

PARTE



EL LABORATORIO EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA

- Capítulo 40.** El laboratorio de fecundación *in vitro* día a día
- 40.1.** Día de la punción. Día 0
 - 40.2.** Preparación del semen para fecundación *in vitro* e inyección intracitoplasmática de espermatozoides
 - 40.3.** Clasificación morfológica de la maduración nuclear ovocitaria
 - 40.4.** Día de la fecundación. Día +1
 - 40.5.** Día de las primeras divisiones. Día +2
 - 40.6.** Transferencia embrionaria
 - 40.7.** Criopreservación embrionaria

J. Moreno • E. M. Casañ • L. Gijón • D. Moreno

CAPÍTULO 40.1

DÍA DE LA PUNCIÓN. DÍA 0

INTRODUCCIÓN

El laboratorio estará preparado para recibir los ovocitos puncionados en el quirófano por el ginecólogo desde antes de que se inicie el procedimiento de extracción folicular.

El biólogo esperará la llegada de los tubos con el líquido folicular en el laboratorio de fecundación *in vitro* (FIV), que debe estar situado inmediatamente al lado, estando ya preparado en la cámara de flujo laminar.

Todo el sistema óptico estará previamente en funcionamiento y las planchas de calentamiento de tubos y de placas de petri en funcionamiento.

El resto de biólogos estarán procesando las muestras de semen correspondientes en el laboratorio de Andrología, que debe estar situado también inmediatamente al lado.

PUNCIÓN FOLICULAR

Los ovocitos junto al líquido folicular son recogidos mediante punción y aspiración folicular ecográfica en tubos Falcon y son rápidamente trasladados al laboratorio FIV que se encuentra comunicado directamente con el quirófano (Fig. 40.1-1).

Una vez en el laboratorio, se pasa el contenido del tubo a las placas de Petri que estarán previamente colocadas y calentadas sobre una placa calefactada a 37 °C en cámara de flujo laminar.

Inmediatamente el biólogo examina en una lupa de 8X. Identifica y aísla los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCCO). Los pasa, uno a uno, a una placa de cultivo.

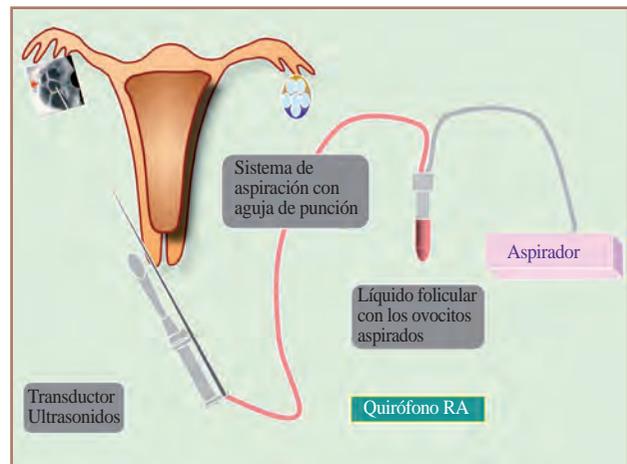


Figura 40.1-1. Esquema de la punción-aspiración folicular.

Emplea para ello una placa de cultivo para cada ovario. Finalizado esto, procede al lavado y cultivo de los complejos (Fig. 40.1-2).

Los ovocitos localizados en la placa se recuperan aspirándolos con una pipeta Pasteur.

Previamente ésta ha sido calentada su punta para reducir un poco su diámetro y redondear las posibles aristas, igualmente se ha aspirado una pequeña cantidad de medio tamponado, MOPS (vitrolife).

Entonces se ponen en una placa de cuatro pocillos con medio tamponado donde se pasarán de uno a otro para liberarlos de restos celulares y sangre (Fig. 40.1-3).

Debe asegurarse que no queden eritrocitos que pueden producir un descenso de pH; esto afectaría

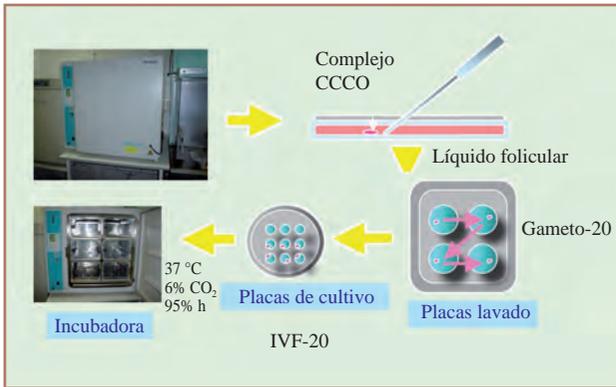


Figura 40.1-2. Recuperación y lavado del CCCO.

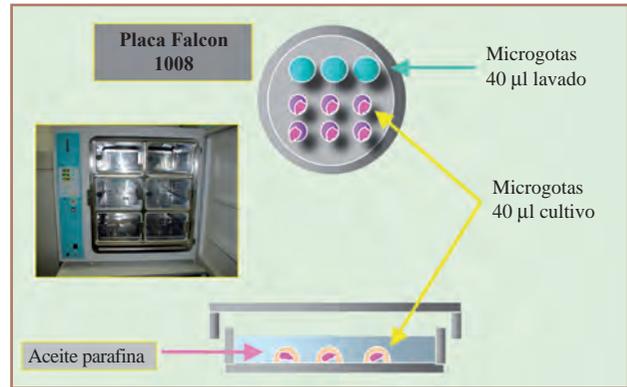


Figura 40.1-4. Técnica de la microgota.

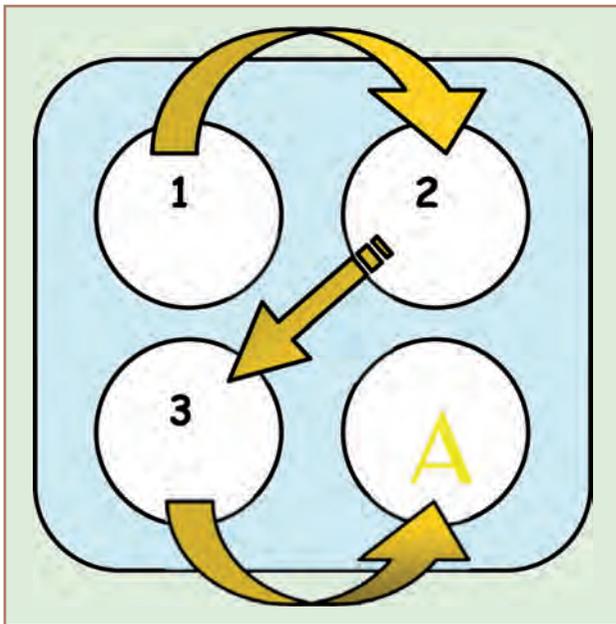


Figura 40.1-3. Ruta de lavado que siguen los CCCO en la placa de cuatro pocillos.

directamente la viabilidad de los ovocitos concluyendo en un fallo total de fecundación (Fig. 40.1-3).

Los ovocitos ya limpios se pasan con la pipeta Pasteur a una placa de cultivo, pasando por las tres microgotas de lavado para deponer el medio tamponado y terminar en una microgota de cultivo cada uno. Todo ello es cubierto por una capa de aceite mineral (Fig. 40.1-4).

Finalmente es fundamental rotular correctamente la placa (Fig. 40.1-5) con:

- Apellidos.
- Número punción.
- Numerar cada ovocito.

Por último, se procede a la clasificación morfológica de los ovocitos y pasarlos a incubar a 37 °C, 6% CO₂, hasta la inseminación para FIV o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

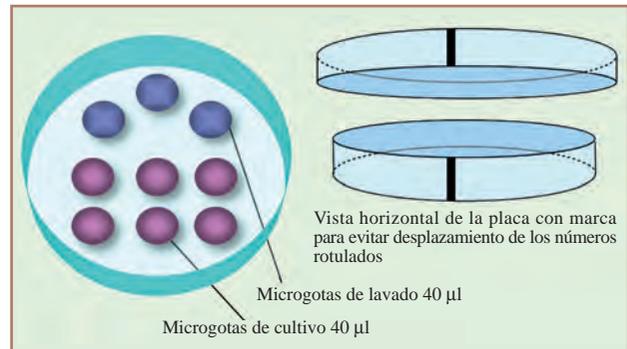


Figura 40.1-5. Ejemplo de una placa de cultivo.

CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DEL COMPLEJO CÚMULO-CORONA-OVOCITO

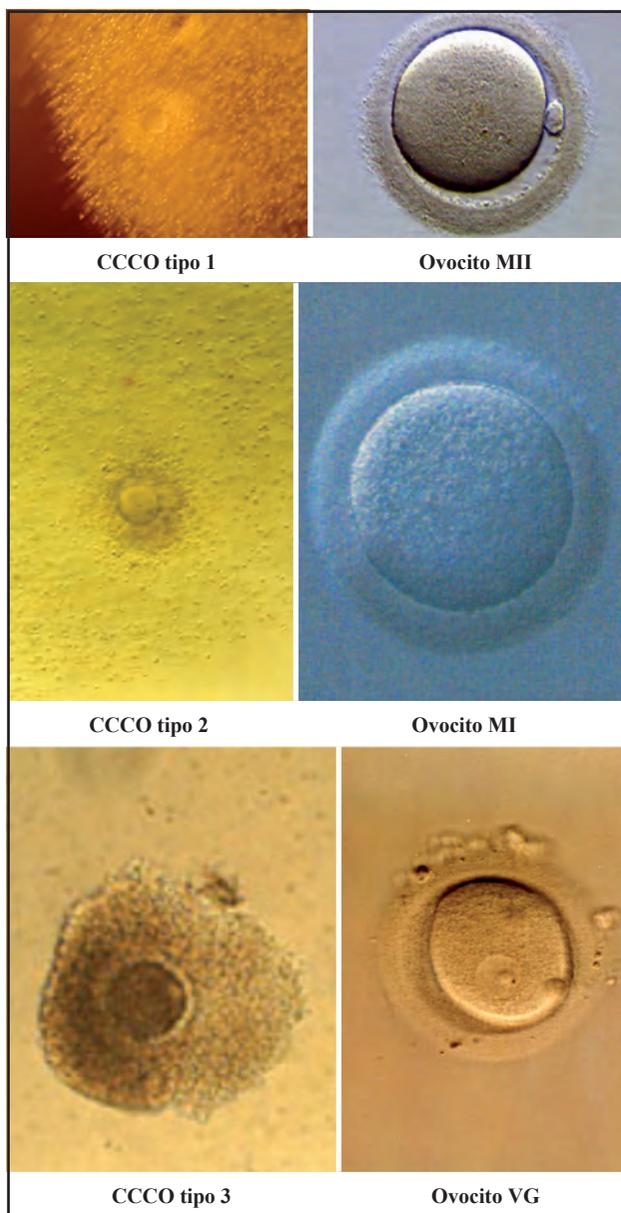
Se clasifican en cinco grados (Fig. 40.1-6):

- Grado 1 (semejante a metafase II): ovocitos maduros. Corona expandida y laxa.
- Grado 2 (semejante a metafase I): madurez intermedia. Cúmulo entre laxo y compacto.
- Grado 3 (semejante a la vesícula germinal): inmaduros. Cúmulo compactado
- Grado 4: ovocitos posmaduros. Corona disgregada.
- Grado 5: ovocitos atrésicos. Citoplasma oscuro y corona disgregada.

Esta clasificación se realiza atendiendo a dos criterios de madurez:

- Aspecto morfológico.
 - Grado de expansión de células del cúmulo y corona.
- } Indican la madurez nuclear

Esta clasificación morfológica no asegura una calidad ovocitaria al 100%, ya que es una clasificación subjetiva observador dependiente y que no siempre la morfología del ovocito se corresponde con la madurez nuclear.



Cuando trabajamos con un protocolo de FIV, nos basamos en la clasificación por grados, pero cuando tenemos delante un protocolo de ICSI, necesitamos conocer el estado de madurez nuclear. Por ello en la hoja del protocolo de la paciente quedará debidamente anotado el grado que presenta cada uno de los ovocitos.

- Para FIV:
 - Grado 1.
 - Grado 2.
 - Grado 3.
 (no hace falta decumularlos hasta después de su fecundación)
- Para ICSI:
 - MII.
 - MI.
 - VG.
 (dos horas postpunción se decumulan para valorarlos y hacer ICSI).

Figura 40.1-6. Clasificación paralela de CCCO y ovocitos.

CAPÍTULO 40.2

PREPARACIÓN DEL SEMEN PARA FECUNDACIÓN *IN VITRO* E INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES

La inseminación de los ovocitos sigue dos caminos similares, desviándose según se trate de un protocolo de FIV o un protocolo de ICSI.

Con los ovocitos en el incubador, disponemos de unas cinco horas hasta la inseminación clásica (FIV) y de unas tres horas hasta la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Existen unos pasos iniciales que son comunes a la preparación de la muestra seminal para FIV

y para ICSI, y que coinciden también con la obtención de muestras cuando se va a realizar una inseminación artificial (véase capítulo correspondiente).

Recordamos brevemente:

- **Recogida de la muestra:**
 1. Por masturbación en recipiente estéril (Fig. 40.2-7) (no debe aceptarse otra técnica). La



Figura 40.2-7. Muestras de semen antes de su procesado.

recogida se hará en salas disponibles a dicho fin en la propia clínica. No debe permitirse el *coitus interruptus* ya que puede perderse la primera fracción o *split* que contiene la mayor concentración espermática. Tampoco la recogida en domicilio.

En casos de pacientes con problemas morales o psicológicos debe recurrirse al empleo de condones especiales que no estén lubricados, ya que éstos interfieren en la viabilidad de los espermias.

2. Tres-cinco días de abstinencia.
 3. Entregar al laboratorio en menos de una hora tras la eyaculación.
 4. No emplear ningún tipo de preservativo. También se puede obtener la muestra por vibración o electroeyaculación en los casos especiales que lo requieran (parapléjicos, dificultades de erección, etcétera).
 5. Recipiente adecuadamente etiquetado, nombre, apellidos, días de abstinencia, hora de recogida, etcétera.
 6. Mantener la muestra hasta su análisis y preparación que será lo más corto posible entre 20 y 40 grados.
- **Recogida fraccionada de la muestra.** En circunstancias especiales la muestra debe obtenerse en recipientes especiales o mediante técnicas diferentes. Las instrucciones de obtención deberán especificarse con mucha más claridad. Es el caso de esterilidad de origen inmunológico, en la que es recomendable obtener la muestra en dos fracciones diferentes, la primera, llamada *split*, que corresponde a la primera porción del líquido seminal que se eyacula y que contiene el 90% de los espermatozoides y muy poco plasma seminal, y la segunda, con muchos menos espermias y de peor calidad, se suministrarán dos envases. El primero de ellos debe contener medio de cultivo con

HEPES (2-3 ml) para diluir lo más posible los anticuerpos de la primera fracción que es la que se empleará.

- **Recogida de la muestra en pacientes con eyaculación retrógrada:**

1. El paciente deberá alcalinizar la orina mediante la ingestión de aproximadamente 25 g de bicarbonato (una cucharada sopera), tanto la noche anterior como la mañana de la recogida.
2. El primer paso es orinar, disminuyendo así al máximo el volumen de orina en la vejiga.
3. A continuación, mediante masturbación, se recoge el semen, en caso de que eyacule, pues hay pacientes (diabéticos, etc.) en los que el semen pasa directamente a vejiga con ausencia de eyaculado.
4. Por último el paciente volverá a orinar. Esta muestra de orina también se recoge para su análisis, ya que es la que presumiblemente contiene los espermatozoides.

En la orina se realizará de inmediato una determinación del pH (= 7,2) para conocer si se logró alcalinizarla. La orina se centrifuga 10 min a 400 rpm. Se desecha el sobrenadante y se recupera el *pellet* que se mezcla con medio de cultivo. En esta suspensión se realizará el análisis.

- **Semen congelado:**

1. Una muestra de semen congelada se descongela a temperatura ambiente o en un baño de 37 °C y se procede como si fuera una muestra fresca.
2. La congelación que hemos realizado previamente se ha realizado mediante el llamado «protocolo largo».

- **Biopsia testicular:**

1. Dislaceración y homogenización de la muestra de tejido en G-Sperm.
2. Búsqueda de espermatozoides.
3. Uso en fresco con gran cantidad de muestra debido a que por lo general apenas se recuperan espermatozoides y pocos son móviles.

Tras todos estos procedimientos ya tenemos el semen listo para analizar la muestra según los criterios de la OMS. Realizamos un espermiograma, anotamos los resultados en el lugar correspondiente de la hoja del protocolo del paciente.

LA BIOPSIA TESTICULAR Y LA OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS DE EPIDÍDIMO. PREPARACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN

Merecen mención especial pues hoy, a pesar de que los primeros embarazos por ICSI con espermato-

zoides de testículo datan de 1993, deben ser rutina en cualquier laboratorio de FIV debido al aumento de las solicitudes en los últimos años en vascetomizados.

Sus indicaciones principales son:

1. **Azoospermias** obstructivas con espermatogénesis normal, bien infecciosas, congénitas o tras procesos quirúrgicos. Recordar que en vascetomizados de más de 10 años el pronóstico empeora.
2. Varones con **espermatogénesis** muy disminuida o aparentemente ausente en los que aparentemente se conservan focos de espermatogénesis (azoospermia secretora).
3. Casos aislados en los que la obtención de la muestra de semen en el momento que se precisa resulta imposible.
4. La técnica de **congelación-descongelación** de espermatozoides de testículo sobrantes que luego pueden ser empleados para otros ICSI ha permitido emplear parte del tejido para biopsias diagnósticas de tejido testicular. Piénsese que la técnica sirve para obtención de espermios y para estudio anatomopatológico de la etiología del proceso. Evita así, además, biopsias repetitivas.

De esta forma se puede disociar el procedimiento de obtención de espermatozoides y el de la obtención de ovocitos, evitando inducciones de la ovulación y técnicas de reproducción asistida que de otra forma resultarían fallidas. Al mismo tiempo amplía las posibilidades terapéuticas al disponer de espermias congelados para ICSI sucesivos.

Obtención de espermatozoides de testículo

Pueden obtenerse por:

- **Biopsia testicular abierta.** Es la técnica más utilizada, y en nuestro Servicio la única en testículo (Fig. 40.2-8). Para ello se obtiene una muestra de tejido testicular de 2-3 mm que luego se procesa en el laboratorio. Se realiza en quirófano bien por el urólogo o por el ginecólogo. Nuestros ginecólogos la realizan

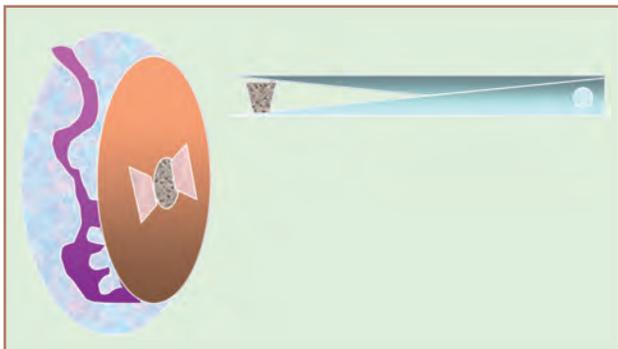


Figura 40.2-8. Esquema de una biopsia testicular.

personalmente, pues casi en todos los casos la practicamos al acabar de obtener los ovocitos de la pareja.

Se puede realizar bajo anestesia general o loco-rregional (recomendables) aunque hemos realizado cientos con anestesia local y bloqueo anestésico del cordón espermático.

El procedimiento requiere en el mismo quirófano de punción folicular, practicar:

1. Limpieza y desinfección de la piel escrotal.
2. Incisión transversal de 1 cm en la piel del escroto sobre el testículo que es mantenido fijamente por la mano del ayudante.
3. Disección de las capas hasta llegar a la túnica albugínea, fácil de identificar por su grosor, dureza y color blanco.
4. Con bisturí se abre unos 5 mm esta capa, dejando aparecer la masa testicular de aspecto cerebroide y color amarillento.
5. Con tijeras muy finas curvas se secciona entonces uno o varios fragmentos pequeños de 2 a 3 mm que directamente se depositan en placas de Petri previamente preparadas por los biólogos con medio de cultivo tamponado con HEPES y calentadas a 37 °C.
6. La placa se lleva de inmediato al laboratorio donde se procede en primer lugar a fraccionar la muestra mediante dos hojas de bisturí o con dos agujas de calibre 28 unidas a dos jeringas. Se pretende desgarrar los túbulos seminíferos y liberar los espermatozoides que contienen.
7. Inmediatamente se identifican los espermatozoides en medio de cultivo con el microscopio invertido y a 400 aumentos.
8. La intervención no finaliza hasta que son encontrados, ya que de no hallarse se recurrirá a nuevas biopsias o a biopsiar el otro testículo.
9. Sólo entonces se procederá a cerrar la incisión y por capas. Teniendo en cuenta que es importante una hemostasia perfecta.

- **Punción-aspiración percutánea (TESA):** sigue los pasos de la anterior en cuanto a asepsia y anestesia para, a continuación, puncionar el testículo con una aguja de «mariposa» del calibre 20 G conectada a una jeringa de 10 ml que previamente ha sido cargada con 1 ml de medio tamponado con HEPES a 37 C (Fig. 40.2-9). El testículo es puncionado varias veces y en varias direcciones, hasta observarse la aparición de elementos en la jeringa. Ello es un riesgo, pues se realiza «a ciegas». El material obtenido se vacía en un tubo de donde se depositará en un portaobjetos para examinar al microscopio invertido a 40x.

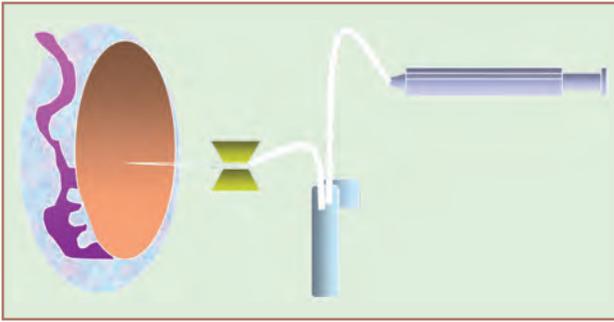


Figura 40.2-9. Punción-aspiración percutánea de espermatozoides testiculares (TESA).

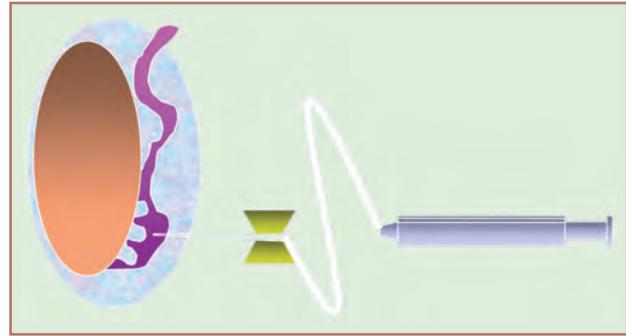


Figura 40.2-10. Punción-aspiración percutánea de espermatozoides del epidídimo (PESA).

La operación puede repetirse de no encontrarse.

El índice de fracasos es muy superior al anterior, al igual que el material obtenido.

Obtención de espermatozoides del epidídimo

Es una buena alternativa en ciertas patologías y puede realizarse por dos vías:

- **La punción-aspiración percutánea** (Fig. 40.2-10): sigue los mismos pasos que la aspiración percutánea de testículo y tiene la dificultad de la localización correcta del epidídimo, que en casos de vasectomía suele estar engrosado (lo que muchas veces facilita su hallazgo al tacto).
- **La aspiración directa del epidídimo** (Fig. 40.2-11): es más segura. Se practica una incisión en la piel del escroto como en los casos de biopsia. A continuación se procede a la identificación del epidídimo y éste se punciona y aspira como en la punción testicular.

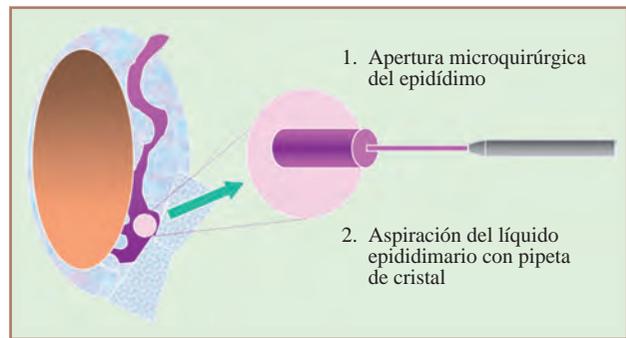


Figura 40.2-11. Aspiración directa de espermatozoides del epidídimo.

La elección de una u otra técnica dependerá de:

- La **naturaleza de la azoospermia**. De no estar diagnosticado el origen debe biopsiarse el testículo, de esta forma nos aproximaremos con la anatomía patológica al diagnóstico.
- En **azoospermias obstructivas** (vasectomías), la punción aspirativa suele ser eficaz.
- La biopsia testicular suele ser siempre más eficaz y aporta una orientación de los caracteres del testículo.
- Si se va a criopreservar, es mejor biopsiar el testículo o aspirar el epidídimo.

En nuestro departamento hemos recurrido a ambas, pero en los últimos años sólo realizamos la biopsia testicular.

PREPARACIÓN DEL SEMEN PARA LA FECUNDACIÓN *IN VITRO*

Gradientes de densidad

Es una técnica de capacitación basada en la centrifugación de la muestra de semen en diferentes gradientes de densidad (Fig. 40.2-12), para así discriminar los espermatozoides en función de su movilidad y separarlos del plasma seminal. Se basa en la selección de los espermatozoides al vencer la dificultad que representan gradientes de densidad de 90 y 45% (Pu-

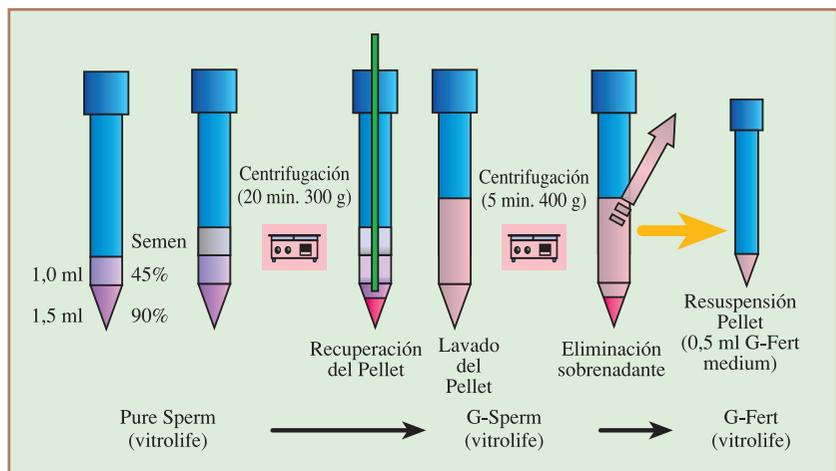


Figura 40.2-12. Fases de la capacitación mediante gradientes de densidad.

resperm Nidacom) y llegar hasta el final del tubo. Sirve como filtro para el plasma seminal, otras células y detritus. Elimina los espermatozoides sin motilidad o con motilidad no progresiva. Por ello está recomendada en muestras con abundantes detritus, muy celulares y en casos de oligospermia y astenozoospermia.

Para ello se hace deslizar un volumen determinado de medio de gradiente de 90% bañando las paredes de un tubo cónico A continuación, se deposita otro volumen de gradiente de 45% lentamente y por la pared evitando se mezclen y formando así una interfase entre ambos. El volumen de los gradientes y del semen depende de la concentración y movilidad de la muestra y oscila entre 0,5 y 1,5 ml. Se deposita la misma cantidad de semen haciéndola descender por el tubo. A continuación se centrifuga a 300 rpm durante 20 minutos, recuperándose luego el sedimento que será lavado en otro tubo con medio de cultivo IVF Medicult a 400 rpm durante cinco minutos.

Una vez finalizada la centrifugación procedemos a recuperar el *pellet*, lavarlo y resuspenderlo en medio de cultivo, para poder contar el capacitado en la cámara Makler.

Las diferentes interfases entre las distintas densidades retienen aquellas partículas y células que no nos interesan (Fig. 40.2-13).

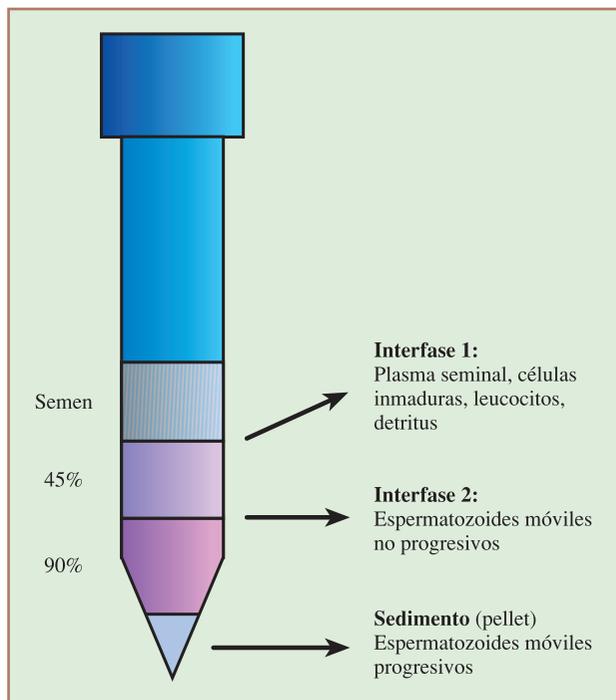


Figura 40.2-13. Esquema de un tubo con gradiente de densidad.

Preparación de la dilución para fecundación *in vitro*

El objetivo es ajustar la concentración tras capacitar entre 500.000 y 1.000.000 espermatozoides móviles progresivos/ml. Siempre con tendencia a una concentración lo más baja posible para evitar una fecundación anómala como poliploidías.

Fórmula de la dilución:

$$V_{\text{SEMEN}} = \frac{V_{\text{FINAL}} \times [] \text{ inseminación}}{[] \text{ semen}}$$

V_{SEMEN} : volumen del semen capacitado que hay que tomar para que en el volumen final haya la concentración de inseminación deseada.

V_{FINAL} : volumen de la dilución considerando que por cada ovocito se necesita una gota de 20 μl . Siempre se contabilizan dos o tres ovocitos más.

[] inseminación: 500.000-1.000.000 espermatozoides móviles progresivos/ml. Concentración que se desea.

[] semen: espermatozoides móviles progresivos/ml en la muestra capacitada.

Luego contar en la cámara Makler (Fig. 40.2-14) para comprobar que contiene la concentración de inseminación deseada, y corregir el exceso o el defecto de espermatozoides, diluyendo o concentrando, respectivamente.

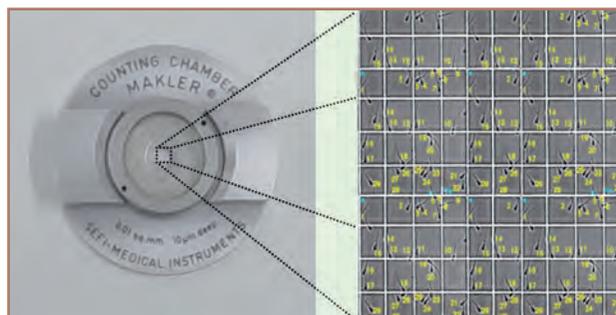


Figura 40.2-14. Cámara Makler y detalle de su cuadrícula de recuento.

Preparación de la placa de fecundación *in vitro*

Preparamos placas (Fig. 40.2-15) con tres gotas de 40 μl de medio de lavado en la posición 11, 12 y 1 según las agujas del reloj. Justo debajo colocamos ocho gotas de 20 μl del semen diluido por placa, una gota para cada ovocito. Por último, cubrimos con 3,2 ml de aceite mineral.

Guardamos la placa en incubador a 37 $^{\circ}\text{C}$, 6,0% CO_2 , hasta poner los ovocitos para FIV, que ha de ser unas tres-cinco horas postpunción.

Procedimiento de inseminación

Sacar la placa de inseminación y los CCCO en su placa de cultivo del incubador.

Hacer la valoración morfológica del CCCO según los grados 1, 2 o 3, y anotar en la hoja del protocolo.

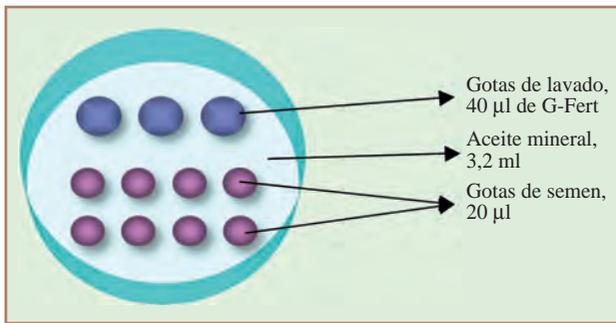


Figura 40.2-15. Placa de inseminación.

Con una pipeta Pasteur, recuperamos los ovocitos y los repartimos en cada gota de inseminación de uno en uno (Fig. 40.2-16).

Pasamos la placa de inseminación al incubador y dejamos a 37 °C, 6,0% CO₂ durante 17-20 horas hasta el día siguiente, cuando se podrá evaluar la fecundación.

Consideraciones especiales para semen congelado

- Sacar semen congelado dos horas después de la punción.
- Capacitar de la misma forma que el semen fresco.
- Preparar la placa de inseminación media hora antes de realizar el FIV.

PREPARACIÓN DEL SEMEN PARA LA INYECCIÓN

Swim Up: para capacitar el semen usamos la técnica del *swim-up*. Este proceso de recuperación selecciona los espermatozoides con mayor movilidad, descartando a los más inmóviles y a los muertos (para más detalles véase capítulo «Inseminación artificial»).

Se basa en una centrifugación de la muestra, y en poner un medio de cultivo para que asciendan por él los mejores espermatozoides. Posteriormente, se recupera la fracción superior del tubo, que contiene esos espermatozoides capacitados.



Figura 40.2-16. Ovocitos rodeados de espermatozoides.

Esta técnica se usa para el ICSI, principalmente porque en muchos de los casos en que la técnica está indicada existe un factor masculino generalmente una oligozoospermia.

Con el *swim-up* logramos recuperar mayor cantidad de espermatozoides, aunque la selección no tenga tanta pureza como con los gradientes.

PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL TESTÍCULO Y DEL EPIDÍDIMO. CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN

El tratamiento de los espermatozoides es idéntico en ambos casos:

- El material aspirado o el líquido de la placa de petri que contienen los espermatozoides es depositado en un tubo cónico de preparación de semen. En ocasiones es conveniente dejar el aspirado o la placa un par de horas en incubadora para facilitar la salida de los espermatozoides de los túmulos seminíferos.
- Una vez en el tubo cónico, centrifugar la muestra 10 minutos a 600 rpm. Se elimina el sobrenadante y los espermatozoides del pellet se emplean ya para:
 1. Practicar la ICSI.
 2. Criopreservar.

En la mayoría de casos practicamos la primera, ya que la biopsia se realiza de inmediato tras la obtención de los ovocitos de la paciente.

Si se desea criopreservar, una vez realizada la centrifugación, se elimina el sobrenadante, dejando sólo 0,5 a 1 ml de medio para resuspender la muestra. Se añade entonces el crioprotector en proporción 1:1 y se procede a la homogenización, dejando que el crioprotector unos 10 minutos para que penetre en las células. Transcurrida ésta, se procede nuevamente a la homogenización de la muestra y luego, con una pipeta se aspira y se deposita, gota a gota, en la superficie de una pastilla de hielo seco donde se han hecho pequeños pocillos para delimitar la gota.

El protocolo de descongelación es muy sencillo, semejante al empleado en muestras de eyaculado. Se toman tres o cuatro pastillas, se ponen en un tubo de fondo cónico y éste en un recipiente con agua a temperatura ambiente donde se deja 10 minutos. Luego y para atemperar la muestra se coloca en un incubadora 37 °C. otros 10 minutos. Finalmente se lava la muestra con medio de cultivo y se centrifuga a 600 rpm otros 10 minutos. El sobrenadante se elimina y el poso se resuspende en 100-150 µl.

DECUMULACIÓN DE LOS OVOCITOS

- Tras 2-4 horas después de la recuperación folicular de ovocitos, sacamos la placa de cultivo de G-Fert.

- Preparar la placa de hialuronidasa (Fig. 40.2-18) al menos 30 minutos antes de decumular. Pasar los ovocitos con pipeta Pasteur a gotas de hialuronidasa.
- Permanecer en hialuronidasa 30-40 segundos para que se disgreguen las células de la granulosa.
- Pasar los ovocitos al MOPS, un ovocito por gota.
- Se procede a su decumulación mediante uso de pipetas de diferentes diámetros decrecientes, fabricadas a la llama con pipetas Pasteur, siempre por encima del diámetro ovocitario.
- Observar que los ovocitos se desprenden de su granulosa.
- Valorar morfológicamente los ovocitos para ver su estado de madurez nuclear.

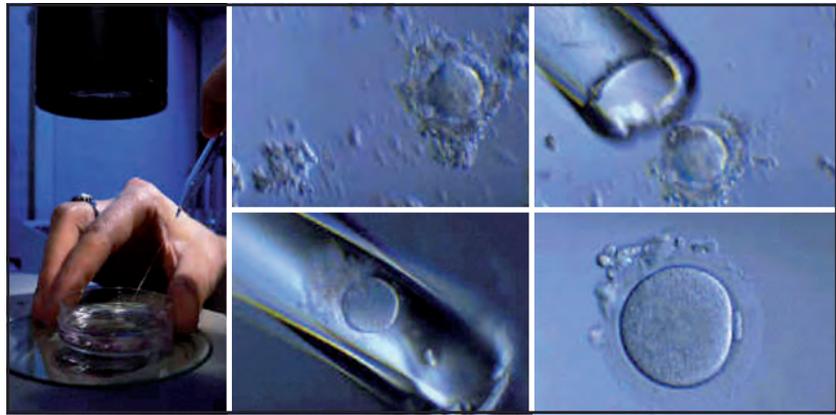
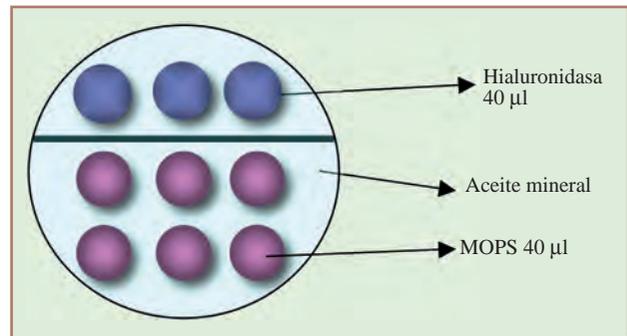


Figura 40.2-17. Proceso de decumulación de los ovocitos.

Figura 40.2-18. Placa de hialuronidasa para decumular.



CAPÍTULO 40.3

CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA MADURACIÓN NUCLEAR OVOCITARIA

Colocar placa de cultivo en lupa con máximo aumento. Se observará (Fig. 40.3-19):

- Presencia/ausencia de vesícula germinal (VG).
- Presencia/ausencia del primer corpúsculo polar (CP).
- Contorno, aspecto del citoplasma, zona pelúcida, espacio perivitelino.

CLASIFICACIÓN

Metafase II (MII): ovocitos maduros. Se observa el primer corpúsculo polar, sin VG, citoplasma traslúcido homogéneo (Fig. 40.3-20).

Metafase I (MI): ovocitos inmaduros. Sin CP, sin VG, citoplasma normal (Fig. 40.3-21).

Vesícula germinal (VG): ovocitos inmaduros. Sin CP. Se observa VG en posición central (Fig. 40.3-22).

Atrésicos: estado nuclear no identificable. Zona pelúcida fracturada con ovoplasma oscuro, en ocasiones saliéndose (Fig. 40.3-23).

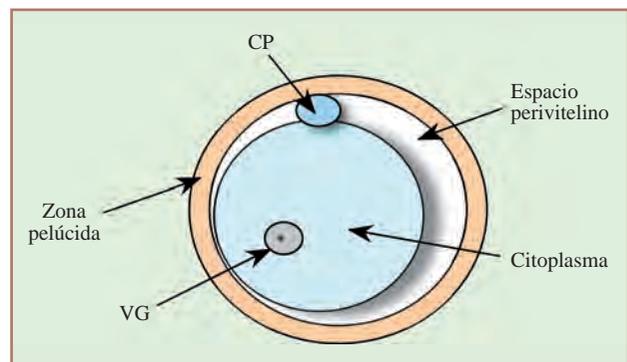


Figura 40.3-19. Esquema idealizado de las diferentes partes ovocitarias.

- Sólo se microinyectarán los ovocitos en fase MII, ya que se encuentra en el estado nuclear adecuado para ser fecundados por el espermatozoide.



Figura 40.3-20. Ovocito en estadio de metafase II.



Figura 40.3-21. Ovocito en estadio de metafase I.



Figura 40.3-22. Ovocito en estadio de vesícula germinal.



Figura 40.3-23. Ovocito atrésico.

- Pasar los ovocitos en fase MII a una placa de cultivo con G-Fert para limpiar restos de hialuronidasa en las gotas de lavado. Asegurarse que quedan bien limpios de restos celulares (Fig. 40.3-24). El resto de ovocitos en diferente fase de MII se quedan en la placa de hialuronidasa.
- Pasamos las placas de cultivo con los ovocitos al incubador al menos 30 minutos a 37 °C, 6% CO₂, hasta el momento de la microinyección.
- Marcar la placa, incluyendo (Fig. 40.3-25):
 1. El apellido de la paciente.
 2. La técnica que se ha utilizado.
 3. Qué tipo de placa es (inseminación o cultivo).
 4. La fecha y el número de embrión, teniendo siempre la certeza de estar trabajando con la paciente correcta.

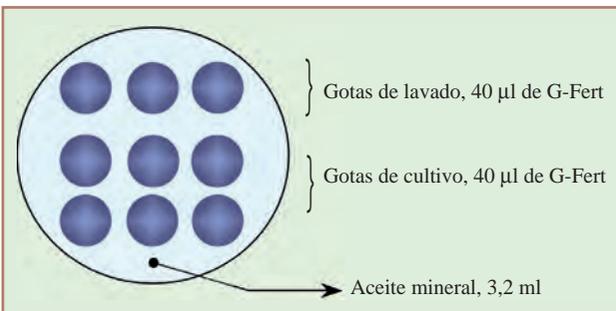


Figura 40.3-24. Placa de cultivo.



Figura 40.3-25. Rotulado de la placa de cultivo.

Se muestra cómo se rotula la placa de cultivo de la paciente con seis embriones, hecha a fecha de 29 de febrero.

PREPARACIÓN DE PLACA PARA LA MICROINYECCIÓN

- Colocar tres gotas de lavado en la parte inferior de la placa (Fig. 40.3-26).
- Colocar entre tres-cinco gotas de PVP.
- Repartir en las gotas de PVP 1-5 µl de semen capacitado en función de la recuperación del semen.
- Colocar tantas gotas de MOPS como ovocitos se van a microinyectar. Normalmente se pone alguna de más por si es necesario cambiar de gota.
- Colocar los ovocitos en las gotas de lavado y pasar cada uno a una gota de MOPS.
- Sin incubar la placa pasamos directamente a microinyectar.

PROCEDIMIENTO DE MICROINYECCIÓN

Organización de material y equipo técnico (Fig. 40.3-27)

- En primer lugar debe iniciarse purgando el sistema de aceite del microinyector, siendo importante evitar la formación de burbujas para no tener una mala transmisión del movimiento de succión y propulsión de los fluidos.

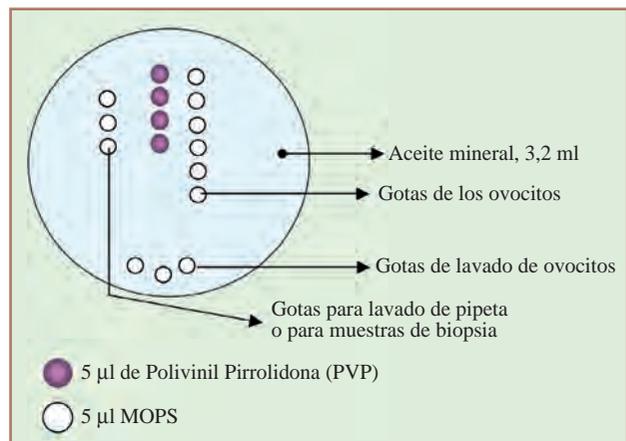


Figura 40.3-26. Esquema de una placa de microinyección.



Figura 40.3-27. Puesto de microinyección.

- Hay que comprobar que el sistema está limpio y la temperatura de la placa térmica se encuentra a 37 °C.
- Colocar la pipeta en la lanceta de sujeción quedando en contacto con el aceite, y expulsar un poco de aceite una vez colocada para conseguir la continuidad del fluido en todo el sistema.
- Habitualmente la pipeta Holding (pipeta de sujeción) queda a la izquierda y la pipeta de microinyección queda a la derecha. Ambas situadas en el mismo eje del plano.
- Enfocar las puntas de las pipetas a la misma altura que el borde de una de las gotas de la placa, para saber que estamos trabajando a la profundidad adecuada (Fig. 40.3-28).

Selección y captación del espermatozoide

- Localizar un espermatozoide con buena morfología y movilidad.
- Una vez localizado el espermatozoide procedemos a romper su flagelo usando la pipeta de microinyección mediante un movimiento seco y perpendicular al espermatozoide (Fig. 40.3-29), para evitar que el flagelo produzca daños en el citoplasma ovocitario y promover la descondensación nuclear del espermatozoide.
- Aspirar una pequeña cantidad de PVP y a continuación el espermatozoide con la cabeza orientada hacia el extremo de la pipeta de microinyección (Fig. 40.3-30).
- Cambiar a la gota del ovocito.

Microinyección del espermatozoide

- En la gota que contiene el ovocito, introducir la pipeta Holding para enfocarla a la misma altura que el plano medio del ovocito.
- Introducimos la pipeta de microinyección enfocándola en el mismo plano que la pipeta Holding.
- Con la pipeta de microinyección tomamos el ovocito con cuidado para inferirle una rotación



Figura 40.3-28. Diferentes momentos de la preparación de la microinyección.

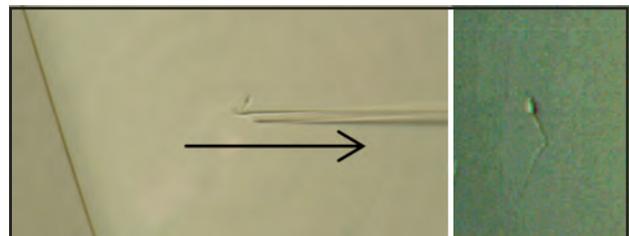


Figura 40.3-29. Inmovilización del espermatozoide.

suficiente (Fig. 40.3-31.A), hasta que se nos quede el CP situado en la parte superior, representada por las 12 en una esfera de reloj. El fundamento de esta posición es que justamente por debajo del CP se encuentra el centriolo del ovocito, así nos aseguramos no dañarlo, ya que supondría un error en la formación del huso

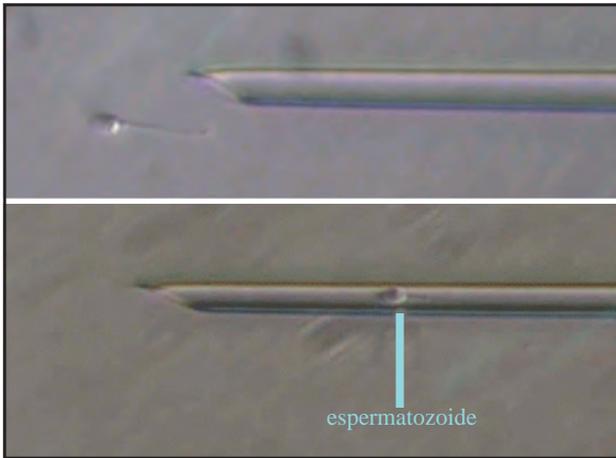


Figura 40.3-30. Aspiración del espermatozoide.

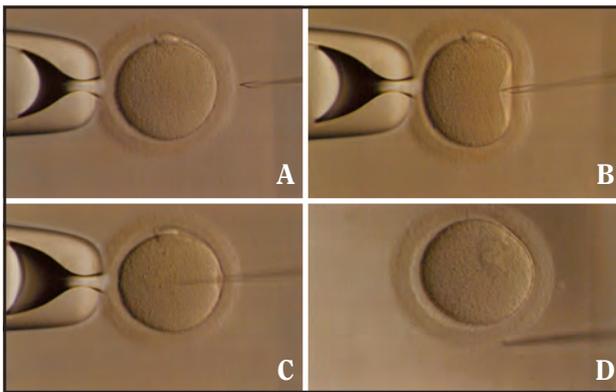


Figura 40.3-31. Secuencia de microinyección del espermatozoide.

meiótico, y su correspondiente división anómala.

- Aspiramos con la pipeta Holding para fijar el ovocito.
- Con pipeta de microinyección cargada y dentro de la gota del ovocito, expulsamos una pequeña cantidad de fluido hasta que el espermatozoide quede cerca del extremo afilado.
- Presionar gradualmente sobre la zona pelúcida del ovocito (Fig. 40.3-31.B) hasta perforarla.
- Una vez en el espacio perivitelino, continuamos presionando sobre el oolema (membrana plas-

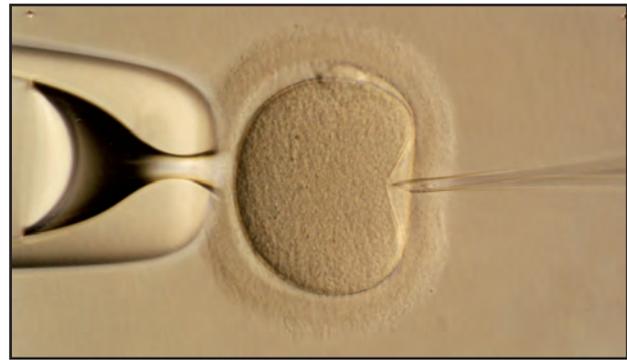


Figura 40.3-32. Detalle de la presión sobre el oolema.

mática del ovocito), formando un cono alrededor de la punta de microinyección. Este cono viene determinado por la resistencia mecánica que ofrece la membrana ovocitaria. Esta resistencia es diferente entre ovocitos, siendo un indicador más de la calidad ovocitaria.

- Al observar una pequeña variación del cono de inyección, reconoceremos la rotura del oolema. En ese momento aspiramos una pequeña cantidad de ooplasma (citoplasma del ovocito) hasta la altura de la zona pelúcida, lo cual nos confirma la rotura de la membrana y nos pone en contacto el espermatozoide con el ooplasma (Fig. 40.3-31.C).
- Propulsar el contenido de la pipeta de microinyección hasta depositar el espermatozoide dentro del ovocito, procurando introducir la menor cantidad de PVP posible.
- Retirar lentamente la pipeta de microinyección por el mismo camino de entrada al ovocito y asegurándose que el espermatozoide ha quedado dentro.
- Liberar el ovocito de la presión de succión de la pipeta Holding y proporcionar un pequeño contacto con la pipeta de microinyección para desplazar el ovocito (Fig. 40.3-31.D).
- Repetir el mismo procedimiento con el resto de ovocitos.
- Los ovocitos se pasan a placas de cultivo de G-1, preparadas anteriormente, y se mantienen en el incubador hasta el momento de observar la fecundación, entre 14 y 16 horas.

CAPÍTULO 40.4

DÍA DE LA FECUNDACIÓN. DÍA +1

VALORACIÓN DE LA FECUNDACIÓN

- FIV.
- ICSI.

CRITERIOS BÁSICOS QUE DETERMINAN LA FECUNDACIÓN

- Aparición de los dos pronúcleos, el masculino y el femenino.