encontrándose ninguna correlación significativa.

Tabla 30: Características y hábitos tóxicos de hombres seropositivos para VIH, VHC y/o VHB.

	VIH			VHC (n=33)	VHB (n= 29)
	VIH (n=12)	VIH/VHC (n=31)	Total VIH (N=43)		
	Media ± SD (min - max)	Media ± SD (min - max)	Media ± SD (min - max)		
Edad (años)	39,6 ± 6,3 (28 - 55)	39,8 ± 5,2 (29 - 50)	39,8 ± 5,6 (28 - 55)	39,7 ± 5,5 (32 - 50)	36,4 ± 3,8 (26 - 44)
Hepatitis C, n (%)			31 (72,1)		
Hepatitis B, n (%)	2 (16,7)	2 (6,5)	4 (9,3)	1 (3,0)	
Diagnostico VIH/VHC/VHB (años)	6,8 ± 4,4 (2 - 14)	14,7 ± 5,4 (7 - 25)	6,5 ± 2,1 (5 - 8)	17,0 ± 6,1 (10 - 21)	10,3 ± 8,5 (4 - 20)
En tratamiento con TARGA, n (%)	9 (75)	26 (83,9)	35 (81,4)		
Tratamiento para VHC, n (%)		5 (16,1)	5 (16,1)	6 (18,2)	
Tratamiento para VHB, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Carga viral (UI/mL)*	31964,5 ± 60725,0 (139 - 123000)	15550,0 ± 18107,2 (68 - 123000)	23757,3 ± 42401,2 (68 - 123000)	296155,2 ± 3664885,3 (1071 - 15937448)	1837,5 ± 2577,3 (17 - 10481,1)
Carga viral no detectable VIH, n (%)	8 (66,7)	27 (87,1)	35 (81,4)		
Carga viral no detectable VHC, n (%)		8 (25,8)	8 (25,8)	2 (6,1)	
Carga viral no detectable VHB, n (%)	2 (100)	1 (50)	3 (75)	0 (0)	7 (24,1)
Recuento de células CD4(mm3)	699,5 ± 377,1 (382 - 1654)	558,1 ± 279,3 (55 - 1013)	595,2 ± 309,4 (55 - 1654)		
Fiebre reciente	2 (16,7)	4 (12,9)	6 (14,0)	4 (12,1)	7 (24,1)
Consumo de tabaco, diario	6 (50)	14 (45,2)	20 (46,5)	12 (36,4)	14 (48,3)
Consumo de alcohol, semanal	4 (33,3)	9 (29)	13 (30,2)	16 (48,5)	16 (55,2)
Características seminales					
Estación					
Octubre-Marzo	4 (33,3)	9 (29,0)	13 (30,2)	20 (60,6)	11 (37,9)
Abril-Septiembre	8 (66,7)	22 (71,0)	30 (69,8)	14 (42,4)	26 (89,7)
Duración de la abstinencia	3,2 ± 0,4 (3 - 4)	3,0 ± 0 (3 - 3)	3,0 ± 0,2 (3 - 4)	2,9 ± 0,3 (2 - 3)	3 ± 0,4 (2 - 4)

* Carga viral de VIH en copias/mL
(valor mínimo- valor máximo)

NS

Tabla 31: Parámetros seminales en función de la enfermedad infecciosa transmisible.

Parámetros seminales	VIH					
	VIH (n=12)	VIH/VHC (n=31)	Total VIH (n=43)	VHC (n=33)	VHB (n=29)	Control (n=45)
	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
Volumen (mL)	2,9 ± 1,5 (1,3 - 6,0)	3,1 ± 1,6 (1,1 - 7,0)	3,1 ± 1,5 (1,1 - 7,0)	2,5 ± 1,3 (0,7 - 6,0)	2,9 ± 1,6 (1 - 6,5)	3,0 ± 1,2 (1,5 - 7,2)
Concentración (10 ⁶ spz/mL)	75,6 ± 92,6 (0,8 - 325,0)	52,6 ± 61,0 (1,5 - 330,0)	59,2 ± 71,0 (0,8 - 330,0)	63,0 ± 60,8 (1,92 - 314,0)	55,4 ± 50,6 (0,6 - 225,0)	52,6 ± 39,8 (10 - 160,0)
Número total de espermatozoides en el eyaculado (10 ⁶ spz)	184,6 ± 229,7 (4 - 812,5)	150,3 ± 139,6 (6 - 495,0)	160,3 ± 168,5 (4 - 812,5)	152,3 ± 125,5 (7 - 533,8)	142,5 ± 108,6 (1,2 - 337,5)	153,7 ± 128,5 (15 - 592,0)
Movilidad total	47,1 ± 16,8 (15 - 65)	48,7 ± 12,2 (10 - 70)	48,3 ± 13,5 (10 - 70)	51,7 ± 13,1 (15 - 70)	55,9 ± 12,9 (25 - 70)	58,4 ± 9,0 (40 - 80)
A	10,1 ± 8,3 (0 - 25)	13,4 ± 9,5 (0 - 40)	12,5 ± 9,2 (0 - 40)	20,2 ± 14,1 (0 - 50)	23,2 ± 14,4 (0 - 50)	21,6 ± 11,1 (5 - 50)
B	18,6 ± 7,1 (5 - 30)	21,1 ± 8,5 (5 - 40)	20,5 ± 8,2 (5 - 40)	18,8 ± 7,5 (10 - 35)	19,5 ± 8,4 (10 - 35)	23,1 ± 7,6 (10 - 40)
A+B	28,7 ± 13,6 ^a (5 - 50)	34,5 ± 13,7 ^b (5 - 55)	33,0 ± 13,7 (5 - 55)	38,9 ± 13,8 (10 - 60)	42,7 ± 14,5 (10 - 60)	44,7 ± 9,5 (20 - 60)
C	20,8 ± 7,8 (10,0 - 39)	14,4 ± 8,0 (5,0 - 40)	16,0 ± 8,4 (5,0 - 40)	13,1 ± 5,6 (5,0 - 30)	13,9 ± 6,7 (5,0 - 30)	13,5 ± 5,6 (5,0 - 30)
Formas normales (%)	9,0 ± 1,7 (7 - 11)	6,6 ± 3,4 (1 - 11)	7,5 ± 3,0 ^c (1 - 11)	6,7 ± 1,9 ^d (4 - 9)	7,8 ± 3,7 ^e (1 - 19)	11,2 ± 4,5 (2 - 24)
Concentración post-lavado (10 ⁶ spz/mL)	3,4 ± 3,8 (0,1 - 13,6)	2,9 ± 3,2 (0,1 - 13,6)	3,0 ± 3,4 (0,1 - 13,6)	5,7 ± 8,0 [†] (0,1 - 38,4)	3,1 ± 4,3 (0,02 - 8)	
Movilidad progresiva post-lavado (%)	75,7 ± 27,1 (15 - 90)	68,6 ± 24,6 (12 - 95)	70,4 ± 24,9 (12 - 95)	63,1 ± 22,3 (25 - 95)	80,0 ± 17,3 (60 - 90)	
Concentración post swim-up (muestras no lavadas, 10 ⁶ spz/mL)					5,5 ± 3,5 (3,0 - 8)	11,3 ± 18,8 (1,1 - 102)
Movilidad progresiva post swim-up (muestras no lavadas, %)					82,5 ± 15,0 (90 - 90)	85,7 ± 8,3 (50 - 90)
Positivo para VIH-ARN / VHC-ARN / VHB-ADN	0	0	0	0	0	

^a p<0,001 en VIH vs. Control, ^b p<0,001 en VIH/VHC vs. Control, ^c p<0,001 en Total VIH vs. Control, ^d p<0,001 en VHC vs. Control, ^e p<0,01 en VHB vs. Control, [†] p<0,05 VIH vs. VHC.

Tabla 32: Correlación entre los parámetros seminales y los marcadores de enfermedad para VIH (Test de Spearman).

	Recuento de células CD4		Carga viral		Duración de la enfermedad	
	Coefficiente de correlación (valor r)	p	Coefficiente de correlación (valor r)	p	Coefficiente de correlación (valor r)	p
Volumen (mL)	0,20	NS	-0,38	NS	0,17	NS
Concentración (x 10 ⁶ spz/mL)	0,00	NS	0,22	NS	-0,27	NS
Número total de espermatozoides en el eyaculado (x 10 ⁶ spz)	0,05	NS	0,02	NS	-0,22	NS
Movilidad total	-0,14	NS	0,24	NS	0,04	NS
A	-0,09	NS	0,20	NS	0,39	NS
B	0,17	NS	0,22	NS	0,26	NS
A+B	-0,02	NS	0,28	NS	0,33	NS
C	-0,01	NS	-0,06	NS	-0,72	0,0001 *
Formas normales (%)	-0,39	NS	0,19	NS	0,47	NS
Post-preparación		NS				NS
Concentración post-lavado (x 10 ⁶ spz/mL)	0,16	NS	0,33	NS	-0,07	NS
Movilidad progresiva post-lavado (%)	0,20	NS	-0,13	NS	-0,03	NS

* La correlación es significativa al nivel 0,0001.

Tabla 33: Análisis de los parámetros seminales en función de la carga viral, recuento de células CD4 y uso de tratamiento antirretroviral de alta actividad (TARGA) en pacientes sometidos a TRA.

	Carga viral		Recuento de células CD4		TARGA	
	Detectable	Indetectable	<450 cels./ μ L	>450 cels./ μ L	Si	No
Volumen (mL)	2,0 \pm 0,7	3,3 \pm 1,6	2,6 \pm 1,0	3,4 \pm 1,7	3,2 \pm 1,6	1,9 \pm 0,3
Concentración ($\times 10^6$ spz/mL)	64,1 \pm 38,6	58,1 \pm 77,1	42,3 \pm 35,4	69,6 \pm 85,0	59,2 \pm 74,5	55,5 \pm 39,2
Número total de espermatozoides en el eyaculado ($\times 10^6$ spz)	124,2 \pm 85,7	169,1 \pm 183,0	100,9 \pm 82,6	198,3 \pm 198,0	166,5 \pm 176,8	115,7 \pm 86,8
Movilidad total	53,7 \pm 10,3	47,0 \pm 13,9	50,0 \pm 14,4	47,2 \pm 13,1	47,5 \pm 13,3	54,2 \pm 13,2
A	15 \pm 7,1	11,9 \pm 9,7	15,3 \pm 10,1	10,8 \pm 8,4	12,1 \pm 9,4	15,8 \pm 7,4
B	25 \pm 8,0	19,4 \pm 8,0	20,3 \pm 9,4	20,6 \pm 7,5	20,3 \pm 8,5	21,7 \pm 5,2
A+B	40 \pm 9,6	31,2 \pm 14,1	35,6 \pm 13,8	31,2 \pm 13,7	32,3 \pm 13,9	38,0 \pm 12,5
C	13,75 \pm 5,8	16,6 \pm 8,9	14,7 \pm 7,8	16,9 \pm 8,7	16,1 \pm 8,8	16,7 \pm 4,1
Formas normales (%)	8 \pm 4,1	7,4 \pm 2,7	8,0 \pm 0,8	7,4 \pm 3,5	7,4 \pm 2,7	7,4 \pm 3,8
Post-preparación						
Concentración post-lavado ($\times 10^6$ spz/mL)	4,0 \pm 2,1	2,8 \pm 3,6	2,4 \pm 2,1	3,4 \pm 3,9	3,0 \pm 3,5	3,3 \pm 1,4
Movilidad progresiva post-lavado (%)	71,7 \pm 21,4	70,1 \pm 26,3	68,6 \pm 26,1	71,4 \pm 25,0	71,7 \pm 24,5	53,3 \pm 25,2
NS						

4.3. Control de calidad externo para la cuantificación de VIH ARN.

4.3.1 Tipos de ensayos utilizados para cuantificar VIH-1.

Los 18 laboratorios participantes recibieron los 2 paneles y 16 de ellos enviaron sus resultados al centro coordinador. Dentro de estos 16 laboratorios, 14 testaron la presencia de ARN VIH-1 en plasma seminal y otros 14 testaron ARN VIH-1 en las células seminales. De los 16 laboratorios, 15 cuantificaron ARN VIH-1 en las muestras seminales y otro sólo realizó un test cualitativo. Ocho laboratorios utilizaron una adaptación del HIV-1 Cobas® Ampliprep®/TaqMan® assay (Roche Diagnostics), de estos laboratorios 4 utilizaron el kit de extracción TNAI, 3 utilizaron el kit de extracción CAPCTM y un laboratorio lo realizó mediante extracción manual. Tres laboratorios utilizaron el HIV-1 Cobas® Monitor® assay (Roche Diagnostics), 3 utilizaron a RealTime™ HIV assay (Abbott Diagnostics), uno utilizó una adaptación de NucliSENS EasyQ® HIV assay (Biomérieux) y otro utilizó una técnica desarrollada personalmente con PCR en tiempo real (Tabla 34).

Los análisis utilizados se diferenciaban en el volumen de muestra extraído (de 200 a 1000 µL), la técnica de extracción, el porcentaje de ARN extraído que era amplificado (de 20 a 100%) y la región del genoma de VIH-1 amplificado. Todas las técnicas utilizaban un control interno para detectar inhibidores de la PCR. Las técnicas utilizadas para detectar ARN VIH-1 en células seminales eran muy similares a las utilizadas para plasma seminal. Todos los análisis detectaron ARN VIH-1. Sólo los protocolos utilizados en el laboratorio 2 y 8 eran idénticos.

4.3.2 Detección de ARN VIH-1 en plasma seminal.

Un total de 14 (77%) laboratorios enviaron sus resultados. En la Tabla 35 se muestran los resultados cualitativos. Se detectó ARN VIH-1 en todas (100%) de las muestras que contenían 1000 copias de ARN/mL. Esta tasa de detección disminuyó conforme disminuía la concentración en ARN de las muestras, a 79% en muestras de 500 copias de ARN/mL, a 71% en muestras de 200 copias de ARN/mL y a 50% en muestras de 100 copias de ARN/mL. Las tasas de detección para las dos muestras que contenían 500 copias de ARN/mL fueron las mismas, aunque dos centros dieron resultados discordantes. No se detectó ARN VIH-1 en las muestras negativas.

Los resultados de 13 centros que proporcionaron resultados cuantitativos se muestran en la Tabla 36. Los valores medios de cuantificación fueron expresados como logaritmos: 2,92 (objetivo 3,00), 2,66/2,69 (objetivo 2,70), 2,54 (objetivo 2,30) y 2,03 (objetivo 2,00), con coeficientes de variación de 8-14%.

La media de reproductibilidad (diferencia entre las medias de las dos muestras de 500 copias/mL) fue 0,52 Log copias/mL, y de los 8 laboratorios que proporcionaron resultados de muestras iguales fue de 0,21 Log copias/mL.

4.3.3 Detección de ARN VIH-1 en células seminales.

Un total de 14 (77%) laboratorios mandaron sus resultados. Los resultados cualitativos se presentan en la Tabla 37. La tasa de detección de ARN VIH-1 fue de 93% para las muestras que contenían 1000 copias/mL, 86% para las muestras que contenían 500 copias de ARN/mL, 71% para las muestras de 200 copias de ARN/mL y 93% para 100 copias de ARN/mL. No se detectó ARN VIH-1 en las muestras negativas. Dos resultados no se pudieron interpretar debido a que no se detectó su control interno.

Los resultados de 12 centros que mandaron resultados cuantitativos se muestran en la Tabla 38. Los valores medios de cuantificación expresados como logaritmos son: 2,89 (objetivo 3,00), 2,77 (objetivo 2,70), 2,39 (objetivo 2,30) y 2,02 (objetivo 2,00) con coeficientes de variación 9-25%.

Tabla 34: Características principales de los análisis utilizados para cuantificar VIH-1 en plasma y células seminales.

	Centro							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Test utilizado	Cobas TaqMan	Cobas TaqMan	Cobas TaqMan	Cobas TaqMan	Cobas TaqMan	Cobas TaqMan	Cobas TaqMan	Cobas TaqMan
Volumen testado (µL)	210	200	200	1000	1000	850	100	200
Control interno	+	+	+	+	+	+	+	+
Técnica de extracción	AmpliPrep TNAI	AmpliPrep CAPCTM	AmpliPrep TNAI	AmpliPrep CAPCTM	AmpliPrep TNAI	AmpliPrep TNAI	Manual	AmpliPrep CAPCTM
Región amplificada	Gag	Gag	Gag	Gag	Gag	Gag	Gag	Gag
Sensibilidad estimada (c/mL)	200	200	100	-	100-200	-	-	200
Sensibilidad estimada (c/10 ⁶ células)	-	200	40	-	100-200	30	150	200

	Centro							
	9	10	11	12	13	14	15	16
Test utilizado	Cobas Monitor	Cobas Monitor	Cobas Monitor	RealTime	RealTime	RealTime	Nuclisens EasyQ	Home made
Volumen testado (µL)	500	500	200	600	350	600	200	100
Control interno	+	+	+	+	+	+	+	+
Técnica de extracción	Manual	Ampliprep	Manual	M2000	M2000	M2000	EasyMag	Manual
Región amplificada	Gag	Gag	Gag					
Sensibilidad estimada (c/mL)	50	100	20	100	120	100	-	20
Sensibilidad estimada (c/10 ⁶ células)	-	-	20	100	40	100	-	20

Tabla 35: Resultados cualitativos de la detección de ARN VIH-1 en plasma seminal.

Centro	Panel de muestras (copias/mL)					
	1,000	500	500	200	100	0
1	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	-	-	-
9	+	+	+	-	+	-
10	+	+	+	+	+	-
11	+	+	-	+	+	-
12	+	+	-	+	-	-
13	+	-	+	-	-	-
14	+	+	+	-	-	-
15	+	-	-	+	-	-
16	+	-	+	+	-	-
	100 %	79 %	79 %	71 %	50 %	0 %

Tabla 36: Resultados cuantitativos para la detección de ARN VIH-1 en muestras de plasma seminal y reproductibilidad calculada con 2,70 Log copias/mL (testada dos veces). Para cada muestra se presenta valor medio, desviación estándar (SD) de la media y coeficiente de variación (CV).

Centros	Panel de muestras					Reproductibilidad
	(valores objetivo en Log de copias de ARN VIH-1/mL)					
	3,00	2,70	2,70	2,30	2,00	
1	3,21	2,37	3,04	2,62	-	0,67
2	2,68	2,57	2,36	2,23	1,82	0,21
3	3,41	2,90	2,90	2,38	2,48	0,00
4	3,40	3,13	3,17	2,69	2,11	0,05
5	2,92	2,46	2,29	2,77	1,95	0,17
8	2,70	2,79	2,63	-	-	0,16
9	2,74	2,54	2,53	-	1,86	0,01
10	3,11	2,97	2,60	2,75	1,81	0,38
11	2,77	2,45	-	2,34	2,26	1,15
12	2,99	2,72	-	2,55	-	0,82
13	2,95	-	3,03	-	-	2,08
14	3,14	2,82	2,79	-	-	0,03
15	2,41	-	-	2,66	-	-
Media	2,92	2,66	2,69	2,54	2,03	0,52
SD	0,27	0,21	0,28	0,20	0,28	
CV	9%	8%	10%	8%	14%	

Tabla 37: Resultados cualitativos para la detección de ARN VIH-1 en células seminales.

Centro	Panel de muestras (copias/mL)				
	1,000	500	200	100	0
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-
5	+	+	-	+	-
6	+	+	+	+	-
7	+	+	-	+	-
8	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	-
13	inin	inin	-	+	-
14	+	+	+	+	-
15	+	-	-	-	-
16	+	+	+	+	-
	93 %	86 %	71 %	93 %	0 %

Inin: ausencia de un control de amplificación interno.

Tabla 38: Resultados cuantitativos para la detección de ARN VIH-1 en células seminales. Para cada muestra se presenta valor medio, desviación estándar (SD) de la media y coeficiente de variación (CV).

Centro	Panel de muestras			
	3,00	2,70	2,30	2,00
2	3,06	2,86	2,41	2,00
3	3,45	3,16	2,68	2,25
4	2,88	2,79	2,28	1,60
5	2,19	2,04		1,15
6	2,53	2,87	2,11	1,41
7	1,67	2,88		2,98
8	3,07	2,58	2,04	2,23
11	3,10	3,02	2,50	2,31
12	3,15	2,63	2,51	2,31
13				1,88
14	3,01	2,86	2,55	2,06
15	3,62			
Media	2,89	2,77	2,39	2,02
SD	0,56	0,31	0,22	0,50
CV	19%	11%	9%	25%

4.4 Resultados de estimulación ovárica e ICSI en parejas con varones con EIT.

Fueron tratadas en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves 93 parejas en total: 33 parejas con varón seropositivo para VIH (23 de los cuales eran seropositivos para VHC, uno para VHB y otro para VHC y VHB), 23 parejas con hombre seropositivo para VHC (un hombre era también seropositivo para VHB) y 37 parejas con varón seropositivo para VHB. Un 43,5% (20 hombres) de los varones infectados con VHC, lo estaban con el genotipo 1, un 6,5% (3) con el genotipo 2, un 26,1% (12) con el genotipo 3 y un 23,9% (11) con el genotipo 4. Las características de las parejas que se sometieron a ICSI se muestran en la Tabla 39.

Los resultados de nuestro programa de ICSI, según la infección están recogidos en el Tabla 40. Se llevaron a cabo 173 ciclos en las 93 parejas. Se cancelaron 26 ciclos (15%) antes de la punción: 2 ciclos (7,7%) por la presencia de un quiste, 19 ciclos (73,1%) debido a baja respuesta, 2 ciclos (7,7%) debido a que las mujeres desarrollaron una hiperrespuesta, un ciclo (3,8%) por no frenación hipofisaria, otro ciclo (3,8%) por mala administración del tratamiento y otra pareja no se presentó el día de la punción. La media del porcentaje de fecundación fue 55,8%, y el porcentaje de implantación medio fue 15,6% para transferencias en fresco y 33,8% para embriones descongelados.

No hubo diferencias significativas en el número de ovocitos recolectados, en el número de ovocitos maduros, la tasa de fecundación, el número de embriones transferidos y el número de embriones criopreservados por punción entre las diferentes enfermedades infecciosas. Dos mujeres no tuvieron transferencia en fresco debido a SHO y a cistitis.

No se encontraron diferencias significativas entre las parejas con varón seropositivo para VIH, VHC y VHB en ninguno de los parámetros evaluados respecto a la calidad ovocitaria y embrionaria. Los resultados de la evaluación ovocitaria y de la evolución embrionaria en D+1, D+2 y en D+3 (para los embriones que no eran transferidos en D+2) se observan en las Tabla 41, Tabla 42, Tabla 43 y Tabla 44, respectivamente. Sólo se evaluó el desarrollo embrionario de los cigotos que habían mostrado dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

En total se consiguieron un total de 38 gestaciones clínicas (22% por ciclo y 40,9% por pareja), la tasa de aborto fue de 26,3% (Tabla 45). No se observó ninguna muerte intrauterina. La tasa de gestación múltiple fue del 21,4%. Como resultado hubo 34 nacimientos (22 de gestación única y 6 gemelares) (Tabla 46), de los cuales 8 fueron prematuros (<37 semanas), la mayoría procedentes de gestaciones múltiples. Un neonato presentó prematuridad extrema (<32 semanas), 6 nacieron con bajo peso (<2500 gramos) y uno con muy bajo peso (<1500 gramos). La tasa de fecundación y gestación, y los resultados obstétricos y neonatales entre los distintos grupos con EIT no mostraron diferencias significativas.

No se encontró ninguna seroconversión en los 34 recién nacidos (testados al nacimiento y a los 3 meses de edad), ni en las 93 mujeres tratadas con semen lavado durante el programa de TRA.

Aunque no han sido incluidas las parejas serodiscordantes con mujer seropositiva para EIT debido al bajo número, durante el periodo estudiado se realizaron 5 ciclos en 3 parejas con mujer seropositiva para VIH, 10 ciclos en 7 parejas con mujer seropositiva para VHC y 26 ciclos en 15 parejas con mujer seropositiva para VHB.

Tabla 39: Características de las parejas con varón con EIT que se sometieron a TRA.

	VIH n = 33			VHC n= 23			VHB n= 37		
	Media ± SD	Rango		Media ± SD	Rango		Media ± SD	Rango	
<i>Mujer:</i>									
Edad (años)	34,6 ± 4,1	25 - 40		34,2 ± 2,8	29 - 39		34,0 ± 3,8	26 - 40	
VIH, n (%)	2 (6,1)								
Hepatitis C, n (%)	1 (3)			1 (4,3)					
Hepatitis B, n (%)	0 (0)			0 (0)					
Diagnostico VIH/VHC/VHB (años)	6,5 ± 2,1	5 - 8		5 ± 0	5 - 5				
En tratamiento con TARGA, n (%)	2 (100)								
Tratamiento para VHC, n (%)	0 (0)			0 (0)					
Tratamiento para VHB, n (%)	0 (0)			0 (0)			0 (0)		
Carga viral (UI/mL)*				376000 ± 0					
Carga viral no detectable VIH, n (%)	2 (100)								
Carga viral no detectable VHC, n (%)	0 (0)			0 (0)					
Recuento de células CD4 (mm ³)	666 ± 5,7	662 - 670							
Inmunidad VHB, n (%)							34 (91,9)		
<i>Hombre:</i>									
Edad (años)	40,1 ± 5,7	28 - 55		39,4 ± 6,1	32 - 50		36,4 ± 3,8	26 - 44	
Hepatitis C, n (%)	23 (69,7)								
Hepatitis B, n (%)	2 (6,1)			1 (4,3)					
Diagnostico VIH/VHC/VHB (años)	11 ± 4,8	2 - 19		17 ± 6,1	10 - 21		10,3 ± 8,5	4 - 20	
En tratamiento con TARGA, n (%)	28 (84,8)								
Tratamiento para VHC, n (%)	3 (13,0)			3 (13)					
Tratamiento para VHB, n (%)	0 (0)			0 (0)			0 (0)		
Carga viral (UI/mL)*	31631,5 ± 47110,4	68 - 123000		3367025,6 ± 4075433,2	1071 - 15937448		1837,5 ± 2577,3	17 - 10481,1	
Carga viral no detectable VIH, n (%)	27 (81,8)								
Carga viral no detectable VHC, n (%)	7 (30,4)			3 (13)					
Carga viral no detectable VHB, n (%)	1 (50)			1 (100)			7 (18,9)		
Recuento de células CD4 (mm ³)	569,3 ± 296,6	109 - 1654							

* Carga viral de VIH en copias/mL
NS

Tabla 40: Resultados de ciclos de ICSI en parejas con varón con EIT.

	VIH (n=33)				VHC (n=23)				VHB (n=37)			
	Media	±	SD	Rango	Media	±	SD	Rango	Media	±	SD	Rango
Nº de ciclos iniciados	61				48				64			
Total FSH	2409,6	±	1153,8	1013 - 5550	2305	±	964,3	1275 - 4725	2315,5	±	845,8	825 - 4875
Días de estimulación	11,2	±	2,7	7 - 22	10,7	±	2,2	7 - 16	10,6	±	1,9	8 - 18
Folículos >17 mm	5,3	±	4,1	0 - 15	5,7	±	3,4	0 - 13	5,6	±	3,1	1 - 14
Pico de estradiol (pg./mL)	2760,6	±	1408,2	672 - 6816	2536,4	±	1417,1	759,8 - 6230	2214,6	±	1302,6	263 - 5240
LH (pico estradiol)	2,4	±	1,7	0,30 - 8	2,8	±	1,9	0,21 - 9	2,4	±	1,6	0,1 - 6,1
Coasting, n (%)	5		(8,2)		1		(2,1)		0		(0)	
Días de coasting	1,8	±	1,3	1 - 4	5	±	0	5 - 5				
Nº de punciones	48				43				56			
Tasa de cancelación, n (%)	13		(21,3)		5		(10,4)		8		(12,5)	
Nº ovocitos recogidos por punción	10,6	±	6,1	1 - 23	9,4	±	4,6	0 - 20	9,5	±	5,2	0 - 19
Nº de ovocitos maduros para ICSI por punción	8,5	±	5,4	1 - 20	7,6	±	4,1	0 - 15	7,5	±	4,4	1 - 18
Nº de ovocitos normalmente fertilizados por punción	4,6	±	3,6	0 - 17	4,1	±	2,9	0 - 12	4,5	±	3,4	0 - 15
Tasa de ovocitos normalmente fertilizados por punción, (%)	(54,6)	±	(29,1)	(0) - (100)	(52,3)	±	(21,1)	(0) - (100)	(60,5)	±	(28,4)	(0) - (100)
Transferencia embrionaria												
Punción sin suficientes embriones para transferencia en fresco, n (%)	6		(12,5)		5		(11,6)		3		(5,4)	
Nº de embriones transferidos por transferencia	1,9	±	0,4	1 - 3	2,1	±	0,5	1 - 3	2,0	±	0,5	1 - 3
Tasa de implantación con embriones en fresco (%)			(13,2)				(16,9)				(16,8)	
Tasa de implantación con embriones descongelados (%)			(22,2)				(0)				(45,5)	
Ciclos con criopreservación												
Punciones con suficientes embriones para transferencia en fresco y criopreservación, n (%)	7		(14,6)		5		(11,6)		12		(21,4)	
Punciones con criopreservación (sin transferencia en fresco), n (%)	2		(4,2)		0		(0)		0		(0)	
Número de embriones criopreservados por criopreservación, n	1,9	±	0,4	1 - 3	1,4	±	0,9	1 - 3	2,8	±	2	1 - 8
Número de embriones descongelados, n (%)	19		(59,4)		5		(71,4)		16		(48,5)	
Número de embriones supervivientes y transferidos tras descongelación (criosupervivencia) (%)	9		(47,4)		2		(40)		11		(68,8)	
SHO, n (%)	1		(1,6)		0		(0)		0		(0)	

NS

Tabla 41: Evaluación de los ovocitos MII obtenidos en parejas con varón con EIT que se sometieron a TRA.

	VIH (n=410)		VHC (n=317)		VHB (n=407)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Granulosidad central	26	(6,3)	18	(5,7)	28	(6,9)
Retículo endoplásmico liso	0	(0)	1	(0,3)	2	(0,5)
Vacuolas	8	(2,0)	7	(2,2)	10	(2,5)
Inclusiones citoplasmáticas	4	(1,0)	4	(1,3)	1	(0,2)
Exudados en el espacio perivitelino	8	(2,0)	5	(1,6)	7	(1,7)
Anomalías de la zona pelúcida	26	(6,3)	20	(6,3)	23	(5,7)
Espacio perivitelino aumentado	26	(6,3)	21	(6,6)	28	(6,9)
Alteraciones del corpúsculo polar	4	(1,0)	2	(0,6)	3	(0,7)

NS

Tabla 42: Evaluación embrionaria D+1 en parejas con varón con EIT que se sometieron a TRA.

	VIH (n=410)		VHC (n=317)		VHB (n=407)	
	n	(%)	n	(%)	n	%
<i>Resultados de fecundación</i>						
OPN	166	(40,5)	128	(40,4)	141	(34,6)
1PN	7	(1,7)	5	(1,6)	7	(1,7)
3PN	18	(4,4)	14	(4,4)	18	(4,4)
2PN	219	(53,4)	170	(53,6)	241	(59,2)
Z1	62	(28,3)	50	(29,4)	69	(28,6)
Z2	70	(32,0)	54	(31,8)	77	(32,0)
Z3	41	(18,7)	27	(15,9)	43	(17,8)
Z4	46	(21,0)	39	(22,9)	52	(21,6)
Degeneración	29	(7,1)	22	(6,9)	28	(6,9)
Halo citoplasmático	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>División temprana</i>						
% cigotos div./fecundados	29	(13,2)	24	(14,1)	29	(12,0)

NS

Tabla 43: Evaluación embrionaria D+2 en parejas con varón con EIT que se sometieron a TRA.

	VIH (n=219)		VHC (n=170)		VHB (n=241)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>Clasificación embrionaria</i>						
Tipo I	111	(50,7)	85	(50,0)	122	(50,6)
Tipo II	7	(3,2)	4	(2,4)	7	(2,9)
Tipo III	85	(38,8)	68	(40,0)	93	(38,6)
Tipo IV	9	(4,1)	6	(3,5)	10	(4,1)
Tipo V	7	(3,2)	7	(4,1)	9	(3,7)
<i>Anomalías específicas</i>						
Vacuolas	8	(3,7)	6	(3,5)	8	(3,3)
Multinucleación	6	(2,7)	4	(2,4)	8	(3,3)
Binucleación	6	(2,7)	4	(2,4)	8	(3,3)
Micronucleación	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Compactación temprana	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Anillo acitoplasmático	2	(0,9)	2	(1,2)	1	(0,4)
Moteado	0	(0)	0	(0)	1	(0,4)

Tabla 44: Evaluación embrionaria D+3 en parejas con varón con EIT que se sometieron a TRA.

	VIH (n=180)		VHC (n=132)		VHB (n=190)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>Clasificación embrionaria</i>						
Tipo I	81	(45)	56	(42,4)	83	(43,7)
Tipo II	11	(6,1)	9	(6,8)	11	(5,8)
Tipo III	72	(40)	54	(40,9)	78	(41,1)
Tipo IV	11	(6,1)	9	(6,8)	13	(6,8)
Tipo V	5	(2,8)	4	(3,0)	5	(2,6)
<i>Anomalías específicas</i>						
Vacuolas	7	(3,9)	5	(3,8)	7	(3,7)
Multinucleación	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Binucleación	4	(2,2)	3	(2,3)	4	(2,1)
Micronucleación	2	(1,1)	1	(0,8)	2	(1,1)
Compactación temprana	0	(0)	1	(0,8)	0	(0)
Anillo acitoplasmático	0	(0)	0	(0)	2	(1,1)
Moteado	0	(0)	1	(0,8)	0	(0)

Tabla 45: Tasas de gestación en parejas con varón con EIT que se sometieron a TRA.

	VIH		VHC		VHB	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Tasa de gestación clínica en fresco	8		10		14	
Por ciclo de FIV		(13,1)		(20,8)		(21,9)
Por punción		(16,7)		(23,3)		(25)
Por transferencia embrionaria en fresco		(20)		(27,0)		(27,5)
Por pareja		(24,2)		(43,5)		(37,8)
Tasa de gestación clínica de descongelación	2		0		4	
Por ciclo de descongelación		(33,3)		(0)		(44,4)
Por transferencia embrionaria de descongelación		(40)		(0)		(66,7)
Tasa de gestación clínica total	10		10		18	
Por ciclo de FIV		(16,4)		(20,8)		(28,1)
Por punción		(20,8)		(23,3)		(32,1)
Por transferencia embrionaria		(22,2)		(25,6)		(31,6)
Por pareja		(30,3)		(43,5)		(48,6)
Tasa de aborto	2	(20)	2	(20)	6	(33,3)
Embarazo ectópico	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Tasa de nacido vivo en fresco	7		8		9	
Por ciclo de FIV		(11,5)		(16,7)		(14,1)
Por punción		(14,6)		(18,6)		(16,1)
Por transferencia embrionaria de descongelación		(17,5)		(21,6)		(17,6)
Por pareja		(21,2)		(34,8)		(24,3)
Tasa de nacido vivo en ciclo de descongelación	1		0		3	
Por ciclo de descongelación		(16,7)		(0)		(33,3)
Por embrión descongelado transferido		(20)		(0)		(50)
Tasa total de nacido vivo	8		8		12	
Por ciclo de FIV		(13,1)		(16,7)		(18,8)
Por punción		(16,7)		(18,6)		(21,4)
Por transferencia embrionaria		(17,8)		(20,5)		(21,1)
Por pareja		(24,2)		(34,8)		(32,4)

NS

Tabla 46: Datos del parto en parejas con varón con EIT que se sometieron a TRA.

	VIH			VHC			VHB		
	Media	± SD	Rango	Media	± SD	Rango	Media	± SD	Rango
Nº total de recién nacidos	10			10			14		
Nº total de partos	8			10			12		
Únicos, n (%)	6	(75)		6	(75)		10	(83,33)	
Gemelares, n (%)	2	(25)		2	(25)		2	(16,67)	
Tripletos, n (%)	0	(0)		0	(0)		0	(0)	
Tasa de gestación múltiple, n (%)	2	(25)		2	(25)		2	(16,67)	
Parto vaginal, n (%)	6	(75)		3	(37,50)		9	(75)	
Cesárea, n (%)	2	(25)		5	(62,50)		3	(25)	
Parto a término (≥ 37 semanas gestación), n	6	(75)		7	(87,5)		9	(75)	
Nº de recién nacidos, n (%)	8	(80)		8	(80)		9	(64,29)	
Edad gestacional (semanas)	39 ± 1,5		38 - 42	39 ± 1,5		37 - 41	38 ± 1		37 - 40
Peso al nacimiento (gramos)	2925,6 ± 2630		2630 - 3315	2809 ± 470,2		2150 - 3700	3376 ± 353,7		2760 - 3890
Parto prematuro (<37 semanas gestación), n	1	(12,5)		1	(12,5)		3	(25)	
Nº de recién nacidos, n (%)	1	(10)		2	(20)		5	(35,7)	
Edad gestacional (semanas)	36 ± 0		36 - 36	34 ± 0		34 - 34	36 ± 0,6		35 - 36
Peso al nacimiento (gramos)	2880 ± 0		2880 - 2880	2342,5 ± 343		2100 - 2585	2286 ± 531,6		1840 - 3200
Muerte fetal, n (%)	0	(0)		0	(0)		0	(0)	
Seroconversión materna, n (%)	0	(0)		0	(0)		0	(0)	
Seroconversión niño nacido, n (%)	0	(0)		0	(0)		0	(0)	
Prematuridad extrema (<32 semanas)									
Nº de recién nacidos, n (%)	1	(10)		0	(0)		0	(0)	
Bajo peso al nacimiento (<2500 gramos)									
Nº de recién nacidos, n (%)	0	(0)		2	(20)		4	(28,57)	
Peso al nacimiento (gramos)				2125 ± 35,4		2100 - 2150	2057,5 ± 169,2		1840 - 2215
Muy bajo peso al nacimiento (<1500 gramos)									
Nº de recién nacidos, n (%)	1	(10)		0	(0)		0	(0)	
Peso al nacimiento (gramos)	750 ± 0		750 - 750						

NS

DISCUSIÓN

Se estima que en España, hasta en un 1% de las parejas en edad reproductiva, uno o ambos miembros de la pareja padece una EIT (Castilla, 2001; Riestra et al., 2001; Salleras et al., 2007).

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

Diferentes sociedades científicas coinciden en la necesidad de procurar asistencia reproductiva a estas parejas con deseos de reproducción (CDC, 2001; Shenfield et al., 2004; FIGO, 2006; Matorras and Hernández, 2007; ASRM, 2008;), aunque no existe un criterio homogéneo (OMS-ONUSIDA, 2008; Vernazza et al., 2008). Esta asistencia debe estar orientada a dar consejo reproductivo y reducir el riesgo de transmisión vertical y horizontal. Entre las posibilidades a las que pueden optar estar parejas se encuentran: reproducción natural con o sin PREP, autoinseminación y técnicas de reproducción asistida.

Por todo lo anterior, nos hemos propuesto analizar las opciones reproductivas tomadas y los riesgos asumidos por estas parejas en nuestro medio, así como determinar la eficacia de la reproducción natural y la reproducción asistida como opción para conseguir la gestación. También hemos examinado la accesibilidad de estos pacientes con EIT a las TRA en el SSPA y la eficacia de las técnicas de cuantificación de VIH en semen.

1. Opciones reproductivas en parejas con al menos un miembro seropositivo para VIH.

El porcentaje de parejas con algún miembro seropositivo para VIH que acuden regularmente a la consulta en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y que manifiesta deseos reproductivos es del 22%, similar al descrito por

otros autores para este tipo de parejas que osciló entre un 16-28% (Chen et al., 2001; Panozzo et al., 2003; Frodsham et al., 2006; Heard et al., 2007).

Diferentes autores han descrito tasas muy bajas de parejas que optan por la RN como método de concepción. Da Silveira Rossi et al. (2005) describió que los gestaciones naturales en mujeres con VIH era del 23%. Otro estudio refirió que un 12% de las mujeres y un 2% de los hombres seropositivos para VIH concibieron un hijo después de su diagnóstico para VIH (Schuster et al., 2000). En otro, el 12% de las parejas admitieron haber tenido intentos de concepción mediante relaciones sexuales no protegidas durante el proceso de evaluación para someterse a TRA (Klein et al., 2003). Estas tasas son mucho menores que las obtenidas en nuestro estudio, donde el 75,9% de las parejas optaron por RN. Nuestros resultados coinciden con los de Ezeanochie et al. (2009) que refirió que un 73% de las mujeres seropositivas para VIH prefieren RN frente a TRA como método de conseguir la gestación, o con los de otros autores que cifran las relaciones sexuales no protegidas en parejas VIH entre un 54-63% (Del Romero et al., 2010). Estas discrepancias pueden deberse a la época en la que fueron realizados estos estudios, ya que los primeros corresponden todos a finales de los 90 y principios de la década siguiente, y los últimos han sido realizados 10 años más tarde. Estos hallazgos demostrarían que se ha podido producir durante este periodo un cambio en la percepción del riesgo de transmisión sexual por RN en los pacientes con VIH (Ezeanochie et al., 2009).

En este mismo sentido, apuntaría la observación de que un elevado porcentaje de parejas que optan inicialmente por TRA y que no tienen éxito, intentan posteriormente conseguir gestación por RN (100% en nuestro estudio y el 50% en el de Vernazza et al. 2006).

Por tanto, podemos concluir que actualmente la opción reproductiva más escogida por pacientes con VIH, tanto en primera como en segunda opción, es la RN.

Esto hace necesario que existan recomendaciones específicas para minimizar los riesgos de transmisión en las parejas que optan por RN. En esta línea van las recomendaciones del Panel Español de Estudio de Parejas VIH-discordantes (Labarga et al., 2007) y de la SEF. Sin embargo, ni el proceso

asistencial del VIH (Rivero et al., 2009), ni la Guía de Reproducción Asistida del SAS (Albusac et al., 2006) contemplan la RN como opción en estas parejas.

2. Asunción de riesgos en parejas con varón seropositivo que demandan atención reproductiva.

La primera publicación que estudió los riesgos de contagio que asumen las parejas serodiscordantes con varón positivo y que están en espera de TRA, describió que alrededor de un 80% de las parejas asumían un riesgo mayor al 0%. Este estudio no incluyó a parejas control, y solo estudiaba el riesgo que asumían al someterse a TRA (van Leeuwen et al., 2008a). Según nuestros resultados este porcentaje no sería tan elevado (43%), aunque si es mayor que el observado en las parejas control tanto por TRA como por RN. Las mujeres muestran, tal y como observó también van Leeuwen et al. (2008), una tendencia a asumir mayores riesgos que los hombres, lo cual puede deberse, como describen los autores citados, a que para estas mujeres parece esencial ser capaces de procrear. Esto se ha observado también en estudios en mujeres infértiles (Bayram et al., 2005; Twisk et al., 2007). El hecho de que en los hombres era más frecuente, que en las mujeres, tener hijos previos también puede haber influido en esta tendencia.

Sorprende el hecho de que el riesgo que asumen las parejas es mucho mayor al teórico publicado para este tipo de parejas (1:100000) (Vernazza et al., 2008) que se van someter a TRA. Esto, junto con que un 57% de las parejas entrevistadas hayan tenido relaciones previas sin protección, un 43% asuman un riesgo mayor que 0% mediante TRA y un 21,4% mediante RN, nos hace pensar que un porcentaje considerable, aunque no mayoritario, de estas parejas han tenido relaciones previas con objeto de concebir sin éxito y acuden a la Unidad de Reproducción por un problema de subfertilidad.

El hallazgo de que las mismas parejas asuman mayor riesgo sometiéndose a TRA para concebir, que teniendo relaciones naturales, puede ser debido a la relación directa entre coste y confianza de los pacientes en los tratamientos, que ha sido descrita en otros campos de la salud (Waber et al., 2008).

Una de las limitaciones de los estudios sobre asunción de riesgos es la dificultad de su comprensión por los pacientes, ya que la asimilación de información numérica no es fácil (Keller and Siegrist, 2009). Se ha relacionado su

comprensión con la forma de expresar los riesgos. Así, según algunos autores esto es más fácil si se expresa de forma gráfica (Feldman-Stewart et al., 2000), prefiriendo otros autores expresarlo en porcentaje (Yamagishi, 1997; Slovic et al., 2000; Waters et al., 2006) o frecuencia (Gigerenzer and Hoffrage, 1995; Brase, 2002). No creemos que esto haya influido en nuestros resultados pues la información de riesgos se dio a los pacientes en los tres formatos diferentes comentados, tal y como recomiendan diferentes autores (Lipkus and Peters, 2009; Peters et al., 2011).

3. Resultados de reproducción natural en parejas con VIH.

Esta totalmente establecido que la TARGA es altamente efectivo reduciendo los niveles plasmáticos de ARN viral (Hammer et al., 1997), y que esto supone una disminución en la transmisión heterosexual (Hosseinipour et al., 2002; Castilla et al., 2005; Del Romero et al., 2010) y vertical (European Collaborative Study, 2005). Entre nuestras parejas se produjo la seroconversión de una mujer, lo que supone una tasa de transmisión del 8,3%, su pareja no tenía buena adherencia a la TARGA y poseía carga viral de 5580 copias/mL en la revisión médica más próxima a la concepción, este hecho confirma lo anteriormente citado, y coincide también con lo publicado por Gray (2001) que no encontró seroconversiones en parejas serodiscordantes en las que el miembro seropositivo tenía cargar virales menores de 1500 copias/mL, pero si encontró seroconversiones por encima de este valor.

Al igual que otros autores (Ryder et al., 2000; Semprini and Fiore, 2004; Barreiro et al., 2006a), queremos destacar la importancia del consejo reproductivo de estas parejas, previo a los intentos de reproducción. Para esto es fundamental evaluar el riesgo de cada pareja, en base al estudio de la fertilidad de ambos miembros y la valoración de la infección del miembro seropositivo.

Para asegurar una minimización del riesgo de transmisión, en parejas serodiscordantes con deseos de reproducción, el miembro seropositivo debe hacer un buen seguimiento de su tratamiento con TARGA, no tener carga viral detectable, así como ninguna otra EIT que pueda favorecer la transmisión sexual (Vernazza et al., 2008). Estas parejas deben recibir orientación médica por un especialista, que les indique limitar los intentos de concepción no protegidos a los

días fértiles, y en caso de no lograr concepción en un periodo que en función de los autores puede ir de 3-12 meses (Barreiro et al., 2006a; Labarga et al., 2007; Vernazza et al., 2011), se debe valorar otra opción reproductiva. Sería recomendable el uso de PREP, como terapia complementaria, ya que a pesar de los escasos datos disponibles, los resultados parecen ser alentadores, y con una favorable relación riesgo-beneficio (Matthews et al., 2010; Vernazza et al., 2011).

En nuestros datos, hemos encontrado una significativa influencia de la infección por VIH en la madre sobre el porcentaje de abortos previos, menor peso al nacimiento y partos más prematuros. Se realizaron mayor numero de controles cardiotocográficos, por considerarse estos embarazos de mayor riesgo. Los recién nacidos de madres seropositivas para VIH tuvieron partos más dificultosos y como consecuencia los recién nacidos requirieron mas cuidados pos-parto. Esto coincide con lo descrito por el metaanálisis de Brocklehurst y French (1998), que incluye 31 estudios que comparan los resultados perinatales de mujeres seropositivas para VIH, frente a mujeres control seronegativas, describiendo una posible asociación entre la infección VIH y los resultados de abortos espontáneos y perinatales adversos. Aunque dichos autores mantienen que pueden existir factores no controlados que pueden sesgar estos resultados.

La TARGA en las mujeres gestantes está establecida tanto para el cuidado de la salud de la madre como para la prevención de la transmisión vertical (WHO, 2010a). Pero no se descarta que estos tratamientos tengan un efecto adverso sobre la gestación y el desarrollo fetal. Algunos estudios encuentran una asociación entre la proporción de partos prematuros en mujeres tratadas con Inhibidores de la Proteasa (European Collaborative Study, 2000; European Collaborative Study, 2003; Cotter et al., 2006), mientras que otros no encuentran esta relación (Szyld et al., 2006; Kourtis et al., 2007; Patel et al., 2010). Sin embargo, la terapia antirretroviral no parece tener ningún efecto sobre las hospitalizaciones de los recién nacidos, muerte fetal y bajo peso al nacimiento (Cotter et al., 2006; Powis et al., 2011)

También existe cierta controversia sobre si existe alguna influencia de la inmunodepresión sobre los resultados adversos del embarazo. Hay autores (European Collaborative Study, 2000) que establecieron el recuento de células CD4 como buen predictor de la prematuridad, mientras que otros no han

encontrado ninguna relación analizando el recuento de células CD4, ni el estado CDC (Cotter et al., 2006).

Se necesitan más estudios que esclarezcan estos resultados y pongan de manifiesto los factores que influyen en los peores resultados obstétricos que hemos observado, en las gestantes seropositivas para VIH.

4. Resultados de reproducción asistida en parejas seropositivas para VIH, VHC y/o VHB.

A pesar de que la demanda de atención a los deseos reproductivos observada en el Sistema Sanitario Público de Andalucía de parejas con varón seropositivo para VIH es aproximadamente la cuarta parte de la estimada a partir de la población general, no creemos que exista un problema específico de accesibilidad a estas técnicas en estas parejas, ya que dicha ratio es similar que la observada en ciclos de TRA entre centros públicos y privados en España en parejas sin EIT (Castilla et al., 2009). Además, a diferencia de lo descrito por otros autores (Vernazza et al., 2006), en nuestro medio no se ha observado relación entre la distancia de residencia de la pareja al centro y el número de ciclos TRA realizados tanto para parejas con varón positivo para VIH, como para hepatitis.

Otro factor que apoya la idea de que no existe un problema de accesibilidad en parejas con varón positivo para VIH, es que no se observa diferencia en la proporción de varones inmigrantes con EIT atendidos en nuestra unidad de reproducción y la prevalencia de esta enfermedad en la población inmigrante general. Esta buena accesibilidad de pacientes inmigrantes con EIT, especialmente VIH, al sistema público en España ha sido descrita en otros campos de la salud (Caro-Murillo et al., 2009).

El haber encontrado que se atiende en nuestra unidad a más parejas con varón VIH que las estimadas a partir de la población subfétil, indica que un determinado porcentaje de parejas con varón VIH acuden a la Unidad de Reproducción no por ser estériles, sino por tener VIH. Observación que coincide con lo descrito por otros autores (Bujan et al., 2004b; Nicopoullou et al., 2010b).

Este hecho puede hacer creer a los profesionales especializados de las Unidades de Reproducción, que las TRA son la opción reproductiva más escogida

para las parejas con algún miembro VIH-positivo. Pero como hemos observado en nuestro estudio de las opciones reproductivas escogidas por estas parejas, nada más lejos de la realidad, ya que estas parejas optan actualmente en su gran mayoría por la RN. Por otra parte, el haber observado que las parejas atendidas con varón con hepatitis es muy inferior al estimado a partir de la población general nos hace coincidir con Nicopoullos et al. (2010b) que la infección para estas parejas es un tema secundario. La mayoría de estas parejas solicitan TRA por ser estériles y no por tener hepatitis.

También es importante tener en cuenta que la escasa demanda observada respecto a la teórica estimada a partir de parejas estériles en el caso de varones positivos para VHC puede deberse a que el criterio del SAS para considerar que un varón tiene hepatitis C (debe tener carga viral positiva) es diferente al de los estudios epidemiológicos de hepatitis, que consideran los anticuerpos anti-VHC positivos (Riestra et al., 2001).

Nuestros datos, como otras publicaciones previas (Gilling-Smith, 2000; Garrido and Meseguer, 2006; Savasi et al., 2007), demuestran que el lavado de semen, con posterior detección de carga viral, parece ser una opción segura y efectiva para las parejas serodiscordantes que desean concebir, evitando la transmisión del virus a la madre y al hijo.

Hasta ahora, no se ha publicado ninguna seroconversión tras tratamiento realizado con ICSI y semen procesado mediante centrifugación en gradiente de densidad con o sin testaje rutinario de la carga viral en el semen lavado (Eke and Oragwu, 2011). En nuestro estudio, no se produjo ninguna seroconversión, tanto en los 34 recién nacidos (testados al nacimiento y a los 3 meses de edad), como en las 93 mujeres tratadas con TRA tras el lavado de semen de su pareja.

Algunos centros de reproducción asistida realizan ICSI a todas las parejas en lugar de IA, basándose en la mayor tasa de éxito y por tanto menor exposición a posibles espermatozoides contaminados o en la teoría de que ICSI requiere únicamente el contacto in vitro de un solo espermatozoide y el ovocito, y reduce drásticamente el riesgo de transferir partículas víricas que a menudo están en semen o en células seminales (Pasquier et al., 2000; Sauer and Chang, 2002). Otros autores consideran que esta teoría no ha sido probada y que esto podría suponer la introducción de partículas virales directamente en el ovocito sin saber

los efectos que podrían tener (Piomboni and Baccetti, 2000; Gordon, 2002; Anderson and Politch, 2003), además de suponer mayor coste y estar asociada con mayor número de complicaciones que IA (Fernández-Shaw et al., 2010). Nosotros hemos realizado de forma rutinaria ICSI a todos las parejas, ya que al igual que ocurre en otros centros (Ohl et al., 2003; Prisant et al., 2010) no disponemos del resultado del análisis que descarta la presencia de partículas víricas el mismo día del lavado. Esto nos obliga a congelar el semen, y por tanto no nos permite tener el número suficiente de espermatozoides móviles para realizar IA.

En nuestro estudio todos los sémenes lavados, independientemente, del tipo de virus, resultaron negativos. Se han publicado diferencias en el porcentaje de resultados positivos para ARN-VIH de semen procesado oscilando entre el 0% (Kato et al., 2006) y 40% (Chrystie et al., 1998), de igual manera ocurre para VHC, en donde se han descrito tasas de detección que van entre el 0% (Semprini et al., 1998; Debono et al., 2000) y el 57% (Tang et al., 1996). Estas diferencias pueden deberse a la heterogeneidad de los pacientes tratados, a la sensibilidad de los kits de PCR utilizados y la eliminación de inhibidores de la PCR (Levy et al., 2000). Por este motivo es fundamental la participación, al igual que nosotros y otros autores, en programas de control de calidad externos (Bourlet et al., 2003; Pasquier et al., 2006b; Pasquier et al., 2011).

Sólo hay una publicación existente que estudie la calidad embrionaria en parejas con varón seropositivo para EIT (Melo et al., 2008) y al igual que nosotros no observaron afectación de la calidad embrionaria en estos pacientes.

Nuestros resultados en gestación clínica y gestación evolutiva para VIH son similares a los descritos por otros autores (Manigart et al., 2006; Prisant et al., 2010), aunque más bajos que los que reportan otros (Peña et al., 2003; Sauer et al., 2009). Esto puede deberse a que la media de embriones transferidos por estos últimos es significativamente superior a la nuestra de 2 embriones, siendo la media de embriones transferidos por estos autores de 3,54 y 3 respectivamente (Peña et al., 2003; Sauer et al., 2009). Sin embargo, nuestra tasa de gestación múltiple (21,4%) es menor que la obtenida por estos mismos autores, respectivamente (57,1% y 41%) y similar a la obtenida por autores que transfieren menos embriones (Nicolopoulos et al., 2010b). Debería tenerse en cuenta, como hemos

comentado anteriormente, que muchas de estas parejas son fértiles, sin problemas reproductivos, por lo que es conveniente reducir el número de embriones transferidos para evitar así el riesgo de embarazo múltiple.

Los resultados en cuanto a gestación clínica y gestación evolutiva para VHC y VHB son similares a los publicados por otros autores (Mencaglia et al., 2005; Ohl and Partisani, 2007; Prisant et al., 2010).

Aunque no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la tasa de gestación entre los tres tipos de parejas estudiadas, la tendencia a menor tasa en VIH que se observa podría estar relacionada con una infertilidad reducida en varones infectados con VIH debido al tratamiento o a la propia infección (Dulioust et al., 2002; Nicopoullou et al., 2004). En cuanto a la diferencia en la tasa de implantación observada en todos los grupos entre embriones frescos y descongelados, puede deberse a una diferente receptividad endometrial y mayor sincronización entre embrión y endometrio en los ciclos con embriones descongelados (Aflatoonian et al., 2010). Por otro lado también puede ser resultado de que el desarrollo endometrial en ciclos con embriones descongelados se puede controlar de forma más precisa que en los ciclos de estimulación ovárica con gonadotropinas (Shapiro et al., 2008).

Aunque la tasa de cesárea fue mayor en el grupo de parejas con varón infectado con VHC, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además la tasa global de cesáreas en nuestro estudio (37,5%) fue inferior a la descrita por otros autores para este tipo de parejas (Cleary-Goldman et al., 2003; Peña et al., 2003; Sauer et al., 2009). Las complicaciones obstétricas y neonatales obtenidas son similares a los publicados por la literatura para parejas no serodiscordantes (Schieve et al., 2002; U.S. Centers for Disease Control and Prevention., 2010).

Entre las limitaciones de nuestro estudio se encontraría que ha sido realizado en un centro público, y en un país desarrollado. En cuanto a lo primero, no se puede asegurar que estos resultados sean extrapolables a las parejas atendidas en centros privados. Sin embargo, el hecho de que el porcentaje de ciclos realizados en estas parejas respecto al total realizadas en Andalucía en el Sistema Público es del 0,7%, similar al descrito en el Registro de las TRA de la Sociedad Española de Fertilidad realizado en el año 2008 que recoge datos de

centros públicos y privados (0,8 %) (Luceño et al., 2010), nos hace pensar que la actitud de estas parejas ante la TRA es muy similar en ambos sistemas sanitarios. Por otro lado, la extrapolación de nuestras conclusiones sobre la accesibilidad de parejas con VIH a las TRA en países en desarrollo debe hacerse con cuidado, ya que deben tenerse en cuenta otros factores como los bajos recursos o la priorización de pacientes en estos países (Dyer and Pennings, 2010; Ombelet, 2010).

En resumen, en nuestro medio la accesibilidad a las TRA es similar en parejas con hombres infectados para VIH que en parejas sanas. Las parejas con hombre infectado con hepatitis solicitan TRA por subfertilidad y no por la hepatitis per se. El lavado de semen e ICSI ha sido demostrado ser una opción segura y efectiva para reducir el riesgo de transmisión o superinfección en parejas serodiscordantes o concordantes que desean tener un hijo. Los embarazos conseguidos mediante TRA en parejas con varón infectado con EIT tienen buenos resultados obstétricos y neonatales.

En relación a la calidad seminal en pacientes seropositivos para VIH, las publicaciones existentes no parecen llegar a un acuerdo de si la calidad seminal se ve afectada por la infección o no. Hay autores que describen alteración de los parámetros seminales (Muller et al., 1998; Dulioust et al., 2002; Nicopoullos et al., 2004; Bujan et al., 2007c), mientras que otros no encuentran ninguna alteración (Semprini and Fiore, 2004; Garrido et al., 2005; Lorusso et al., 2010). La hipótesis que justifica esta alteración es el empeoramiento progresivo de los parámetros seminales de los varones infectados a medida que progresa el deterioro inmunológico y la enfermedad clínica (Muller et al., 1998).

La calidad seminal de nuestros pacientes puede no haberse visto tan afectada por la infección por VIH como describen otros autores, debido al estado de salud de nuestros pacientes, tal y como refiere Lorusso et al. (2010). Para iniciar el tratamiento en la Unidad de Reproducción es necesario que cumplan una serie de requisitos, entre los que ese encuentra no tener ninguna infección activa por otros agentes infecciosos, además la mayoría de nuestros pacientes tenían carga viral no detectable. Por lo tanto, no podemos descartar que la infección por VIH pueda afectar a más parámetros seminales de lo que hemos evidenciado,

pero debido al buen estado de salud en el que se suelen encontrar nuestros pacientes no se ha puesto de manifiesto.

Diferentes autores (Lasheeb et al., 1997; Muller et al., 1998; Nicopoullou et al., 2004) han encontrado relación entre el recuento de células CD4 como marcador de la enfermedad y los parámetros seminales, aunque nosotros no hemos encontrado esta relación. Tampoco hemos encontrado ninguna influencia de la TARGA en la calidad seminal, como ha sido descrito por algunos (Politch et al., 1994; van Leeuwen et al., 2008c; Nicopoullou et al., 2010a). El hecho de que la mayoría de nuestros pacientes tomara TARGA, puede ser responsable de que no se hayan encontrado diferencias significativas entre pacientes que tomaban TARGA y los que no.

En nuestros resultados se observa una correlación negativa entre la duración de la enfermedad en varones VIH seropositivos y la movilidad espermática no progresiva (tipo C). Esto puede ser debido a que en pacientes estables con larga evolución de la enfermedad, podría recuperarse el porcentaje de movilidad progresiva, que como hemos comentado anteriormente se encuentra disminuida en varones VIH-positivos conforme progresa el deterioro inmunológico y la enfermedad clínica (Politch et al., 1994; Muller et al., 1998; van Leeuwen et al., 2008b). Hallazgos similares fueron obtenidas por Nicopoullou et al. (2010a).

Al contrario que con el VIH, los estudios que analizan la calidad seminal en varones con hepatitis C o B son escasos, describiendo la mayoría una peor calidad en varones con estas infecciones, tanto VHC (Durazzo et al., 2006; Moretti et al., 2008; Lorusso et al., 2010; Hofny et al., 2011), como VHB (Vicari et al., 2006; Moretti et al., 2008; Lorusso et al., 2010; Oger et al., 2011; Zhou et al., 2011). Nuestros resultados reafirman esos hallazgos, ya que hemos observado una disminución en el porcentaje de formas normales en estos pacientes. No están muy claras las causas de esta menor calidad seminal en estos pacientes, que puede ser debida a que el virus puede actuar alterando los perfiles hormonales reproductivos (Durazzo et al., 2006; Safarinejad et al., 2010) en el caso de la hepatitis C y a la integración del virus en la línea germinal de los espermatozoides en el caso de la hepatitis B (Hino et al., 1991; Huang et al., 2003). También hay autores que asocian esta peor calidad seminal con la producción de especies reactivas del oxígeno por parte de estos virus (Illingworth et al., 1996; Vicari, 1999).

Nuestro estudio tiene la limitación de que hemos podido perder pacientes seropositivos para EIT, ya que existe la posibilidad de que en el reconocimiento que se le haya realizado previo a la inclusión en la Unidad de Reproducción, en su provincia de origen, se haya evidenciado una calidad seminal inferior a la necesaria para poder realizar el lavado de semen y la pareja haya sido descartada. Debido a esto podemos haber infraestimado la afectación de la calidad seminal por las EIT. Sin embargo, si este sesgo existe sería mínimo, ya que la mayor parte de parejas remitidas a nuestra Unidad lo hacía sin análisis de semen previo. De ahí, que el porcentaje de parejas rechazadas por semen no apto para lavado fuera de entre 3-29% según la EIT.

Todos los estudios sobre seguridad del lavado seminal son estudios observacionales, como el realizado por nosotros, por lo que coincidimos con las conclusiones de la revisión realizada por Eke y Oragwu (2011), de que es necesario realizar estudios multicéntricos controlados prospectivos aleatorizados. En este sentido, cabe destacar la iniciativa de CREAThE, una red sin ánimo de lucro que incluye centros que ofrecen asistencia reproductiva a parejas con VIH que tiene como objetivo principal mejorar esta asistencia. Para ello está realizando una base de datos a nivel europeo dónde se recoge información sobre el tratamiento que la pareja esté llevando a cabo. La Unidad de Reproducción del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, junto con el laboratorio de Bioquímica del Hospital Galdakao-Usansolo de Vizcaya son los dos centros españoles que participan en este proyecto.

5. Control de calidad externo para cuantificación de VIH ARN.

Los resultados obtenidos indican una gran variabilidad en los protocolos de cuantificación de ARN VIH en semen entre laboratorios. No obstante, esta situación ha mejorado respecto a los resultados obtenidos en el primer Control de Calidad Externo organizado por CREAThE 2004 (Pasquier et al., 2006a). Hemos observado una mayor automatización y un mayor uso de la PCR en tiempo real. El rendimiento general parece que no ha variado significativamente (16% de falsos negativos en 2010 y 18% en 2004; 0 falsos positivos en 2010 y 3% en 2004). No se ha detectado ningún falso positivo, pero los resultados de los falsos negativos aumentaron gradualmente por debajo de 500 copias/mL en el plasma seminal.

Esto no es un problema para el uso clínico de esta tecnología, ya que el lavado de semen es seguro en esta concentración viral. Tal y como demostraron Fiore et al. (2005), los cuales observaron que el lavado de semen es 100% eficaz con carga virales menores de 50000 copias/mL. Encontrando sólo partículas virales en muestras de semen lavadas cuando estas tenían antes de lavado concentraciones superiores a 50000 copias/mL. (Fiore et al., 2005). La reproductibilidad entre laboratorios para ensayos cuantitativos fue aceptable, con una desviación estándar por debajo de 0,5 Log (es esperable por debajo de 0,2 log para plasma sanguíneo con este tipo de técnicas y por debajo de 0,5 en técnicas manuales). La mayoría de laboratorios obtuvieron una reproductibilidad intra-laboratorio adecuada (por debajo de 0,5 log).

El aumento del porcentaje de falsos negativos conforme disminuye el número de partículas virales probablemente refleje una falta de sensibilidad. El protocolo en células seminales parece ser ligeramente más sensible. Esta variación en la sensibilidad podría ser importante para la seguridad de las TRA en parejas seropositivas para VIH. Pero el que una muestra de semen lavado sea contagiosa no solo depende de la carga viral, sino que muchos otros factores pueden estar involucrados tanto en el hombre infectado, como en la mujer expuesta. Así, se sabe que la inflamación genital y las enfermedades de transmisión sexual en uno o ambos miembros de las parejas aumentan el riesgo de transmisión de VIH (Attia et al., 2009). La ausencia de casos documentados de transmisión mediante la utilización de TRA es un argumento importante que prueba la seguridad de este procedimiento (Bujan et al., 2007a), a pesar de la falta de sensibilidad a concentraciones tan bajas de VIH, observada en nuestros resultados.

Estos hallazgos sugieren que no es necesaria la realización de técnicas más sensibles (como nested-PCR), que las utilizadas por los laboratorios participantes, tal como han sugerido algunos autores para garantizar la seguridad de las parejas (Meseguer et al., 2002). Estas técnicas al ser más complejas y caras dificultarían la accesibilidad a las TRA.

El hecho de haber observado diferencias en los procedimientos de extracción de ARN y en los protocolos analíticos de cada laboratorio, junto con que sólo algunos laboratorios coinciden en utilizar el mismo protocolo, hace que sea

difícil identificar el protocolo ideal. Al menos para la cuantificación rutinaria del VIH en el semen, siempre debería usarse un protocolo publicado y validado por estudios similares al nuestro (Pasquier et al., 2009).

La importancia de tener técnicas de cuantificación de VIH en semen validadas, no sólo se circunscribe al ámbito de las TRA en parejas con varones positivas para VIH, sino que podría tener importantes consecuencias en el consejo reproductivo de estas parejas. En algunos pacientes puede haber una replicación residual de VIH dentro del tracto genital masculino a pesar de la gran eficacia de la TARGA en el compartimento sanguíneo, que consigue cargas virales indetectables mantenidas (Bujan et al., 2004a; Xu et al., 2005; Marcelin et al., 2008; Pasquier et al., 2008; Sheth et al., 2009; Halfon et al., 2010). Por lo tanto, realizar la carga viral seminal podría ser útil para estudiar la dinámica de la replicación vírica y la eficacia de la TARGA en el tracto genital masculino.

El control de la eficacia de la TARGA disminuyendo la carga viral en el plasma seminal podría ser una buena manera de asegurar la eficacia global del tratamiento en la transmisión sexual, ya que permitiría la identificación de pacientes con liberación viral. Estos pacientes, una vez informados de su estado, podrían beneficiarse de una optimización de su tratamiento para erradicar la viremia genital y además podrían estar más motivados para el uso de preservativos.

La carga viral de VIH-1 en plasma sanguíneo se correlaciona con el riesgo de transmisión sexual (Pedraza et al., 1999; Quinn et al., 2000; Attia et al., 2009). Por otro lado, el modelo de transmisión sexual propuesto por Chakraborty et al. (2001) muestra la gran influencia de la carga viral de VIH en semen. Por lo tanto, la carga viral seminal podría ayudarnos a detectar el riesgo de transmisión durante las relaciones sexuales no protegidas después de un accidente por fallo del preservativo o antes de exponer esta opción a las parejas (Vernazza et al., 2008; Vernazza et al., 2011). Como hemos observado en nuestro estudio y han descrito otros autores, muchas parejas reconocen tener relaciones sexuales sin protección (Ezeanochie et al., 2009; Del Romero et al., 2010), aceptando elevados riesgos de transmisión (van Leeuwen et al., 2008a). Una detección de carga viral en semen podría ayudar en el consejo reproductivo de estos pacientes sobre el riesgo de transmisión.

Además, la determinación de carga viral en semen, podría ser relevante en otras situaciones clínicas. En primer lugar, para asegurar la eficacia del tratamiento antirretroviral en el compartimento genital en los pacientes que han iniciado el tratamiento antirretroviral recientemente (Pasquier et al., 2008). Aunque quedaría por definir el tiempo de muestreo óptimo, podría considerarse a los 3-6 meses después de la iniciación del tratamiento. En segundo lugar, identificar pacientes con altos niveles de virus en semen sería beneficioso, ya que de esta manera se podría recomendar a estos pacientes un análisis de semen y exámenes complementarios para encontrar posibles enfermedades de transmisión sexual o inflamación local (Bujan et al., 2002). Aunque estas estrategias necesita validación científica antes de poder realizar estas recomendaciones.

En resumen, la carga de VIH en el plasma seminal puede ser un marcador útil del riesgo de transmisión sexual de VIH, pero su uso como marcador de la eficacia de la terapia antirretroviral requiere de una estandarización.

CONCLUSIONES

1. La opción reproductiva más escogida actualmente por los pacientes con las enfermedades infecciosas transmisibles estudiadas es la reproducción natural, por lo que deberían valorarse los deseos gestacionales de todas las parejas en edad reproductiva con éstas enfermedades infecciosas transmisibles, con el objetivo de que reciban consejo reproductivo y se minimicen los riesgos de transmisión.
2. El consejo reproductivo a parejas con las enfermedades infecciosas transmisibles estudiadas debe abarcar todas las opciones reproductivas, debido a los elevados riesgos que están dispuestos a asumir estas parejas.
3. Los embarazos obtenidos por reproducción natural en mujeres seropositivas para VIH presentan más complicaciones obstétricas y neonatales.
4. La mayoría de parejas con varón portador de hepatitis B y C, que demandan asistencia especializada para satisfacer sus deseos de reproducción, lo hace por problemas de esterilidad y no por la infección. Sin embargo, la mayoría de parejas con varón seropositivo para VIH lo hace por su infección.
5. La accesibilidad de las parejas con VIH a las técnicas de reproducción asistida en el Sistema Sanitario Público de Andalucía es similar al de las parejas sin enfermedades infecciosas transmisibles.
6. El rendimiento de las técnicas de reproducción asistida en varones seropositivos no se ve afectado por las enfermedades infecciosas transmisibles estudiadas, pudiendo considerarse técnicas seguras.
7. Aunque la mayoría de los centros utiliza técnicas válidas para la cuantificación de VIH en semen, es necesario estandarizar internacionalmente estas técnicas antes de la incorporación de esta determinación a la práctica clínica habitual y al consejo reproductivo

BIBLIOGRAFÍA

Abe K, Inchauspe G and Fujisawa K. Genomic characterization and mutation rate of hepatitis C virus isolated from a patient who contracted hepatitis during an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Japan. *J Gen Virol* 1992;73 (Pt 10):2725-2729.

Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S and Oskouian L. Can fresh embryo transfers be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfers in assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:357-363.

Ahmad N and Venkatesan S. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* 1988;241:1481-1485.

Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME and Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994;76:853-864.

Alamillos Ortega P and Failde Martinez I. Prevalencia de marcadores serologicos del virus de la hepatitis B en trabajadores de hospital y de atencion primaria de salud en la zona de Jerez (Cadiz). *Aten Primaria* 1999;23:212-217.

Albusac R, Castilla J, García J, López V, Martínez L, Menacho A, et al. Guía de Reproducción Humana Asistida en el Servicio Andaluz de Salud. Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud; 2006.

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

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

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

Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C and Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999;71:836-842.

Alter HJ, Purcell RH, Gerin JL, London WT, Kaplan PM, McAuliffe VJ, et al. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen-positive saliva and semen. *Infect Immun* 1977;16:928-933.

Alter MJ and Margolis HS. The emergence of hepatitis B as a sexually transmitted disease. *Med Clin North Am* 1990;74:1529-1541.

Alvarado-Ramy F, Alter MJ, Bower W, Henderson DK, Sohn AH, Sinkowitz-Cochran RL, et al. Management of occupational exposures to hepatitis C virus: current practice and controversies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22:53-55.

Amann RP. Evaluating testis function non-invasively: how epidemiologist-andrologist teams might better approach this task. *Hum Reprod* 2010;25:22-28.

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

Anderson JR. A guide to the clinical care of women with HIV/AIDS. En: Anderson J, editor. *A Guide to the Clinical Care of Women with HIV/AIDS*. Rockville: Department of Health and Human Services; 2005. p. 241-330.

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

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

Araneta MR, Mascola L, Eller A, O'Neil L, Ginsberg MM, Bursaw M, et al. HIV transmission through donor artificial insemination. *JAMA* 1995;273:854-858.

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

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

Attia S, Egger M, Muller M, Zwahlen M and Low N. Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. *AIDS* 2009;23:1397-1404.

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

Ayoola EA, Odelola HA and Ladipo OA. Hepatitis B surface antigen in menstrual blood and semen. *Int J Gynaecol Obstet* 1980;18:185-187.

Baccetti B, Benedetto A, Collodel G, di Caro A, Garbuglia AR and Piomboni P. The debate on the presence of HIV-1 in human gametes. *J Reprod Immunol* 1998;41:41-67.

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

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

Barin F, Cazein F, Lot F, Pillonel J, Brunet S, Thierry D, et al. Prevalence of HIV-2 and HIV-1 group O infections among new HIV diagnoses in France: 2003-2006. *AIDS* 2007;21:2351-2353.

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

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

Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 2003;278:41003-41012.

Bayram N, van Wely M, van der Veen F, Bossuyt PM and Nieuwkerk P. Treatment preferences and trade-offs for ovulation induction in clomiphene citrate-resistant patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2005;84:420-425.

Beck J and Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007;13:48-64.

Berry WR, Gottesfeld RL, Alter HJ and Vierling JM. Transmission of hepatitis B virus by artificial insemination. *JAMA* 1987;257:1079-1081.

Bhoopat L, Khunamornpong S, Sirivatanapa P, Rithaporn T, Lerdsrimongkol P, Thorner PS, et al. Chorioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period. *Mod Pathol* 2005;18:1357-1364.

Birkhead GS, Pulver WP, Warren BL, Klein SJ, Parker MM, Caggana M, et al. Progress in prevention of mother-to-child transmission of HIV in New York State: 1988-2008. *J Public Health Manag Pract* 2010;16:481-491.

Blight K, Lesniewski RR, LaBrooy JT and Gowans EJ. Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. *Hepatology* 1994;20:553-557.

Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, Gravelle CR, Ebert JW and Maynard JE. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. *Lancet* 1981;1:550-551.

Bourlet T, Levy R, Laporte S, Blachier S, Bocket L, Cassuto G, et al. Multicenter quality control for the detection of hepatitis C virus RNA in seminal plasma specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:789-793.

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

Brase G. Which statistical formats facilitate what decisions? The perception and influence of different statistical information formats. *J Behav Dec Making* 2002;15:381-401.

Briggs JA and Krausslich HG. The molecular architecture of HIV. *J Mol Biol* 2011;410:491-500.

Brocklehurst P and French R. The association between maternal HIV infection and perinatal outcome: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:836-848.

Brown JB, Crean GP and Ginsburg J. Oestrogen Metabolism and Excretion in Liver Disease. *Gut* 1964;5:56-59.

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

Bujan L, Daudin M, Alvarez M, Massip P, Puel J and Pasquier C. Intermittent human immunodeficiency type 1 virus (HIV-1) shedding in semen and efficiency of sperm processing despite high seminal HIV-1 RNA levels. *Fertil Steril* 2002;78:1321-1323.

Bujan L, Daudin M, Matsuda T, Righi L, Thauvin L, Berges L, et al. Factors of intermittent HIV-1 excretion in semen and efficiency of sperm processing in obtaining spermatozoa without HIV-1 genomes. *AIDS* 2004a;18:757-766.

Bujan L, Hollander L, Coudert M, Gilling-Smith C, Vucetich A, Guibert J, et al. Safety and efficacy of sperm washing in HIV-1-serodiscordant couples where the male is infected: results from the European CREAThE network. *AIDS* 2007a;21:1909-1914.

Bujan L, Pasquier C, Labeyrie E, Lanusse-Crousse P, Morucci M and Daudin M. Insemination with isolated and virologically tested spermatozoa is a safe way for human immunodeficiency type 1 virus-serodiscordant couples with an infected male partner to have a child. *Fertil Steril* 2004b;82:857-862.

Bujan L, Sergerie M, Kiffer N, Moinard N, Seguela G, Mercadier B, et al. Good efficiency of intrauterine insemination programme for serodiscordant couples with HIV-1 infected male partner: a retrospective comparative study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007b;135:76-82.

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

Bukulmez O and Arici A. Assessment of ovarian reserve. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:231-237.

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

Buttler ML, Johnson LF and Van Heertum RL. Letter: Semen and hepatitis B antigen. *Ann Intern Med* 1974;80:424.

Cabezas C. Situación y control de la hepatitis B y Delta en el Perú. *Acta Méd Peruana* 2008;25:96-112.

Caldwell SH, Sue M, Bowden JH, Dickson RC, Driscoll CJ, Yeaton P, et al. Hepatitis C virus in body fluids after liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1996;2:124-129.

Cameron DW, Simonsen JN, D'Costa LJ, Ronald AR, Maitha GM, Gakinya MN, et al. Female to male transmission of human immunodeficiency virus type 1: risk factors for seroconversion in men. *Lancet* 1989;2:403-407.

Campbell-Yesufu OT and Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin Infect Dis* 2011;52:780-787.

Cañas EJ, García FJ and Andérica G. Epidemiología de la infección VIH y SIDA. En: Pachón Díaz J, Pujol de la Llave E et al., editores. *La Infección por el VIH: Guía práctica*. Sevilla: Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas; 2003. p. 37-54.

Caro-Murillo AM, Gutierrez F, Manuel Ramos J, Sobrino P, Miro JM, Lopez-Cortes LF, et al. Infección por virus de la inmunodeficiencia humana en inmigrantes en España: características epidemiológicas y presentación clínica en la cohorte CoRIS, 2004-2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27:380-388.

Castilla J. Epidemiología de la infección por VIH/SIDA en España. En: del Amo J, Belza M *et al.*, editores. *Prevención del VIH/SIDA en inmigrantes y minorías étnicas*. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2001. p. 33-38.

Castilla J, Del Romero J, Hernando V, Marincovich B, Garcia S and Rodriguez C. Effectiveness of highly active antiretroviral therapy in reducing heterosexual transmission of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:96-101.

Castilla J and Guevara M. Inmigración y virus de la inmunodeficiencia humana en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27:375-376.

Castilla JA, Hernandez E, Cabello Y, Navarro JL, Hernandez J, Gomez JL, et al. Assisted reproductive technologies in public and private clinics. *Reprod Biomed Online* 2009;19:872-878.

CDC. Revised guidelines for HIV counseling, testing, and referral. *MMWR Recomm Rep* 2001;50:1-57; quiz CE51-19a51-CE56-19a51.

Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 1998;47:1-39.

Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica del SIDA en España. [en línea] Ministerio de Ciencia e Innovación. Instituto de Salud Carlos III; 2010 [acceso 12 Jul 2011] Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIIE/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/sida.shtml>.

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

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

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

Coll O, Suy A, Figueras F, Vernaev V, Martinez E, Mataro D, et al. Decreased pregnancy rate after in-vitro fertilization in HIV-infected women receiving HAART. AIDS 2006;20:121-123.

Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD and Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. Nature 1998;391:397-401.

Conte D, Fraquelli M, Prati D, Colucci A and Minola E. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. Hepatology 2000;31:751-755.

Cooper TG, Keck C, Oberdieck U and Nieschlag E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. Hum Reprod 1993;8:1251-1258.

Cordoba J, Esteban RJ, Garijo R, Molina JM and Gobernado M. Resistencias del VIH-1 y el laboratorio clínico. Rev Esp Quimioter 1999;12:310-316.

Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, et al. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:14067-14072.

Correa-Perez JR, Fernandez-Pelegri R, Aslanis P and Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necropermia. Fertil Steril 2004;81:1148-1150.

Cotter AM, Garcia AG, Duthely ML, Luke B and O'Sullivan MJ. Is antiretroviral therapy during pregnancy associated with an increased risk of preterm delivery, low birth weight, or stillbirth? *J Infect Dis* 2006;193:1195-1201.

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

Chakraborty H, Sen PK, Helms RW, Vernazza PL, Fiscus SA, Eron JJ, et al. Viral burden in genital secretions determines male-to-female sexual transmission of HIV-1: a probabilistic empiric model. *AIDS* 2001;15:621-627.

Chang MH. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Clin Invest Med* 1996;19:368-372.

Chen JL, Philips KA, Kanouse DE, Collins RL and Miu A. Fertility desires and intentions of HIV-positive men and women. *Fam Plann Perspect* 2001;33:144-152, 165.

Chen KT, Segu M, Lumey LH, Kuhn L, Carter RJ, Bulterys M, et al. Genital herpes simplex virus infection and perinatal transmission of human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol* 2005;106:1341-1348.

Chen XQ, Liu C and Kong XH. The role of HIV replicative fitness in perinatal transmission of HIV. *Virol Sin* 2011;26:147-155.

Cheng-Mayer C and Levy JA. Distinct biological and serological properties of human immunodeficiency viruses from the brain. *Ann Neurol* 1988;23 Suppl:S58-61.

Cherukuri A, Shoham T, Sohn HW, Levy S, Brooks S, Carter R, et al. The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol* 2004;172:370-380.

Chiasson MA, Stoneburner RL and Joseph SC. Human immunodeficiency virus transmission through artificial insemination. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990;3:69-72.

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

Chrystie IL, Mullen JE, Braude PR, Rowell P, Williams E, Elkington N, et al. Assisted conception in HIV discordant couples: evaluation of semen processing techniques in reducing HIV viral load. *J Reprod Immunol* 1998;41:301-306.

Chu MC, Pena JE, Nakhuda GS, Thornton MH, 2nd and Sauer MV. Assessing the reproductive performance of men co-infected with HIV-1 and hepatitis C undergoing assisted reproduction. *Arch Gynecol Obstet* 2006;274:155-159.

Chu MC, Pena JE, Thornton MH, 2nd and Sauer MV. Assessing the treatment efficacy of IVF with intracytoplasmic sperm injection in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) serodiscordant couples. *Reprod Biomed Online* 2005;10:130-134.

da Silveira Rossi A, Fonsechi-Carvasan GA, Makuch MY, Amaral E and Bahamondes L. Factors associated with reproductive options in HIV-infected women. *Contraception* 2005;71:45-50.

Davison F, Alexander GJ, Trowbridge R, Fagan EA and Williams R. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. *J Hepatol* 1987;4:37-44.

De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, Hoff E, et al. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA* 2000;283:1175-1182.

De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A and Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril* 2004;82:57-65.

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

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

Debono E, Halfon P, Bourliere M, Gerolami-Santandrea V, Gastaldi M, Castellani P, et al. Absence of hepatitis C genome in semen of infected men by polymerase chain reaction, branched DNA and in situ hybridization. *Liver* 2000;20:257-261.

Deforges S, Evlashev A, Perret M, Sodoyer M, Pouzol S, Scoazec JY, et al. Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol* 2004;85:2515-2523.

Del Romero J, Castilla J, Hernando V, Rodriguez C and Garcia S. Combined antiretroviral treatment and heterosexual transmission of HIV-1: cross sectional and prospective cohort study. *BMJ* 2010;340:c2205.

Del Romero J, Castilla J, Marincovich B, Hernando V, Garcia S and Rodriguez C. Mujeres que son pareja de un varon infectado por el VIH: descripcion de sus características y valoración del riesgo. *Aten Primaria* 2004;34:420-426.

Delgado-Iribarren A, Echeverria J and León P. Serologías de las hepatitis víricas. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2004.

Delgado R, García F, Eiros J, Lopez J and Ortiz R. Diagnostico microbiológico de la infección por el VIH. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2006.

Devaux A, Soula V, Sifer C, Branger M, Naouri M, Porcher R, et al. Hepatitis C virus detection in follicular fluid and culture media from HCV+ women, and viral risk during IVF procedures. Hum Reprod 2003;18:2342-2349.

Diago M. Tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C. Estado actual y perspectivas. Gastroenterol Hepatol 2008;31:596-605.

Dickover RE, Garratty EM, Herman SA, Sim MS, Plaeger S, Boyer PJ, et al. Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission. Effect of maternal zidovudine treatment on viral load. JAMA 1996;275:599-605.

Dienstag JL. Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. Hepatology 1997;26:66S-70S.

Dominguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P and Salleras L. Changes in the seroepidemiology of hepatitis B infection in Catalonia 1989-1996. Vaccine 2000;18:2345-2350.

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

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

Downs AM and De Vincenzi I. Probability of heterosexual transmission of HIV: relationship to the number of unprotected sexual contacts. European Study Group in Heterosexual Transmission of HIV. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1996;11:388-395.

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

Drake AL, John-Stewart GC, Wald A, Mbori-Ngacha DA, Bosire R, Wamalwa DC, et al. Herpes simplex virus type 2 and risk of intrapartum human immunodeficiency virus transmission. Obstet Gynecol 2007;109:403-409.

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

Duffaut M and Valla D. Procreation medicament assistee et infection par le virus de l'hepatite C. *Contracept Fertil Sex* 1997;25:534-537.

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

Durazzo M, Premoli A, Di Bisceglie C, Bertagna A, Faga E, Biroli G, et al. Alterations of seminal and hormonal parameters: An extrahepatic manifestation of HCV infection? *World J Gastroenterol* 2006;12:3073-3076.

Dyer S and Pennings G. Considerations regarding government funding of assisted reproductive techniques in low-resource settings. *F, V & V IN OBGYN* 2010;Monograph:17-21.

Edwards A, Elwyn G and Mulley A. Explaining risks: turning numerical data into meaningful pictures. *BMJ* 2002;324:827-830.

Edwards R and Brody S. Principles and practice of assisted human reproduction. Philadelphia (USA): W.B. Saunders Company Published; 1995.

Eke AC and Oragwu C. Sperm washing to prevent HIV transmission from HIV-infected men but allowing conception in sero-discordant couples. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;1:CD008498.

Elder K, Baker D and Ribes J. Infections, Infertility, and Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press; 2005.

Ellish NJ, Saboda K, O'Connor J, Nasca PC, Stanek EJ and Boyle C. A prospective study of early pregnancy loss. *Hum Reprod* 1996;11:406-412.

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

Englert Y, Moens E, Vannin AS, Liesnard C, Emiliani S, Delbaere A, et al. Impaired ovarian stimulation during in vitro fertilization in women who are seropositive for hepatitis C virus and seronegative for human immunodeficiency virus. *Fertil Steril* 2007;88:607-611.

ESHRE Capri Workshop Group. Social determinants of human reproduction. *Hum Reprod* 2001;16:1518-1526.

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

European Centre for Disease Prevention and Control. Hepatitis B and C in the EU neighbourhood: prevalence, burden of disease and screening policies. Stockholm: ECDC; 2010.

European Collaborative Study. Swiss Mother and Child HIV Cohort Study. Combination antiretroviral therapy and duration of pregnancy. *AIDS* 2000;14:2913-2920.

European Collaborative Study. Exposure to antiretroviral therapy in utero or early life: the health of uninfected children born to HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;32:380-387.

European Collaborative Study. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2005;40:458-465.

European Mode of Delivery Collaboration. Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. *Lancet* 1999;353:1035-1039.

Evans BA, McCormack SM, Bond RA, MacRae KD and Thorp RW. Human immunodeficiency virus infection, hepatitis B virus infection, and sexual behaviour of women attending a genitourinary medicine clinic. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988;296:473-475.

Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007;446:801-805.

Everson G and H W. *Living With Hepatitis B: A Survivor's Guide*. New York: Hatherleigh Press; 2002.

Ezeanochie M, Olagbuji B, Ande A and Oboro V. Fertility preferences, condom use, and concerns among HIV-positive women in serodiscordant relationships in the era of antiretroviral therapy. *Int J Gynaecol Obstet* 2009;107:97-98.

Fagan EA, Alexander GJ, Davison F and Williams R. Persistence of free HBV DNA in body secretions and liver despite loss of serum HBV DNA after interferon-induced seroconversion. *J Med Virol* 1986;20:183-188.

Fawzi W, Msamanga G, Renjifo B, Spiegelman D, Urassa E, Hashemi L, et al. Predictors of intrauterine and intrapartum transmission of HIV-1 among Tanzanian women. *AIDS* 2001;15:1157-1165.

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

Feldman-Stewart D, Kocovski N, McConnell BA, Brundage MD and Mackillop WJ. Perception of quantitative information for treatment decisions. *Med Decis Making* 2000;20:228-238.

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

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

Fiore JR, Lorusso F, Vacca M, Ladisa N, Greco P and De Palo R. The efficiency of sperm washing in removing human immunodeficiency virus type 1 varies according to the seminal viral load. *Fertil Steril* 2005;84:232-234.

Fiore RJ, Potenza D, Monno L, Appice A, DiStefano M, Giannelli A, et al. Detection of HCV RNA in serum and seminal fluid from HIV-1 co-infected intravenous drug addicts. *J Med Virol* 1995;46:364-367.

Fiscus SA, Adimora AA, Schoenbach VJ, McKinney R, Lim W, Rupar D, et al. Trends in human immunodeficiency virus (HIV) counseling, testing, and antiretroviral treatment of HIV-infected women and perinatal transmission in North Carolina. *J Infect Dis* 1999;180:99-105.

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

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

Fordyce EJ, Singh TP, Nash D, Gallagher B and Forlenza S. Survival rates in NYC in the era of combination ART. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;30:111-118.

Forton DM, Thomas HC and Taylor-Robinson SD. Central nervous system involvement in hepatitis C virus infection. *Metab Brain Dis* 2004;19:383-391.

Fried MW, Shindo M, Fong TL, Fox PC, Hoofnagle JH and Di Bisceglie AM. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992;102:1306-1308.

Frodsham LC, Boag F, Barton S and Gilling-Smith C. Human immunodeficiency virus infection and fertility care in the United Kingdom: demand and supply. *Fertil Steril* 2006;85:285-289.

Fujikawa LS, Salahuddin SZ, Palestine AG, Masur H, Nussenblatt RB and Gallo RC. Isolation of human T-lymphotropic virus type III from the tears of a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Lancet* 1985;2:529-530.

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

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

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

Gallant JE. Strategies for long-term success in the treatment of HIV infection. JAMA 2000;283:1329-1334.

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

Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK, et al. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. N Engl J Med 1999;341:394-402.

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

Garrido N and Meseguer M. Use of washed sperm for assisted reproduction in HIV-positive males without checking viral absence. A risky business? Hum Reprod 2006;21:567-568; author reply 568.

Garrido N, Meseguer M, Bellver J, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Report of the results of a 2 year programme of sperm wash and ICSI treatment for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus serodiscordant couples. Hum Reprod 2004;19:2581-2586.

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

Gatell J. La Infección VIH: ¿erradicarla o controlarla? Med Clin (Barc) 1999;113:741-742.

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

Gigerenzer G and Hoffrage U. How to improve Bayesian reasoning without instruction: Frequency formats. Psychol Rev 1995;102:684-704.

Gil T, Castilla JA, Hortas ML, Molina J, Redondo M, Samaniego F, et al. CD4+ cells in human ejaculates. Hum Reprod 1995;10:2923-2927.

Giles J, Garrido N, Vidal C, Meseguer M, Blanes M and Bellver J. Enfermedades infecciosas: VIH, VHB, VHC y sífilis. En: Garcia J, editor. Cuadernos de Medicina Reproductiva. Madrid: Adalia; 2006. p. 71-84.

Gilling-Smith C. HIV prevention. Assisted reproduction in HIV-discordant couples. *AIDS Read* 2000;10:581-587.

Gilling-Smith C, Nicopoullou JD, Semprini AE and Frodsham LC. HIV and reproductive care--a review of current practice. *BJOG* 2006;113:869-878.

Gingelmaier A, Wiedenmann K, Sovric M, Mueller M, Kupka MS, Sonnenberg-Schwan U, et al. Consultations of HIV-infected women who wish to become pregnant. *Arch Gynecol Obstet* 2011;283:893-898.

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

Goldstein ST, Alter MJ, Williams IT, Moyer LA, Judson FN, Mottram K, et al. Incidence and risk factors for acute hepatitis B in the United States, 1982-1998: implications for vaccination programs. *J Infect Dis* 2002;185:713-719.

González F, González A, Martínez M, Fontes J, Martínez F, Molini J, et al. Esterilidad General I. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. Madrid: Adalia; 2007. p. 3-72.

González N. Toxoplasmosis. Documento de Consenso de la SEGO. Madrid: Meditex; 2001.

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

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

Goto Y, Yeh CK, Notkins AL and Prabhakar BS. Detection of proviral sequences in saliva of patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991;7:343-347.

Gottlieb GS, Eholie SP, Nkengasong JN, Jallow S, Rowland-Jones S, Whittle HC, et al. A call for randomized controlled trials of antiretroviral therapy for HIV-2 infection in West Africa. *AIDS* 2008;22:2069-2072; discussion 2073-2064.

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

Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM and Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993;67:1385-1395.

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

Gregson S, Zaba B and Garnett GP. Low fertility in women with HIV and the impact of the epidemic on orphanhood and early childhood mortality in sub-Saharan Africa. *AIDS* 1999;13 Suppl A:S249-257.

Griffin S, Clarke D, McCormick C, Rowlands D and Harris M. Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *J Virol* 2005;79:15525-15536.

Hadchouel M, Scotto J, Huret JL, Molinie C, Villa E, Degos F, et al. Presence of HBV DNA in spermatozoa: a possible vertical transmission of HBV via the germ line. *J Med Virol* 1985;16:61-66.

Hadzic N. Hepatitis C in pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2001;84:F201-204.

Halfon P, Giorgetti C, Khiri H, Penaranda G, Terriou P, Porcu-Buisson G, et al. Semen may harbor HIV despite effective HAART: another piece in the puzzle. *PLoS One* 2010;5:e10569.

Hanafi NF, Abo Ali AH and Abo el kheir HF. ICSI outcome in women who have positive PCR result for hepatitis C virus. *Hum Reprod* 2011;26:143-147.

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

Harlow SD, Cohen M, Ohmit SE, Schuman P, Cu-Uvin S, Lin X, et al. Substance use and psychotherapeutic medications: a likely contributor to menstrual disorders in women who are seropositive for human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:881-886.

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

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

Heard I, Sitta R and Lert F. Reproductive choice in men and women living with HIV: evidence from a large representative sample of outpatients attending French hospitals (ANRS-EN12-VESPA Study). *AIDS* 2007;21 Suppl 1:S77-82.

Heathcote J, Cameron CH and Dane DS. Hepatitis-B antigen in saliva and semen. *Lancet* 1974;1:71-73.

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

Hershow RC, Riester KA, Lew J, Quinn TC, Mofenson LM, Davenny K, et al. Increased vertical transmission of human immunodeficiency virus from hepatitis C virus-coinfected mothers. Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* 1997;176:414-420.

Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M and Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5547-5551.

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

Hino O, Tabata S and Hotta Y. Evidence for increased in vitro recombination with insertion of human hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9248-9252.

Hira SK, Kamanga J, Macuacua R, Mwansa N, Cruess DF and Perine PL. Genital ulcers and male circumcision as risk factors for acquiring HIV-1 in Zambia. *J Infect Dis* 1990;161:584-585.

HIV sequence database [en línea]. 2011 [acceso 1 Sep 2011]. ELF Explanation. Disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ELF/explanation.html>

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

Hofny ER, Ali ME, Taha EA, Nafeh HM, Samir Sayed D, Abdel-Azeem HG, et al. Semen and hormonal parameters in men with chronic hepatitis C infection. *Fertil Steril* 2011;95:2557-2559.

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

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

Hollingsworth RC, Jameson CL, Minton JE, Crowe M, Curran R, Rowe T, et al. GBV-C/HGV coinfection in HIV-1-positive men: frequent detection of viral RNA in blood plasma but absence from seminal fluid plasma. *J Med Virol* 1998;56:321-326.

Honeck P, Weigel M, Kwon ST, Alken P and Bross S. Assisted procreation in cases of hepatitis B, hepatitis C or human immunodeficiency virus infection of the male partner. *Hum Reprod* 2006;21:1117-1121.

Honig SC, Lipshultz LI and Jarow J. Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation. *Fertil Steril* 1994;62:1028-1034.

Hosseinipour M, Cohen MS, Vernazza PL and Kashuba AD. Can antiretroviral therapy be used to prevent sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1? *Clin Infect Dis* 2002;34:1391-1395.

Howard CR. The biology of hepadnaviruses. *J Gen Virol* 1986;67 (Pt 7):1215-1235.

Hsu HH, Wright TL, Luba D, Martin M, Feinstone SM, Garcia G, et al. Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. *Hepatology* 1991;14:763-767.

Hu XL, Zhou XP, Qian YL, Wu GY, Ye YH and Zhu YM. The presence and expression of the hepatitis B virus in human oocytes and embryos. *Hum Reprod* 2011;26:1860-1867.

Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Liu HX, et al. Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J Gastroenterol* 2003;9:736-740.

Huang TH, Zhang QJ, Xie QD, Zeng LP and Zeng XF. Presence and integration of HBV DNA in mouse oocytes. *World J Gastroenterol* 2005;11:2869-2873.

Hunt CM, Carson KL and Sharara AI. Hepatitis C in pregnancy. *Obstet Gynecol* 1997;89:883-890.

Hunter DJ, Maggwa BN, Mati JK, Tukei PM and Mbugua S. Sexual behavior, sexually transmitted diseases, male circumcision and risk of HIV infection among women in Nairobi, Kenya. *AIDS* 1994;8:93-99.

Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, McNeilly AS, Mather JP, et al. Inhibin-B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1321-1325.

Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía. Anuario Estadístico de Andalucía 2009. [en línea] Consejería de Economía, Innovación y Ciencia; 2009 [acceso 4 Feb 2011] Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/institutodeestadisticaycartografia/anuario/anuario09/index.htm>.

Instituto Nacional de Estadística. ¿Cuántos somos en casa? Boletín informativo del Instituto Nacional de Estadística [en línea] 2004 [acceso 4 Feb 2011] Disponible en:

http://www.ine.es/ss/Satellite?L=0&c=INECifrasINE_C&cid=1259925137801&p=1254735116567&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout.

International Perinatal HIV Group. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1-a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. The International Perinatal HIV Group. *N Engl J Med* 1999;340:977-987.

International Perinatal HIV Group. Duration of ruptured membranes and vertical transmission of HIV-1: a meta-analysis from 15 prospective cohort studies. *AIDS* 2001;15:357-368.

Jabeen T, Cannon B, Hogan J, Crowley M, Devereux C, Fanning L, et al. Pregnancy and pregnancy outcome in hepatitis C type 1b. *QJM* 2000;93:597-601.

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

Jacobson TZ, Barlow DH, Koninckx PR, Olive D and Farquhar C. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2002CD001398.

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

Jarrow J and Sigman M. Office evaluation of the subfertile male. *J Uro* 1999;152:2017-2019.

Jenison SA, Lemon SM, Baker LN and Newbold JE. Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in saliva and semen of chronically infected homosexual men. *J Infect Dis* 1987;156:299-307.

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

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

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

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

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

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

Karayiannis P, Novick DM, Lok AS, Fowler MJ, Monjardino J and Thomas HC. Hepatitis B virus DNA in saliva, urine, and seminal fluid of carriers of hepatitis B e antigen. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;290:1853-1855.

Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159.

Kato S, Hanabusa H, Kaneko S, Takakuwa K, Suzuki M, Kuji N, et al. Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. *AIDS* 2006;20:967-973.

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

Kay A and Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 2007;127:164-176.

Keller C and Siegrist M. Effect of risk communication formats on risk perception depending on numeracy. *Med Decis Making* 2009;29:483-490.

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

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

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

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

Kourtis AP. Antiretroviral drug use during pregnancy and risk of premature delivery: is there a connection? *J Infect Dis* 2010;201:978-980.

Kourtis AP, Schmid CH, Jamieson DJ and Lau J. Use of antiretroviral therapy in pregnant HIV-infected women and the risk of premature delivery: a meta-analysis. *AIDS* 2007;21:607-615.

Kowalska A, Maciejewski J, Niemeiec T, Scholz A, Lipniacki A and Piasek A. Efficacy and safety of assisted reproduction techniques in HIV-serodiscordant couples. *HIV AIDS Rev* 2005;4:7-10.

Kvist U and Björndahl L. *ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis*. Oxford Oxford University Press; 2002.

Labarga P, Martinez E, Soriano V and Barreiro P. Reproductive advice in HIV-discordant couples. *Med Clin (Barc)* 2007;129:140-148.

Lam PM, Suen SH, Lao TT, Cheung LP, Leung TY and Haines C. Hepatitis B infection and outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer treatment. *Fertil Steril* 2010;93:480-485.

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

Land JA, Gijzen AP, Evers JL and Bruggeman CA. Chlamydia trachomatis in subfertile women undergoing uterine instrumentation. Screen or treat? *Hum Reprod* 2002;17:525-527.

Lang ZW. Distribution of hepatitis B virus in testicle tissue in patients with hepatitis B infection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1993;73:329-331, 379.

Lasheeb AS, King J, Ball JK, Curran R, Barratt CL, Afnan M, et al. Semen characteristics in HIV-1 positive men and the effect of semen washing. *Genitourin Med* 1997;73:303-305.

Laudat A, Blum L, Guechot J, Picard O, Cabane J, Imbert JC, et al. Changes in systemic gonadal and adrenal steroids in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected men: relationship with the CD4 cell counts. *Eur J Endocrinol* 1995;133:418-424.

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

Lee S, Revas-Toro H and Rozis G. Tratamento com IIU e ICSI para homens HIV positivo com parceiras HIV negativo: método de redução de riscos. *J Brasil Reprod Assist* 2001;5:64-65.

Leruez-Ville M, Kunstmann JM, De Almeida M, Rouzioux C and Chaix ML. Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. *Lancet* 2000;356:42-43.

Lesourd F, Izopet J, Mervan C, Payen JL, Sandres K, Monrozies X, et al. Transmissions of hepatitis C virus during the ancillary procedures for assisted conception. *Hum Reprod* 2000;15:1083-1085.

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

Levy JA and Fieldsteel AH. Freeze-drying is an effective method for preserving infectious type C retroviruses. *J Virol Methods* 1982;5:165-171.

Levy JA, Mitra G and Mozen MM. Recovery and inactivation of infectious retroviruses from factor VIII concentration. *Lancet* 1984;2:722-723.

Levy JA, Mitra GA, Wong MF and Mozen MM. Inactivation by wet and dry heat of AIDS-associated retroviruses during factor VIII purification from plasma. *Lancet* 1985;1:1456-1457.

Levy M and Koren G. Hepatitis B vaccine in pregnancy: maternal and fetal safety. *Am J Perinatol* 1991;8:227-232.

Levy R, Tardy JC, Bourlet T, Cordonier H, Mion F, Lornage J, et al. Transmission risk of hepatitis C virus in assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:810-816.

Lewis SH, Reynolds-Kohler C, Fox HE and Nelson JA. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet* 1990;335:565-568.

Li JJ, Friedman-Kien AE, Huang YQ, Mirabile M and Cao YZ. HIV-1 DNA proviral sequences in fresh urine pellets from HIV-1 seropositive persons. *Lancet* 1990;335:1590-1591.

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

Liddle C. Hepatitis C. *Anaesth Intensive Care* 1996;24:180-183.

Liederman EM, Post JC, Aul JJ, Sirko DA, White GJ, Buchman CA, et al. Analysis of adult otitis media: polymerase chain reaction versus culture for bacteria and viruses. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107:10-16.

Linnemann CC, Jr. and Goldberg S. Letter: Hepatitis-B antigen in saliva and semen. *Lancet* 1974;1:320.

Liou TC, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY and Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 1992;37:197-202.

Lipkus IM and Peters E. Understanding the role of numeracy in health: proposed theoretical framework and practical insights. *Health Educ Behav* 2009;36:1065-1081.

Liu J, Wright ER and Winkler H. 3D visualization of HIV virions by cryoelectron tomography. *Methods Enzymol* 2010;483:267-290.

Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2004;24 Suppl 1:3-10.

Lopez S, Coll O, Durban M, Hernandez S, Vidal R, Suy A, et al. Mitochondrial DNA depletion in oocytes of HIV-infected antiretroviral-treated infertile women. *Antivir Ther* 2008;13:833-838.

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

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

Luceño F, Vidal E, Castilla J, Gómez-Palomares J, Fernandez- Shaw S, Cabello Y, et al. Registro FIV-ICSI de la Sociedad Española de Fertilidad. Año 2008. *Rev Iber Fert* 2010;27 (supl 2):9-31.

Luciw PA, Cheng-Mayer C and Levy JA. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:1434-1438.

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

Lundin K, Bergh C and Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;16:2652-2657.

Lutgens SP, Nelissen EC, van Loo IH, Koek GH, Derhaag JG and Dunselman GA. To do or not to do: IVF and ICSI in chronic hepatitis B virus carriers. *Hum Reprod* 2009;24:2676-2678.

Maddon PJ, Dagleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA and Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986;47:333-348.

Magyar DM, Boyers SP, Marshall JR and Abraham GE. Regular menstrual cycles and premenstrual molimina as indicators of ovulation. *Obstet Gynecol* 1979;53:411-414.

Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:351-366.

Malim MH and Emerman M. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 2008;3:388-398.

Manigart Y, Rozenberg S, Barlow P, Gerard M, Bertrand E and Delvigne A. ART outcome in HIV-infected patients. *Hum Reprod* 2006;21:2935-2940.

Marcelin AG, Tubiana R, Lambert-Niclot S, Lefebvre G, Dominguez S, Bonmarchand M, et al. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. *AIDS* 2008;22:1677-1679.

Marina S, Marina F, Alcolea R, Exposito R, Huguet J, Nadal J, et al. Human immunodeficiency virus type 1--serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1998a;70:35-39.

Marina S, Marina F, Alcolea R, Nadal J, Exposito R and Huguet J. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man. *Hum Reprod* 1998b;13:3247-3249.

Marina S, Marina F, Expósito R, Alcolea R, Pérez N, Bermejo B, et al. HIV y reproducción asistida. Reproducción Asistida en parejas serodiscordantes (hombre seropositivo) al VIH-1: experiencia de 118 niños nacidos sanos. *Ginecol Obstet Clin* 2002;3:146-150.

Mascola L and Guinan ME. Screening to reduce transmission of sexually transmitted diseases in semen used for artificial insemination. *N Engl J Med* 1986;314:1354-1359.

Massad LS, Springer G, Jacobson L, Watts H, Anastos K, Korn A, et al. Pregnancy rates and predictors of conception, miscarriage and abortion in US women with HIV. *AIDS* 2004;18:281-286.

Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, Brink EW, Goldstein ST, Wang SA, et al. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR Recomm Rep* 2005;54:1-31.

Mastromatteo AM, Rapaccini GL, Pompili M, Ursino S, Romano-Spica V, Gasbarrini G, et al. Hepatitis C virus infection: other biological fluids than blood may be responsible for intrafamilial spread. *Hepatogastroenterology* 2001;48:193-196.

Matorras R and Hernández J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. Madrid: Adalia; 2007.

Matthews LT, Baeten JM, Celum C and Bangsberg DR. Periconception pre-exposure prophylaxis to prevent HIV transmission: benefits, risks, and challenges to implementation. *AIDS* 2010;24:1975-1982.

Matz B, Kupfer B, Ko Y, Walger P, Vetter H, Eberle J, et al. HIV-1 infection by artificial insemination. *Lancet* 1998;351:728.

McDougal JS, Martin LS, Cort SP, Mozen M, Heldebrant CM and Evatt BL. Thermal inactivation of the acquired immunodeficiency syndrome virus, human T lymphotropic virus-III/lymphadenopathy-associated virus, with special reference to antihemophilic factor. *J Clin Invest* 1985;76:875-877.

McKee TA, Avery S, Majid A and Brinsden PR. Risks for transmission of hepatitis C virus during artificial insemination. *Fertil Steril* 1996;66:161-163.

Medhat A, el-Sharkawy MM, Shaaban MM, Makhlof MM and Ghaneima SE. Acute viral hepatitis in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 1993;40:25-31.

Melo MA, Meseguer M, Bellver J, Remohi J, Pellicer A and Garrido N. Human immunodeficiency type-1 virus (HIV-1) infection in serodiscordant couples (SDCs) does not have an impact on embryo quality or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome. *Fertil Steril* 2008;89:141-150.

Mencaglia L, Falcone P, Lentini GM, Consigli S, Pisoni M, Lofiego V, et al. ICSI for treatment of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus-serodiscordant couples with infected male partner. *Hum Reprod* 2005;20:2242-2246.

Meredith LW, Sivakumaran H, Major L, Suhrbier A and Harrich D. Potent inhibition of HIV-1 replication by a Tat mutant. *PLoS One* 2009;4:e7769.

Meriano J, Clark C, Cadesky K and Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online* 2004;9:511-520.

Meseguer M, Garrido N, Gimeno C, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Comparison of polymerase chain reaction-dependent methods for determining the presence of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in washed sperm. *Fertil Steril* 2002;78:1199-1202.

Michel N, Allespach I, Venzke S, Fackler OT and Keppler OT. The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol* 2005;15:714-723.

Miller MD, Feinberg MB and Greene WC. The HIV-1 nef gene acts as a positive viral infectivity factor. *Trends Microbiol* 1994;2:294-298.

Miller MD, Warmerdam MT, Page KA, Feinberg MB and Greene WC. Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J Virol* 1995;69:579-584.

Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad. Otra perspectiva del VIH en España. Zum [en línea] Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad; 2010 [acceso 4 Agos 2011] Disponible en: <http://www.mspsi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/docs/RevistaZUMDic2010.pdf>.

Mohsen AH. The epidemiology of hepatitis C in a UK health regional population of 5.12 million. *Gut* 2001;48:707-713.

Moore JP, Parren PW and Burton DR. Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J Virol* 2001;75:5721-5729.

Moretti E, Federico MG, Giannerini V and Collodel G. Sperm ultrastructure and meiotic segregation in a group of patients with chronic hepatitis B and C. *Andrologia* 2008;40:286-291.

Mortimer D. *Practical laboratory andrology*. Oxford: Oxford University Press; 1994.

Mosher WD and Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 1991;56:192-193.

Muciaccia B, Filippini A, Ziparo E, Colelli F, Baroni CD and Stefanini M. Testicular germ cells of HIV-seropositive asymptomatic men are infected by the virus. *J Reprod Immunol* 1998;41:81-93.

Muller CH, Coombs RW and Krieger JN. Effects of clinical stage and immunological status on semen analysis results in human immunodeficiency virus type 1-seropositive men. *Andrologia* 1998;30 Suppl 1:15-22.

Mwanyumba F, Gaillard P, Inion I, Verhofstede C, Claeys P, Chohan V, et al. Placental inflammation and perinatal transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29:262-269.

Mwapasa V, Rogerson SJ, Kwiek JJ, Wilson PE, Milner D, Molyneux ME, et al. Maternal syphilis infection is associated with increased risk of mother-to-child transmission of HIV in Malawi. *AIDS* 2006;20:1869-1877.

Naumova AK, Korenev VI, Leonov BV, Tsibinogin VV and Kiselev LL. DNK virusa gepatita B v generativnykh kletkakh cheloveka. *Genetika* 1986;22:166-168.

Navas E, Bayas JM, Taberner JL and Salleras L. Eficiencia de la detección prevacunal de anti-HBc en los programas de vacunación antihepatitis B. *Med Clin (Barc)* 1992;99:641-644.

Neil S and Bieniasz P. Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:569-580.

Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR and Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod* 2003;18:1307-1312.

Neuspiller F, Ardiles G, Requena A, García-Velasco J, Pellicer A and Remohí J. Actitud frente a situaciones especiales. En: Remohí J, Romero J et al., editores. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. Madrid: Mc Graw-Hill/Interamericana; 2000. p. 129-150.

Newell ML and Pembrey L. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *Drugs Today (Barc)* 2002;38:321-337.

Nicolás M, Ballesteros A, Landeras J, Fernández L, Villaquirán A, Mollá M, et al. Inseminación Artificial. En: Remohí J, editor. *Manual práctico de reproducción humana*. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España; 2004. p. 142-156.

Nicopoulos JD, Almeida P, Vourliotis M and Gilling-Smith C. A decade of the sperm-washing programme: correlation between markers of HIV and seminal parameters. *HIV Med* 2010a;12:195-201.

Nicopoulos JD, Almeida P, Vourliotis M, Goulding R and Gilling-Smith C. A decade of the sperm-washing programme: where are we now? *Hum Fertil (Camb)* 2010b;13:90-97.

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

Niederman TM, Thielan BJ and Ratner L. Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:1128-1132.

Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W and Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 2006;80:2418-2428.

Nieschlag E and Behre H. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Heidelberg: Springer; 1997.

Nuovo GJ, Becker J, Simsir A, Margiotta M, Khalife G and Shevchuk M. HIV-1 nucleic acids localize to the spermatogonia and their progeny. A study by polymerase chain reaction in situ hybridization. *Am J Pathol* 1994;144:1142-1148.

Oger P, Yazbeck C, Gervais A, Dorphin B, Gout C, Jacquesson L, et al. Adverse effects of hepatitis B virus on sperm motility and fertilization ability during IVF. *Reprod Biomed Online* 2011;23:207-212.

Ohl J and Partisani M. Desir d'enfant et infections virales: hepatites C et B et virus de l'immunodeficiencia humana. *Gynecol Obstet Fertil* 2007;35:1035-1038.

Ohl J, Partisani M, Wittemer C, Schmitt MP, Cranz C, Stoll-Keller F, et al. Assisted reproduction techniques for HIV serodiscordant couples: 18 months of experience. *Hum Reprod* 2003;18:1244-1249.

Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C, Kako M, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:744-750.

Okamoto T. Positive and negative regulation of transcription from HIV provirus. *Virus* 2011;61:81-89.

Ombelet W, Van Balen, F. Summary of an Expert meeting on "Social Aspects of Accessible Infertility Care in Developing Countries". F, V & V IN OBGYN 2010;Monograph:66-72.

OMS-ONUSIDA. Antiretroviral therapy and sexual transmission of HIV. [en línea] 2008 [acceso Disponible en: http://data.unaids.org/pub/PressStatement/2008/080201_hivtransmission_en.pdf.

Opsahl MS, Miller B and Klein TA. The predictive value of hysterosalpingography for tubal and peritoneal infertility factors. *Fertil Steril* 1993;60:444-448.

Osmond D. Epidemiology and Transmission. En: Cohen P, Sande M et al., editores. *The AIDS Knowledge base*. San Francisco; 1999.

Ostergren M and Malyuta R. Elimination of HIV infection in infants in Europe--challenges and demand for response. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:54-57.

Overbaugh J, Miller AD and Eiden MV. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:371-389.

Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A and Rosenwaks Z. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 1995;7:211-217; discussion 217-218.

Pallas JR, Farinas-Alvarez C, Prieto D and Delgado-Rodriguez M. Coinfections by HIV, hepatitis B and hepatitis C in imprisoned injecting drug users. *Eur J Epidemiol* 1999;15:699-704.

Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. Department of Health and Human Services [en línea] 2011 [acceso 23 Oct 2011] Disponible en: <http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.

Panozzo L, Battegay M, Friedl A and Vernazza PL. High risk behaviour and fertility desires among heterosexual HIV-positive patients with a serodiscordant partner--two challenging issues. *Swiss Med Wkly* 2003;133:124-127.

Papaxanthos-Roche A, Trimoulet P, Commenges-Ducos M, Hocke C, Fleury HJ and Mayer G. PCR-detected hepatitis C virus RNA associated with human zona-intact oocytes collected from infected women for ART. *Hum Reprod* 2004;19:1170-1175.

Pascual A and Corral J. El Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Inmunopatogenia. En: Pachón J, Pujol E et al., editores. *La Infección por el VIH: Guía práctica*. Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas; 2003. p. 29-36.

Pasquau J, Valera B and García P. Mecanismos de transmisión del VIH. En: Pachón J, Pujol E et al., editores. La Infección por el VIH: Guía práctica. Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas; 2003. p. 55-65.

Pasquier C, Anderson D, Andreutti-Zaugg C, Baume-Berkenbosch R, Damond F, Devaux A, et al. Multicenter quality control of the detection of HIV-1 genome in semen before medically assisted procreation. *J Med Virol* 2006a;78:877-882.

Pasquier C, Andreutti C, Bertrand E, Bostan A, Bourlet T, Molina I, et al. Multicenter assessment of HIV-1 RNA quantitation in semen in the CREATHE network. *J Med Virol* 2011;in press.

Pasquier C, Daudin M, Righi L, Berges L, Thauvin L, Berrebi A, et al. Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. *AIDS* 2000;14:2093-2099.

Pasquier C, Saune K, Raymond S, Moinard N, Daudin M, Bujan L, et al. Determining seminal plasma human immunodeficiency virus type 1 load in the context of efficient highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2009;47:2883-2887.

Pasquier C, Souyris C, Moinard N, Bujan L and Izopet J. Validation of an automated real-time PCR protocol for detection and quantitation of HIV and HCV genomes in semen. *J Virol Methods* 2006b;137:156-159.

Pasquier CJ, Moinard N, Saune K, Souyris C, Lavit M, Daudin M, et al. Persistent differences in the antiviral effects of highly active antiretroviral therapy in the blood and male genital tract. *AIDS* 2008;22:1894-1896.

Patel K, Shapiro DE, Brogly SB, Livingston EG, Stek AM, Bardeguéz AD, et al. Prenatal protease inhibitor use and risk of preterm birth among HIV-infected women initiating antiretroviral drugs during pregnancy. *J Infect Dis* 2010;201:1035-1044.

Pavili L, Daudin M, Moinard N, Walschaerts M, Cuzin L, Massip P, et al. Decrease of mitochondrial DNA level in sperm from patients infected with human immunodeficiency virus-1 linked to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Fertil Steril* 2010;94:2151-2156.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF and Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;12:532-541.

Pedraza MA, del Romero J, Roldan F, Garcia S, Ayerbe MC, Noriega AR, et al. Heterosexual transmission of HIV-1 is associated with high plasma viral load levels and a positive viral isolation in the infected partner. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;21:120-125.

Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P and Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:960-963.

Peña JE, Thornton MH and Sauer MV. Assessing the clinical utility of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection in human immunodeficiency virus type 1 serodiscordant couples: report of 113 consecutive cycles. *Fertil Steril* 2003;80:356-362.

Pérez A. Hepatitis crónica por VHB y su tratamiento con interferón. *Gastroenterol Hepatol* 2006;29:27-31.

Peters E, Hart PS and Fraenkel L. Informing patients: the influence of numeracy, framing, and format of side effect information on risk perceptions. *Med Decis Making* 2011;31:432-436.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941.

Piomboni P and Baccetti B. Spermatozoon as a vehicle for HIV-1 and other viruses: a review. *Mol Reprod Dev* 2000;56:238-242.

Pirwany IR, Phillips S, Kelly S, Buckett W and Tan SL. Reproductive performance of couples discordant for hepatitis B and C following IVF treatment. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:157-161.

Plummer FA, Simonsen JN, Cameron DW, Ndinya-Achola JO, Kreiss JK, Gakinya MN, et al. Cofactors in male-female sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1991;163:233-239.

Politch JA, Mayer KH, Abbott AF and Anderson DJ. The effects of disease progression and zidovudine therapy on semen quality in human immunodeficiency virus type 1 seropositive men. *Fertil Steril* 1994;61:922-928.

Popper SJ, Sarr AD, Travers KU, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, Essex ME, et al. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* 1999;180:1116-1121.

Powis KM, Kitch D, Ogwu A, Hughes MD, Lockman S, Leidner J, et al. Increased risk of preterm delivery among HIV-infected women randomized to protease versus nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based HAART during pregnancy. *J Infect Dis* 2011;204:506-514.

Preston BD, Poiesz BJ and Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988;242:1168-1171.

Prisant N, Tubiana R, Lefebvre G, Lebray P, Marcelin AG, Thibault V, et al. HIV-1 or hepatitis C chronic infection in serodiscordant infertile couples has no impact on infertility treatment outcome. *Fertil Steril* 2010;93:1020-1023.

Pryciak PM and Varmus HE. Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* 1992;69:769-780.

Pudney J, Nguyen H, Xu C and Anderson DJ. Microscopic evidence against HIV-1 infection of germ cells or attachment to sperm. *J Reprod Immunol* 1999;44:57-77.

Quayle AJ, Xu C, Mayer KH and Anderson DJ. T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *J Infect Dis* 1997;176:960-968.

Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:921-929.

Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, et al. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online* 2003;6:323-331.

Rantala ML. Causes and outcome of infertility in previously unexamined couples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988;67:429-432.

Remohi J, Romero J, Pellicer A, Simón C and Navarro J. Manual práctico de reproducción humana. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España; 2004.

Rhee SS and Marsh JW. HIV-1 Nef activity in murine T cells. CD4 modulation and positive enhancement. *J Immunol* 1994;152:5128-5134.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, et al. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online* 2005;10:669-681.

Riestra S, Fernandez E, Leiva P, Garcia S, Ocio G and Rodrigo L. Prevalence of hepatitis C virus infection in the general population of northern Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:477-481.

Rijnders PM and Jansen CA. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:2869-2873.

Rivero A, Aguado C, Andérica G, Calero M, Camacho A, Campos R, et al. Proceso Asistencial Integrado VIH/sida. Sevilla: Junta de Andalucía Consejería de Salud; 2009.

Roberts JD, Bebenek K and Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988;242:1171-1173.

Rogel ME, Wu LI and Emerman M. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol* 1995;69:882-888.

Roux C, Borodkine R, Joanne C, Bresson JL and Agnani G. Morphological classification of human in-vitro fertilization embryos based on the regularity of the asynchronous division process. *Hum Reprod Update* 1995;1:488-496.

Rowe P, Comhaire F, Hargreave T and Mahmoud A. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press; 2000.

Ryder RW, Kamenga C, Jingu M, Mbuyi N, Mbu L and Behets F. Pregnancy and HIV-1 incidence in 178 married couples with discordant HIV-1 serostatus: additional experience at an HIV-1 counselling centre in the Democratic Republic of the Congo. *Trop Med Int Health* 2000;5:482-487.

Sadowy S, Tomkin G, Munne S, Ferrara-Congedo T and Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote* 1998;6:137-141.

Safarinejad MR, Kolahi AA and Iravani S. Evaluation of semen variables, sperm chromosomal abnormalities and reproductive endocrine profile in patients with chronic hepatitis C. *BJU Int* 2010;105:79-86.

Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A and Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003;18:821-825.

Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A and Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001;16:2177-2181.

Salleras L, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Dominguez A, Salleras M, et al. Importance of sexual transmission of hepatitis C virus in seropositive pregnant women: a case-control study. *J Med Virol* 1997;52:164-167.

Salleras L, Dominguez A, Bruguera M, Plans P, Costa J, Cardenosa N, et al. Declining prevalence of hepatitis B virus infection in Catalonia (Spain) 12 years after the introduction of universal vaccination. *Vaccine* 2007;25:8726-8731.

Sande M, Gilbert D and Moellering R. *The Sandford Guide to HIV/AIDS Therapy*. Salt Lake City: Antimicrobial Therapy; 2002.

Sato A, Igarashi H, Adachi A and Hayami M. Identification and localization of vpr gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Virus Genes* 1990;4:303-312.

Sauer MV and Chang PL. Establishing a clinical program for human immunodeficiency virus 1-seropositive men to father seronegative children by means of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:627-633.

Sauer MV and Choi J. HIV seroconversion in a woman preparing for assisted reproduction: an inherent risk in caring for HIV-serodiscordant couples. *Reprod Biomed Online* 2006;12:375-377.

Sauer MV, Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, Vardhana P, Jovanovic V, et al. Providing fertility care to men seropositive for human immunodeficiency virus: reviewing 10 years of experience and 420 consecutive cycles of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2009;91:2455-2460.

Saunier B, Triyatni M, Ulianich L, Maruvada P, Yen P and Kohn LD. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol* 2003;77:546-559.

Savasi V, Ferrazzi E, Lanzani C, Oneta M, Parrilla B and Persico T. Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Hum Reprod* 2007;22:772-777.

Savasi V, Lanzani C, Crivelli M, Persico T, Ferrazzi E and Semprini AE. Pregnancy by self-insemination in women infected by HIV-1. *Fertil Steril* 2001;76:S227.

Scotfield VL, Rao B, Broder S, Kennedy C, Wallace M, Graham B, et al. HIV interaction with sperm. *AIDS* 1994;8:1733-1736.

Scott L, Alvero R, Leondires M and Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000;15:2394-2403.

Scott LA and Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998;13:1003-1013.

Scott RM, Snitbhan R, Bancroft WH, Alter HJ and Tingpalapong M. Experimental transmission of hepatitis B virus by semen and saliva. *J Infect Dis* 1980;142:67-71.

Schaeffer E, Geleziunas R and Greene WC. Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *J Virol* 2001;75:2993-3000.

Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G and Wilcox LS. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* 2002;346:731-737.

Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR and Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 2002;110:521-529.

Schuster MA, Kanouse DE, Morton SC, Bozette SA, Miu A, Scott GB, et al. HIV-infected parents and their children in the United States. *Am J Public Health* 2000;90:1074-1081.

Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F and Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 1996;2:338-342.

Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM and Pavlakis GN. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol* 1990;64:5448-5456.

SEF (Sociedad Española de Fertilidad) [en línea]. 2011 [acceso 9 May 2011]. Disponible en: <http://nuevo.sefertilidad.com/index.php>

Seidlin M, Vogler M, Lee E, Lee YS and Dubin N. Heterosexual transmission of HIV in a cohort of couples in New York City. *AIDS* 1993;7:1247-1254.

Sellés E, Mollá M, Nicolás M, Santa A, Gómez E, Garda A, et al. Capacitación Espermática. En: Remohí J, ed. *Manual práctico de reproducción humana*. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España; 2004. p. 283-287.

Semprini AE and Fiore S. HIV and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:257-262.

Semprini AE, Hollander LH, Vucetich A and Gilling-Smith C. Infertility treatment for HIV-positive women. *Womens Health (Lond Engl)* 2008;4:369-382.

Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M, Ravizza M, Taglioretti A, Sulpizio P, et al. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet* 1992;340:1317-1319.

Semprini AE, Persico T, Thiers V, Oneta M, Tuveri R, Serafini P, et al. Absence of hepatitis C virus and detection of hepatitis G virus/GB virus C RNA sequences in the semen of infected men. *J Infect Dis* 1998;177:848-854.

Semprini AE, Vucetich A and Hollander L. Sperm washing, use of HAART and role of elective Caesarean section. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:465-470.

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M and Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:1267-1270.

Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H and Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003;126:13-25.

Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M and Ross R. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertil Steril* 2008;89:20-26.

Shenfield F, Pennings G, Cohen J, Devroey P, Tarlatzis B and Sureau C. Taskforce 8: ethics of medically assisted fertility treatment for HIV positive men and women. *Hum Reprod* 2004;19:2454-2456.

Shepard CW, Finelli L and Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-567.

Sheth PM, Kovacs C, Kemal KS, Jones RB, Raboud JM, Pilon R, et al. Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy. *AIDS* 2009;23:2050-2054.

Shih CC, Stoye JP and Coffin JM. Highly preferred targets for retrovirus integration. *Cell* 1988;53:531-537.

Shoukir Y, Campana A, Farley T and Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997;12:1531-1536.

Sifer C, Benifla JL, Branger M, Devaux A, Brun-Vezinet F, Madelenat P, et al. Effects of hepatitis C virus on the apoptosis percentage of granulosa cells in vivo in women undergoing IVF: preliminary results. *Hum Reprod* 2002;17:1773-1776.

Slovic P, Monahan J and MacGregor DG. Violence risk assessment and risk communication: the effects of using actual cases, providing instruction, and employing probability versus frequency formats. *Law Hum Behav* 2000;24:271-296.

Smith D. Preconception Counseling for Patients With Chronic Viral Hepatitis. *Postgraduate Obstet & Gynecol* 2005;25:1-10.

Solas C, Lafeuillade A, Halfon P, Chadapaud S, Hittinger G and Lacarelle B. Discrepancies between protease inhibitor concentrations and viral load in reservoirs and sanctuary sites in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:238-243.

Soriano V, Gomes P, Heneine W, Holguin A, Doruana M, Antunes R, et al. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* 2000;61:111-116.

Southgate CD and Green MR. The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function. *Genes Dev* 1991;5:2496-2507.

Speck CE, Coombs RW, Koutsky LA, Zeh J, Ross SO, Hooton TM, et al. Risk factors for HIV-1 shedding in semen. *Am J Epidemiol* 1999;150:622-631.

Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P and Van Steirteghem AC. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril* 1992;57:626-630.

Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S and Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1992;7:117-119.

Stewart GJ, Tyler JP, Cunningham AL, Barr JA, Driscoll GL, Gold J, et al. Transmission of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) by artificial insemination by donor. *Lancet* 1985;2:581-585.

Steyaert SR, Leroux-Roels GG and Dhont M. Infections in IVF: review and guidelines. *Hum Reprod Update* 2000;6:432-441.

Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T and Martin MA. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 1987;328:728-730.

Streicher HZ RMJ, Gallo RC. Human Immunodeficiency viruses. En: Mandell G, Bennett J et al., editores. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone; 2000. p. 1874-1887.

Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Le Gall S, Raposo G, Schwartz O, et al. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12144-12149.

Sugano M, Hayashi Y, Yoon S, Kinoshita M, Ninomiya T, Ohta K, et al. Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1995;48:820-825.

Szyld EG, Warley EM, Freimanis L, Gonin R, Cahn PE, Calvet GA, et al. Maternal antiretroviral drugs during pregnancy and infant low birth weight and preterm birth. *AIDS* 2006;20:2345-2353.

Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991;65:1105-1113.

Tang Z, Yang D, Hao L, Huang Y and Wang S. Nachweis und Bedeutung von HCV RNS im Speichel, Sperma und Vaginalsekret von Patienten mit Hepatitis C. *J Tongji Med Univ* 1996;16:11-13, 24.

Terada S, Kawanishi K and Katayama K. Minimal hepatitis C infectivity in semen. *Ann Intern Med* 1992;117:171-172.

Terriou P, Auquier P, Chabert-Orsini V, Chinchole JM, Cravello L, Giorgetti C, et al. Outcome of ICSI in HIV-1-infected women. *Hum Reprod* 2005;20:2838-2843.

Terwilliger E, Sodroski JG, Rosen CA and Haseltine WA. Effects of mutations within the 3' orf open reading frame region of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. *J Virol* 1986;60:754-760.

Tesarik J and Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999;14:1318-1323.

Thackway SV, Furner V, Mijch A, Cooper DA, Holland D, Martinez P, et al. Fertility and reproductive choice in women with HIV-1 infection. *AIDS* 1997;11:663-667.

Thomson Okatsu MV, A.; Biggar, R.J.; Klotman, M.E. Variabilidad en los patrones de splicing de tat, rev y nef de VIH-1 in vivo. *Pub of SEISIDA*, 1998;9:143-146.

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991;6:811-816.

Tiley LS, Madore SJ, Malim MH and Cullen BR. The VP16 transcription activation domain is functional when targeted to a promoter-proximal RNA sequence. *Genes Dev* 1992;6:2077-2087.

Tokarev A and Guatelli J. Misdirection of membrane trafficking by HIV-1 Vpu and Nef: Keys to viral virulence and persistence. *Cell Logist* 2011;1:90-102.

Torian LV, Eavey JJ, Punsalang AP, Pirillo RE, Forgione LA, Kent SA, et al. HIV type 2 in New York City, 2000-2008. *Clin Infect Dis* 2010;51:1334-1342.

Touzet S, Kraemer L, Colin C, Pradat P, Lanoir D, Bailly F, et al. Epidemiology of hepatitis C virus infection in seven European Union countries: a critical analysis of the literature. HENCORE Group. (Hepatitis C European Network for Co-operative Research. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:667-678.

Twisk M, Haadsma ML, van der Veen F, Repping S, Mastenbroek S, Heineman MJ, et al. Preimplantation genetic screening as an alternative to prenatal testing for Down syndrome: preferences of women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment. *Fertil Steril* 2007;88:804-810.

U.S. Centers for Disease Control and Prevention. 2008 Assisted reproductive technology success rates: national summary and fertility clinic reports. [en línea] 2010 [acceso 5 May 2011] Disponible en: http://www.cdc.gov/art/ART2008/PDF/01_ARTSuccessRates08-FM.pdf.

Valente P and Main EK. Role of the placenta in perinatal transmission of HIV. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1990;17:607-616.

Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech* 1990;16:324-346.

Van Blerkom J, Davis P and Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between

blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod* 2000;15:2621-2633.

van Leeuwen E, de Vries JW, Jurriaans S, Verhoeve HR, Prins JM, Repping S, et al. Intra-uteriene inseminatie met bewerkt sperma bij HIV-serodiscordante paren met een HIV-positieve man. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2005;149:423-424.

van Leeuwen E, Prins JM, Jurriaans S, Boer K, Reiss P, Repping S, et al. Reproduction and fertility in human immunodeficiency virus type-1 infection. *Hum Reprod Update* 2007;13:197-206.

van Leeuwen E, Visser M, Prins JM, Nieuwkerk PT and van der Veen F. HIV couples' anxiety and risk taking during ART. *Fertil Steril* 2008a;90:456-458.

van Leeuwen E, Wit FW, Prins JM, Reiss P, van der Veen F and Repping S. Semen quality remains stable during 96 weeks of untreated human immunodeficiency virus-1 infection. *Fertil Steril* 2008b;90:636-641.

van Leeuwen E, Wit FW, Repping S, Eeftinck Schattenkerk JK, Reiss P, van der Veen F, et al. Effects of antiretroviral therapy on semen quality. *AIDS* 2008c;22:637-642.

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999;14:2345-2349.

Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, et al. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003;18:1062-1069.

Vanrell J, Balasch J and Cívico S. Esterilidad de origen desconocido: incidencia y resultados de la fecundación in vitro. *Prog Obst Gin* 1993;36:128-132.

Varmus H. Retroviruses. *Science* 1988;240:1427-1435.

Veeck L. An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group; 1999.

Veiga A, Coll O, Tur R, Busquets A and Barri P. Assisted reproductive technologies and HIV-1 serodiscordant couples. *Prenat Neonatal Med* 1999;4:356-361.

Vernazza P, Hirshel B, Bernasconi E and Flepp M. Les personnes seropositives ne souffrant d'aucune autre MST et suivant un traitement antiretroviral efficace ne transmettent pas le HIV par voie sexuelle. *Bulletin des medecins suisses* 2008;89:165-169

Vernazza PL, Graf I, Sonnenberg-Schwan U, Geit M and Meurer A. Pre-exposure prophylaxis and timed intercourse for HIV-discordant couples willing to conceive a child. *AIDS* 2011.

Vernazza PL, Hollander L, Semprini AE, Anderson DJ and Duerr A. HIV-discordant couples and parenthood: how are we dealing with the risk of transmission? *AIDS* 2006;20:635-636.

Vicari E. Approccio diagnostico e strategia terapeutica in 133 pazienti infertili con asteno-necrozoospermia. *Arch Ital Urol Androl* 1999;71:19-25.

Vicari E, Arcoria D, Di Mauro C, Noto R, Noto Z and La Vignera S. Sperm output in patients with primary infertility and hepatitis B or C virus; negative influence of HBV infection during concomitant varicocele. *Minerva Med* 2006;97:65-77.

Vitorino RL, Grinsztejn BG, de Andrade CA, Hokerberg YH, de Souza CT, Friedman RK, et al. Systematic review of the effectiveness and safety of assisted reproduction techniques in couples serodiscordant for human immunodeficiency virus where the man is positive. *Fertil Steril* 2011;95:1684-1690.

von Schwedler U, Song J, Aiken C and Trono D. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* 1993;67:4945-4955.

Waber RL, Shiv B, Carmon Z and Ariely D. Commercial features of placebo and therapeutic efficacy. *JAMA* 2008;299:1016-1017.

Wabwire-Mangen F, Gray RH, Mmiro FA, Ndugwa C, Abramowsky C, Wabinga H, et al. Placental membrane inflammation and risks of maternal-to-child transmission of HIV-1 in Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;22:379-385.

Wapling J, Srivastava S, Shehu-Xhilaga M and Tachedjian G. Targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly, maturation and budding. *Drug Target Insights* 2007;2:159-182.

Waters EA, Weinstein ND, Colditz GA and Emmons K. Formats for improving risk communication in medical tradeoff decisions. *J Health Commun* 2006;11:167-182.

Weidner W, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Pomerol JM and Ghosh C. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2002;42:313-322.

Weller S and Davis K. Condom effectiveness in reducing heterosexual HIV transmission. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;(1):CD003255.

WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

WHO. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infections in infants: recommendations for a public health approach 2010 version. [en línea] 2010a [acceso 13 Sep 2011] Disponible en: <http://www.who.int/hiv/pub/mtct/antiretroviral2010/en/index.html>.

WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 2010b.

Willey RL, Maldarelli F, Martin MA and Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 1992;66:7193-7200.

Wingfield M and Cottell E. Viral screening of couples undergoing partner donation in assisted reproduction with regard to EU Directives 2004/23/EC, 2006/17/EC and 2006/86/EC: what is the evidence for repeated screening? *Hum Reprod* 2010;25:3058-3065.

Withrington RH, Cornes P, Harris JR, Seifert MH, Berrie E, Taylor-Robinson D, et al. Isolation of human immunodeficiency virus from synovial fluid of a patient with reactive arthritis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;294:484.

Witteimer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I and Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000;15:2591-2597.

Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS and Heathcote J. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1993;119:312-323.

Worm AM, Lauritzen E, Jensen IP, Jensen JS and Christiansen CB. Markers of sexually transmitted diseases in seminal fluid of male clients of female sex workers. *Genitourin Med* 1997;73:284-287.

Wortley PM, Hammett TA and Fleming PL. Donor insemination and human immunodeficiency virus transmission. *Obstet Gynecol* 1998;91:515-518.

Xiang PS. Detection of HBsAg in vaginal secretion, semen and saliva. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 1983;4:233-235.

Xu C, Politch JA, Mayer KH and Anderson DJ. Human immunodeficiency virus type-1 episomal cDNA in semen. *AIDS Res Ther* 2005;2:9.

Yamagishi K. When a 12.86% mortality is more dangerous than 24.14%: Implications for risk communication. *Appl Cognit Psychol* 1997;11:495-506.

Ye F, Yue Y, Li S, Chen T, Bai G, Liu M, et al. Presence of HBsAg, HBcAg, and HBVDNA in ovary and ovum of the patients with chronic hepatitis B virus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:387-392.

Zaba B and Gregson S. Measuring the impact of HIV on fertility in Africa. *AIDS* 1998;12 Suppl 1:S41-50.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod* 2009;24:2683-2687.

Zhou XP, Hu XL, Zhu YM, Qu F, Sun SJ and Qian YL. Comparison of semen quality and outcome of assisted reproductive techniques in Chinese men with and without hepatitis B. *Asian J Androl* 2011;13:465-469.

Zhu P, Winkler H, Chertova E, Taylor KA and Roux KH. Cryoelectron tomography of HIV-1 envelope spikes: further evidence for tripod-like legs. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000203.

Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A and Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;12:1545-1549.

Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J and Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod* 2002;17:1327-1333.

Zuckerman A. Hepatitis Viruses. En: Baron S, editor. *Baron's Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.