

Manipulacions dels gàmetes en el laboratori per tal de dur a terme la F. in V.

per S. Marina, S. Menéndez, L. Pous, J.A. Vendrell, A. Vergés, P. Viscasillas, i L. Gil-Vernet.

Us oferim a continuació una exhaustiva anàlisi de tots els detalls que s'inclouen a la FIV practicada en humans. La tècnica utilitzada és descrita en detall i té en compte des del medi de cultiu utilitzat fins als criteris seguits per valorar l'estat dels gàmetes i l'èxit de la fecundació.

Els autors pertanyen tots al grup CEFER i excepte S. Marina (andròleg) i S. Menéndez (biòloga), la resta són ginecòlegs.

De forma natural en els mamífers, la fecundació o fusió de la cèl·lula germinal masculina o espermatozoide amb la femenina o òvul ocorre en l'interior de l'aparell genital femení. En la dona, l'encontre té lloc en el terç extern de les trompes. Els milions d'espermatozoides mòbils que rep la dona, ja sigui durant el coit o per inseminació artificial (IA), penetren en la mucositat del coll de la matriu, travessen aquesta i puguen per les trompes, on, si troben un òvul madur —és més correcte parlar d'ovòcit—, el fecundaran. Un cop l'embrió format, aquest descendirà fins a l'úter, a l'endometri del qual s'implantarà uns dies després de la seva fecundació.

El 1956 s'aconseguí per primera vegada la fecundació d'òocits de conill fora de l'organisme femení, al laboratori, és a dir, *in vitro*, per contraposició a *in vivo*. Des d'aleshores, la FIV s'ha efectuat amb èxit a diverses espècies de mamífers, com la rata, l'hàms-ter, el cobai, el ratolí, el rhesus, el gat, el gos, l'ovella, la vaca, el cavall, per citar-ne només alguns. I culminà el 1978 amb el naixement del primer ésser humà la fecundació del qual havia tingut lloc *in vitro*. En aquests darrers cinc anys, els esforços i els avanços en el camp de la FIV han estat realment importants. L'objectiu de la FIV realitzada a l'espècie humana és solucionar el problema d'esterilitat d'aquelles parelles que no són

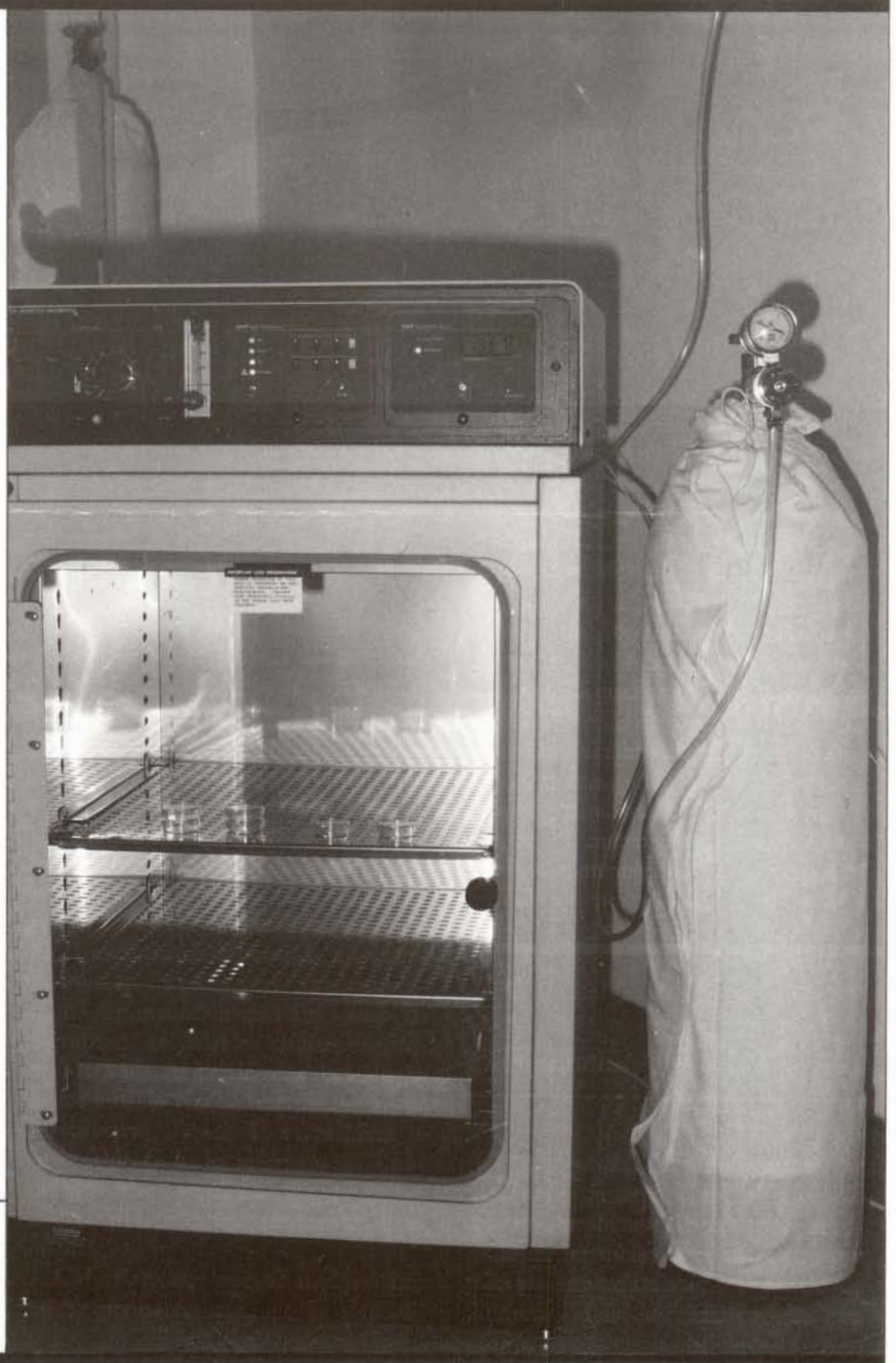


Fig. 1

Incubadora de CO₂. Al seu interior hi ha les plaques amb els medis de cultiu. A la dreta, una bala de CO₂ que li proporciona el gas.

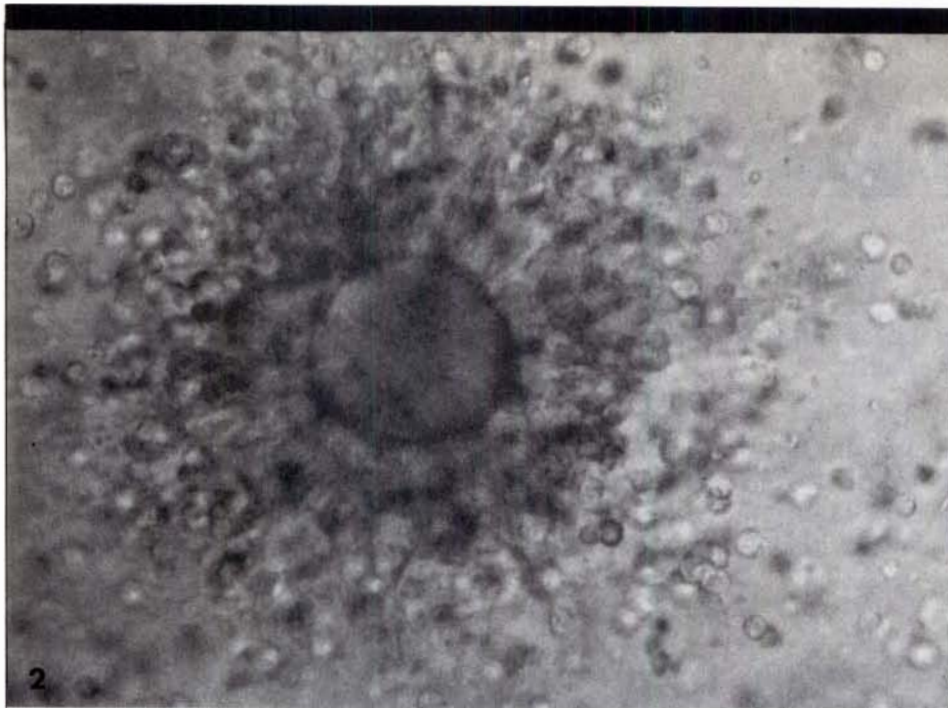


Fig. 2

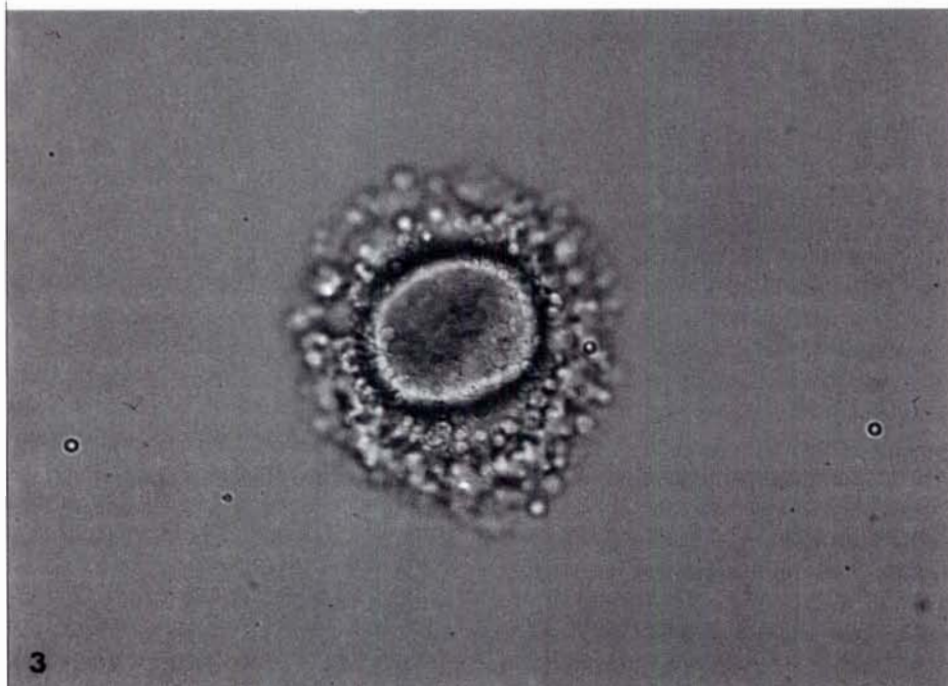
Ovòcit preovular recent identificat i traslladat al medi de cultiu (x 160).

Fig. 3

Ovòcit immadur recent identificat (x 160).

Fig. 4

Ovòcit amb dos pronuclis 15 hores després de la inseminació (x 160).



tributàries d'altres tècniques més senzilles, o la causa d'esterilitat de les quals ens és desconeguda.

En aquest treball comentarem la tècnica de la FIV practicada en humans que empra el grup CEFER (centre de Fertilització) de Barcelona. El dividirem en els següents apartats:

1. Utilatge per a la FIV
2. Medi de cultiu
3. Obtenció i preparació de les cèl·lules germinals o gàmetes
4. Inseminació
5. Criteris de fecundació

Utilatge per a la FIV

Al CEFER, el laboratori de FIV és annex al quiròfan on s'efectua la punció i aspiració del fol·licle per extraure l'ovòcit. En ell disposem de:

a) Una campana de flux laminar que esterilitza l'aire per filtració. És el lloc on es treballa (fig. 7).

b) Un estereomicroscopi amb el qual s'aconsegueixen fins a 50 augments. Ens serveix per identificar l'ovòcit, recollir-lo amb pipeta per passar-lo a una altra placa, carregar el catèter de transferència amb l'embrió, etc.

c) Un invertoscopi amb objectius de 3,2, 16 i 40 que abasten 32, 160 i 400 augments, respectivament, i que ens serveix per veure l'estadi maduratiu de l'ovòcit, observar el grau i percentatge d'espermatozoides mòbils, verificar si hi ha hagut fecundació i si s'ha iniciat la divisió dels blastòmers.

d) Una placa calefactorsa per mantenir els gàmetes i embrions a 37°C els

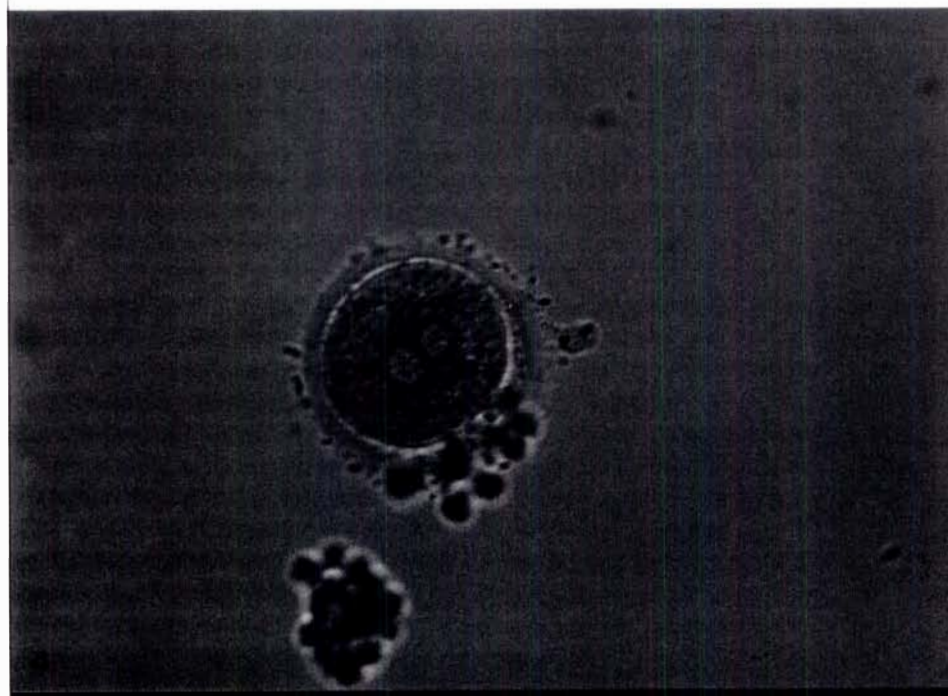
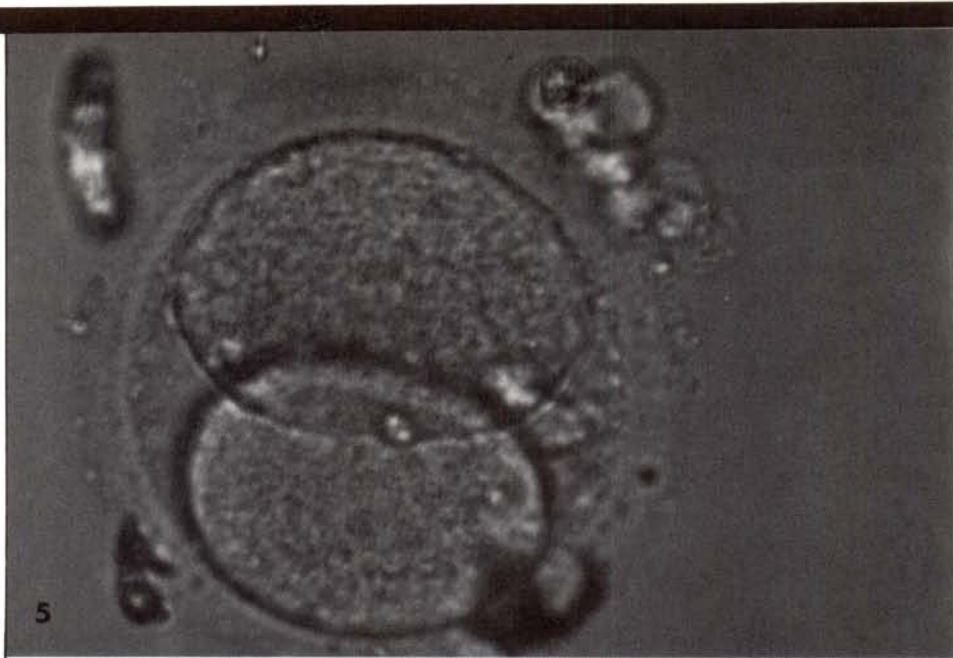


Fig. 5

Embrió humà de 2 cèl·lules 27 hores després de la inseminació (x 400).

Fig. 6

Embrió humà de 5 cèl·lules 64 hores després de la inseminació (x 400).



breus períodes de temps que estan fora de la incubadora. Aquests tres elements estan dins de la campana de flux laminar i, per tant, tota manipulació té lloc en un medi estèril.

e) Una incubadora que permet mantenir constants una temperatura de 37-37,5° C, una humitat del 98% i una concentració de CO₂ del 5% en aire. Està connectada per tant a preses de CO₂ i d'aire (fig. 1).

f) Centrifugadora per a la preparació del semen.

g) Bany maria on es col·loquen els líquids fol·liculars fins a la seva observació a l'estereomicroscopi. Està situat a la reixa de la finestra que comunica el quiròfan amb el laboratori de FIV.

h) Material fungible: pipetes, plaques de cultiu, tubs Falcon, etc., on es recull el líquid fol·licular, s'incuba l'òocit, s'insemina, i s'inicia la divisió cel·lular.

Medi de cultiu

Anomenem medi de cultiu per a FIV a la solució que conté els elements nutritius i energètics necessaris perquè l'òocit es conservi viu, els espermatozoides es capacitin, es produeixi la fecundació i s'iniciï la divisió cel·lular.

Els medis de cultiu més emprats per a FIV són el medi Menezo B₂ i el Ham-F10, ambdós comercialitzats. El Menezo B₂ és més complet i només cal afegir-li sèrum sanguini com a font d'albúmina. L'únic inconvenient

que presenta és el seu cost elevat. El Menezo B₂ conté: glucosa, albúmina sèrica bovina (BSA), aminoàcids, colesterol, piruvat sòdic, bicarbonat sòdic, clorur potàsic, sulfat magnèsic, fosfat àcid de sodi, fosfat àcid de potassi, acetat sòdic, lactat càlcic, penicil·lina, estreptomina i vermell fenol com a indicador de pH. L'osmolaritat és de 280 miliosmols/Kg i el pH de l'ordre de 7,6. Ve preparat en ampelles de 10 ml.

El medi HAM-F10 es complementa amb penicil·lina i estreptomina, lactat càlcic, bicarbonat sòdic i vermell fenol. S'ajusta l'osmolaritat a 280 miliosmols/Kg i se li afegeix finalment sèrum sanguini matern.

Segui quin sigui el medi de cultiu que es faci servir, es prepara la nit anterior a la laparoscòpia afegint-li sèrum, i es manté a la incubadora gasificant-se. Entre el 5% de CO₂ que

conté la incubadora i el bicarbonat del medi s'estableix un intercanvi que manté el pH a 7,2. Si augmenta la concentració de CO₂, el pH del medi s'acidifica, vira el vermell fenol i el medi es torna groc. Si la concentració de CO₂ disminueix, el pH del medi s'alcalinitza i es torna de color rosa per acció del vermell fenol. La gasificació es fa en tubs de plàstic Falcon que no desprenen elements tòxics al medi i que porten un tap, el qual només pot cobrir l'obertura, permetent el pas del gas o el tancament hermètic.

Usos del medi de cultiu

El medi de cultiu es fa servir per:
a) Rentar el sistema de punció-

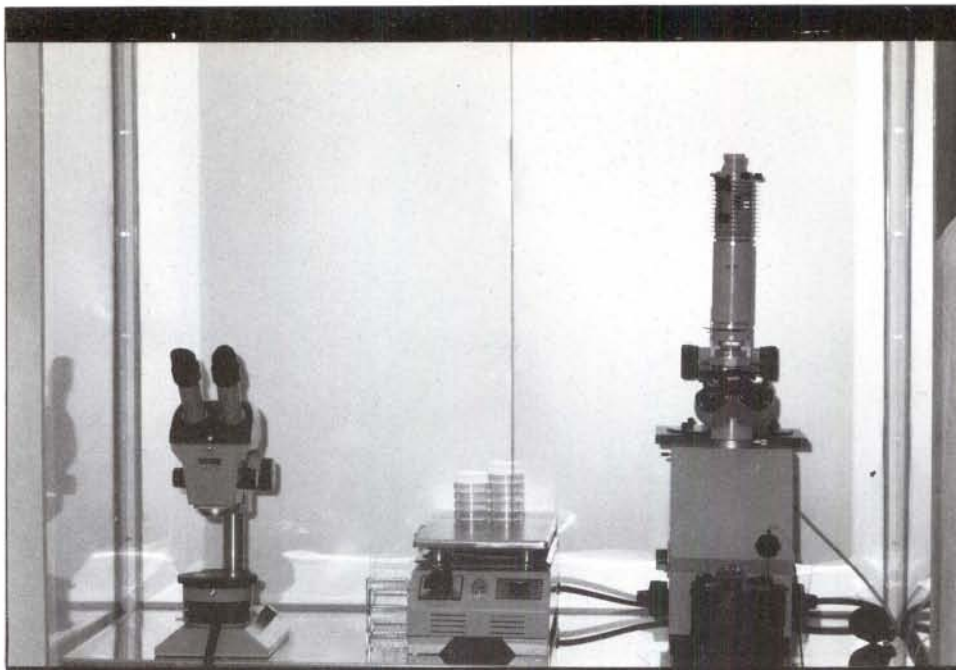


Fig. 7

Visió de la campana de flux laminar que cre a un lloc de treball estèril. A l'interior s'observa l'estereomicroscopi (esquerra), la placa calefactora (centre) i l'invertoscopi (dreta).

aspiració del fol·licle i el propi fol·licle. Per a la qual cosa afegim una concentració de sèrum del 5% (volum/volum), a més d'heparina com a inhibidor de la coagulació, ja que el líquid fol·licular pot contenir sang, i també Hepes com a tampó que mantingui el pH, donat que és difícil conservar l'equilibri bicarbonat-CO₂ del medi en aquesta fase de la tècnica. El grup de Norfolk a EEUU utilitza el tampó Dulbeccos el pH del qual no depèn del sistema bicarbonat-anhídrid carbònic.

b) Rentar els oòcits eliminant líquid fol·licular i incubar-los de 6 a 35 hores, segons l'estadi maduratiu en què es troben al moment de la seva recollida. La concentració de sèrum és del 7,5%. A aquest medi no se li afegeix heparina ni Hepes. I s'usa també per a la

c) preparació dels espermatozoides i d) inseminació dels oòcits.

e) Després d'haver aconseguit la fecundació, l'embrió es col·loca a una altra placa amb medi de cultiu que porta un 15% de sèrum sanguini. Aquest medi és l'emprat per a la transferència.

Obtenció i preparació d'oòcits

L'obtenció d'oòcits és un tema ja tractat en un altre article d'aquest mateix número i per tant no la descriurem. Al laboratori rebem un tub Falcon amb uns quants ml de líquid fol·licular aspirat d'un fol·licle

ovàric. Sol tenir un aspecte groguenc o sanguinolenc, amb masses cel·lulars en suspensió. Amb una pipeta Pasteur esterilitzada s'aspira aquest líquid i va dipositant-se en una placa estèril sota control visual amb l'estereomicroscopi, situat dins la campana de flux laminar. D'aquesta manera identifiquem l'oòcit quan surt de la pipeta a la placa. L'observem amb l'invertoscopi i el classifiquem en preovular (fig. 2), immadur (fig. 3), hipermadur o degenerat.

Per classificar-lo en un o altre grup ens basem en:

a) l'aspecte de les cèl·lules granuloses presents al líquid fol·licular;

b) les cèl·lules que formen el cúmul ovíger (expandit en l'oòcit preovular i compacte en l'immadur);

c) la corona radiada, formada per diverses capes de cèl·lules granuloses sobre la zona pel·lúcida; la corona està expandida si l'oòcit és preovular i compacta si és immadur; pot faltar al degenerat de la mateixa manera que el cúmul;

d) la presència o no de corpuscle polar (CP) en l'espai perivitel·lí, és a dir, entre la membrana de l'oòcit i la zona pel·lúcida. L'oòcit madur i l'hipermadur mostraran CP i l'immadur no en tindrà; el degenerat pot tenir CP;

e) la presència o no de vesícula seminal (VG), és a dir, de nucli de l'oòcit. Tant l'immadur com el degenerat poden mostrar VG, mentre que no es veurà al preovular ni a l'hipermadur. Únicament els oòcits preovular i els immadurs poden ser fecundats. L'hipermadur mostra un citoplasma fosc, i el mecanisme de bloqueig de la polispermia, és a dir, de la penetració de

dos o més espermatozoides a l'oòcit, s'altera, cosa que conduiria a la formació d'un embrió no viable.

Una vegada classificats els oòcits, s'incuben durant 6-8 hores els preovulars i de 22 a 35 els immadurs. A la pràctica, és freqüent no poder observar la VG ni el CP per raó de les cèl·lules de la corona i del cúmul que envolten l'oòcit, dificultant o implicant la seva visió. Per tant, els criteris més emprats per determinar el grau de maduració de l'oòcit són les cèl·lules granuloses, el cúmul i la corona radiada.

Preparació dels espermatozoides

L'home expel·leix l'esperma per masturbació després de 3 a 7 dies d'abstinència sexual. Una vegada liquat —uns 30 minuts després de l'ejaculació—, s'homogeneïtza i es pren una mostra per observar el tant per cent i el tipus de mobilitat espermàtica, i tot seguit es fa un recompte espermàtic en una cambra de Neubauer. Si és normal, se'n pren 1 ml i se centrifuga dues vegades, decantant el sobrenedant i afegint medi de cultiu. D'aquesta manera se substitueix el plasma seminal per medi de cultiu. Després de la segona centrifugació es decanta de bell nou el sobrenedant, s'hi afegeix medi de cultiu i s'incuba de mitja hora a dues hores perquè es capacitin. La capacitació consisteix en uns canvis a nivell bioquímic —no a



Fig. 8.
La F.I.V. és l'única alternativa de moltes parelles estèrils per aconseguir el fill desitjat.

nivell morfològic—, que permeten als espermatozoides travessar la zona pel·lúcida. L'espermatozoide capacitat adquireix una mobilitat anomenada "hiperactiva". De la mostra final d'espermatozoides es torna a avaluar el tant per cent de mobilitat i el recompte per conèixer el volum que cal afegir en fer la inseminació. Aquest volum variarà segons el nombre d'espermatozoides amb el qual es desitgi inseminar i la concentració d'espermatozoides mòbils aconseguida en preparar el semen.

L'objectiu de la preparació del semen per a FIV és triple: eliminar el plasma seminal que conté factors de capacitant, seleccionar només espermatozoides mòbils per a la inseminació i capacitar-los. Aquestes són, entre altres, algunes de les funcions del coll de l'úter.

Inseminació

En aquesta tècnica anomenem inseminació al fet de deixar els espermatozoides ja preparats a la placa on es troba l'oòcit. Es fa a les 6-8 hores d'incubació de l'oòcit si és preovular, i entre 22 i 35 hores si l'oòcit era immadur en el moment de prendre'l del fol·lícle ovàric. El nombre d'espermatozoides emprats per inseminar oscil·la entre deu mil i un milió per ml. Actualment en fem servir 100 000/ml, és a dir, 300 000 per a cada oòcit, ja que el volum del medi de cultiu on s'incuba l'oòcit és de 3 ml.

Críteris de fecundació

Transcorregudes entre 17 i 20 hores després de la inseminació, s'observen les plaques a l'invertoscopi per veure si l'oòcit ha estat fecundat. A vegades cal passar-lo per pipetes Pasteur afinades al foc perquè es desprengui de les cèl·lules que l'envolten i es pugui observar amb més claredat. El signe de fecundació en aquest moment és l'existència de dos pronuclis (fig. 4). Poden observar-se dos corpuscles polars, masculí i femení, en l'espai perivitel·lí. Cada pronucli conté els 23 cromosomes que aporten l'oòcit i l'espermatozoide a l'embrió. El pronucli masculí s'ha format per inflor del nucli de l'espermatozoide que ha fecundat. Ambdós pronuclis s'apropen, es trenquen les membranes pronuclears i s'intercanvien els cromosomes patern i matern amb els seus homòlegs. La fecundació ha acabat. De 24 a 38 hores postinseminació, l'embrió s'haurà dividit en dues cèl·lules (fig. 5); entre les 38 a 48 hores tindrà 4 cèl·lules (fig. 6), a partir de les 48 hores, 8 cèl·lules, etc.

Un cop acabada la fecundació i iniciada la divisió cel·lular de l'embrió es procedeix a dipositar-lo a l'úter a través de la vagina i conducte cervical. Aquesta fase s'anomena "transferència". Si l'embrió transferit s'implanta en l'endometri s'inicia la fecundació.

La FIV és l'única alternativa de moltes parelles estèrils per aconseguir el fill desitjat. Amb aquesta tècnica no es manipulen els gàmetes, només es possibilita que es trobin.

Bibliografia

- Gwatkin, R.B.L.: *Fertilization mechanisms in man and mammals*. Plenum Press, Nova York, 1977.
- Hafez, E.S.E. i Semm, K.: *In vitro fertilization and embryo transfer*. MTP Press Limited. Falcon House Lancaster, 1982.
- Henning, M. B. i Lindner, H. R.: *Fertilization of the human EGG in vitro*. Springer-Verlag, Berlin, 1983.
- Ludwig, H. i Tauber, P. F.: *Human fertilization*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1978.
- Metz, C.B. i Monroy, A.: *Fertilization*, vol. II. Academic Press, Nova York, 1969.