

FECUNDACIÓ IN VITRO (FIV)

La Fecundació In Vitro (FIV) consisteix en posar en contacte al laboratori els oòcits amb els espermatozoides amb l'objectiu de **facilitar i aconseguir la fecundació**. Els embrions resultants després de la fecundació són cultivats i observats al laboratori; i alguns d'ells transferits dins de l'úter de la dona pocs dies després. Els embrions sobrants que presenten un desenvolupament satisfactori poden ser també congelats.

Existeixen diferents modalitats o variacions en la realització de la FIV en funció de la procedència dels gàmetes, de la tècnica d'inseminació dels oòcits i dels procediments usats en el laboratori.

Segons la procedència dels gàmetes:

- FIV amb oòcits de la parella
- FIV amb oòcits de donant
- FIV amb espermatozoides de la parella
- FIV amb espermatozoides de donant

Segons l'origen dels espermatozoides:

- FIV amb espermatozoides del semen
- FIV amb espermatozoides del epidídim (MESA o PESA)
- FIV amb espermatozoides testiculars (obtinguts per punció - TESA- o per biòpsia -TESE-)

Segons la tècnica d'inseminació:

- FIV amb inseminació convencional dels oòcits
- FIV amb microinjecció espermàtica (ICSI)

Així mateix existeixen una sèrie de tècniques complementàries a la FIV que poden ser aplicades en alguns casos:

- Eclosió Assistida
- Diagnòstic Genètic Preimpantacional
- Congelació embrionària

Indicacions

- Esterilitat femenina per patologia tubàrica
Quan la dona té les **dues trompes obstruïdes**, la FIV permet la trobada de l'oòcit amb els espermatozoides i possibilita la formació d'embrions (que d'altra forma no

es crearien). En el cas que fos la funció de transport dels gàmetes i embrions per la trompa la qual pogués estar alterada -és a dir, trompes permeables però amb afectacions que li restin funcionalitat-, la FIV també pot proporcionar una solució al problema ja que evita el trànsit dels embrions per la trompa perquè s'introdueixen directament dins de l'úter.

- Esterilitat femenina per disfunció ovàrica

Hi ha casos en què els ovaris tenen **difficultat per a produir oòcits** madurs i/o molts dels oòcits que produeixen són de mala qualitat. En aquesta situació molts dels embrions generats tenen poc potencial per a generar un embaràs. Amb la FIV s'intenta generar múltiples embrions i transferir aquells que presentin un major potencial de desenvolupament per a donar més possibilitats de gestació. Amb l'edat la dona perd funcionalitat ovàrica i qualitat ovular, sent més necessària la selecció embrionària.

També entren en aquest apartat aquelles disfuncions ovàriques (com per exemple alguns casos d'**ovarís poliquístics**) en les quals és difícil alliberar controladament un nombre limitat d'oòcits per a realitzar una inseminació artificial. Una solució en aquests casos és practicar una FIV, on un nombre elevat d'oòcits no és problema ja que permet obtenir múltiples embrions dels quals uns pocs es transferirien i molts altres es congelarien, fet que permet obviar així el risc d'embaràs múltiple.

- Endometriosis

La presència de teixit de l'endometri fora de la cavitat uterina (a les trompes o als ovaris) pot dificultar o impedir l'ovulació, la fecundació, el transport dels gàmetes i embrions i disminuir la implantació embrionària. La FIV resoluria molts d'aquests impediments.

- Esterilitat per factor masculí

La FIV pot oferir l'oportunitat d'aconseguir fecundació i un embaràs en aquells casos en què existeix una disminució del nombre, mobilitat i morfologia espermàtica. En aquells casos en què la disminució dels paràmetres seminals és molt accentuada ha de ser aplicada la tècnica per la qual s'introdueix directament un espermatozoide dins de l'oòcit (**microinjecció espermàtica o ICSI**). Aquesta tècnica permet fins i tot obtenir fecundació amb espermatozoides recuperats directament de testicle en casos en què no apareixen en l'ejaculat.

- Anticossos anti-espermatozoides

La presència d'aquests anticossos pot dificultar la fecundació "in vivo", ja que altera els mecanismes de desplaçament de l'espermatozoide i la penetració de les cobertes de l'oòcit. La FIV permet la creació d'embrions fins i tot en casos de factor immunològic greu gràcies a la microinjecció espermàtica.

- Fallada d'inseminació

Quan després d'aproximadament 3 intents d'inseminació artificial no s'aconsegueix l'embaràs és convenient canviar de tècnica ja que es fa poc probable un embaràs en nous intents. Amb la FIV és possible veure si existeix algun **problema ocult** a nivell dels oòcits, de la fecundació o del desenvolupament embrionari i alhora proporciona percentatges d'embaràs molt satisfactoris.

- Esterilitat idiopàtica (d'origen desconegut)
La FIV és una tècnica molt útil en els casos d'esterilitat sense diagnòstic ja que permet valorar l'aspecte dels oòcits, veure la interacció entre els oòcits i els espermatozoides (la seva capacitat de fecundació) i també l'evolució i la morfologia dels embrions generats. Això permet que, a més de ser una eficaç tècnica terapèutica, la FIV sigui també una eina diagnòstica molt important, ja que permet detectar algunes causes d'esterilitat ocultes.
- Esterilitat o Infertilitat d'origen genètic
Algunes parelles presenten esterilitat, avortaments de repetició o tenen familiars afectes de malalties genètiques perquè algun dels components de la parella és portador d'anomalies o malalties genètiques hereditàries. La FIV permet realitzar un diagnòstic genètic dels embrions generats i seleccionar aquells embrions sans per a ser transferits. Parlem de FIV amb Diagnòstic Genètic Preimplantacional (DGP o DGPI).

Preparació prèvia a l'inici del programa

Una vegada inclosa una parella o dona en el programa de FIV, s'han de realitzar uns passos previs abans de l'inici del cicle de tractament:

1. Informació completa del procés per part de l'equip mèdic i biològic.
2. Signatura del consentiment informat.
3. Avaluació del tipus de tractament farmacològic i dosificació més adequada per a l'estimulació ovàrica, mitjançant una avaluació de les analítiques hormonals i la pràctica d'una ecografia ovàrica basal.
4. Pràctica d'una histerometria clínica (mesurament de la longitud de la cavitat uterina) amb un catèter, que ens donarà una informació molt important en vistes a la futura introducció dels embrions durant el procés de FIV.
5. Analítica de sang preoperatòria i valoració amb l'anestèsista, per a la concreció del tipus d'anestèsia que es practicarà per a l'extracció dels oòcits.

Etaques

Estimulació ovàrica

Consisteix en **induir el creixement i maduració de diversos fol·licles** ovulatoris en un mateix cicle. L'objectiu en aquest cas és disposar de múltiples oòcits durant la FIV ja que això ens permetrà obtenir diversos embrions i seleccionar per a transferir aquells que presentin un millor aspecte i desenvolupament, fet que permet augmentar així notablement les possibilitats d'embaràs.

L'estimulació ovàrica s'aconsegueix mitjançant l'**administració diària d'unes hormones** anomenades gonadotropines (que són bàsicament l'FSH i l'HMG) per via intramuscular o subcutània en funció del fàrmac utilitzat. L'administració subcutània

permet a la dona autoinjectar-se la medicació. Aquest tractament s'individualitza en funció de l'edat de la dona, el funcionament dels seus ovaris, els seus nivells hormonals basals i la resposta a altres intents previs d'estimulació, i precisa d'una monitorització seqüencial de la resposta de la pacient al tractament. L'administració de gonadotropines s'inicia sobre el 2n o el 3r dia de la regla del cicle d'estimulació ovàrica. La durada de l'estimulació ovàrica és variable i normalment és d'uns 8-12 dies. Durant aquest període es fan controls mitjançant ecografies (comptatge i mesurament de fol·licles ovulatoris) i anàlisis de sang (per valorar els nivells d'estradiol en sang) per a determinar la magnitud de la resposta, controlar el creixement i maduració fol·licular i determinar el dia correcte per a programar l'extracció dels oòcits.

Per a la inducció dels últims canvis maduratiu en els oòcits previs a la seva extracció, s'usa habitualment una dosi única d'HCG. Aquesta hormona provoca també l'ovulació o expulsió dels oòcits dels ovaris cap a la trompa aproximadament 36-40 hores després de la seva administració, i per aquesta raó es planifica amb precisió la seva extracció quirúrgica sobre les 35 a 36 h, quan els oòcits estan encara als ovaris i en el seu moment òptim de maduració.

En general, simultàniament o amb uns dies d'anticipació a l'estimulació ovàrica, es fa un procés d'inhibició hipofisària (també anomenat frenació). La hipòfisi és una glàndula que controla els ovaris en condicions naturals. La inhibició ens permetrà fer-nos amb el control total de l'estimulació ovàrica, i evitar així interferències d'hormones internes que produeixin l'ovulació espontània i el conseqüent desaprofitament dels oòcits abans de la seva extracció.

Per a aconseguir la inhibició hipofisària es poden utilitzar dos tipus de fàrmacs similars a la GnRH, que és una hormona que participa en els mecanismes naturals de l'ovulació: els agonistes o els antagonistes.

- Fàrmacs Agonistes de la GnRH. La seva administració és diària (via subcutània) i poden seguir dos protocols diferents d'administració:
 - Protocol llarg: s'administren des de pocs dies abans d'iniciar la regla del cicle d'estimulació ovàrica fins al dia de la injecció de l'HCG
 - Protocol curt: des del primer dia de la regla del cicle d'estimulació fins al dia de l'HCG.
- Fàrmacs Antagonistes de la GnRH. La seva administració és diària (via subcutània) i s'inicia als pocs dies d'haver començat l'estimulació ovàrica. Es manté fins al dia de la injecció de l'HCG.

Extracció d'oòcits dels ovaris

Procediment pel qual s'aspira el líquid contingut en els fol·licles ovàrics. Els fol·licles són petits quists dels ovaris de no més de 20-25 mm de diàmetre i a l'interior de cadascun dels quals resideix i madura un oòcit. Al finalitzar l'estimulació ovàrica i després d'administrar l'HCG, la majoria d'oòcits madurs s'alliberaran de la paret fol·licular i estaran en suspensió en el líquid fol·licular.

El procediment és senzill, dura uns 15-20 minuts i es porta a terme en un quiròfan sota sedació general, o ocasionalment amb anestèsia local. S'utilitza una agulla que permet accedir als ovaris a través de la vagina, tot realitzat sota control ecogràfic.

Mitjançant un sistema de punció-aspiració es buiden els fol·licles un a un, dipositant el seu contingut líquid (on es troben els oòcits) en uns tubs estèrils.

El procediment, anomenat també punció fol·licular, es programa 35-36 h després de l'administració de l'HCG, és a dir, poc abans de l'ovulació, per a assegurar que els oòcits no hagin estat expulsats dels ovaris i garantir un bon grau de maduresa. Tot el procés és ambulatori i la pacient està en condicions de retornar al seu domicili poques hores després de la intervenció.

Identificació dels oòcits

Els líquids fol·liculars es traslladen al laboratori i s'hi localitzen els oòcits mitjançant l'ús d'un microscopi. Cal ressaltar que no tots els líquids fol·liculars contenen oòcits. Quan són ovulats, els oòcits estan envoltats d'un nombrós i extens conjunt de cèl·lules anomenades cèl·lules del "cumulus ooforus" i de la "corona radiata". Els oòcits es col·loquen en plaques amb medi de cultiu dins de l'incubador degudament identificats i numerats.

Preparació del semen

Consisteix en **obtenir una població d'espermatozoides amb bona mobilitat** i aïllar-la dels altres components del semen (plasma o líquid seminal, espermatozoides amb baixa o nul·la mobilitat, altres cèl·lules presents en l'ejaculat). Aquest procés és conegut amb el nom de Capacitació Espermàtica ja que indueix uns canvis en els espermatozoides sense els quals no serien capaços de fecundar.

Existeixen diferents mètodes de capacitació espermàtica (swim-up, gradients de densitat...). El mètode s'individualitza en cada cas en funció de les característiques de la mostra.

En alguns casos en què no es troben espermatozoides en l'ejaculat és possible recuperar espermatozoides dels testicles mitjançant punció (TESA) o biòpsia (TESE). Aquests espermatozoides poden ser usats per a la FIV-ICSI després d'aïllar-los del teixit testicular.

Inseminació/Microinjecció dels oòcits

La **inseminació convencional** dels oòcits és el procediment pel qual **es posen en contacte els oòcits amb els espermatozoides** amb la finalitat d'aconseguir la fecundació. La inseminació té lloc generalment entre les 3 i les 6 hores posteriors a la recuperació dels oòcits. Tot el procés es porta a terme en unes plaques amb unes petites gotes de medi de cultiu on es disposen els oòcits i els espermatozoides. Aquestes plaques es mantenen dins d'un incubador que els proporcionarà un ambient de temperatura, humitat i puresa de l'aire idonis per a satisfer les necessitats dels gàmetes.

Existeix una modalitat d'interacció entre oòcit i espermatozoide per a aconseguir la fecundació diferent a la inseminació convencional dels oòcits i que es diu **Microinjecció Espermàtica Intracitoplasmàtica (ICSI)**. Consisteix en introduir directament mitjançant micromanipulació un espermatozoide dins de l'oòcit madur. El seu ús cada vegada és més generalitzat per la seva alta eficiència. Donada la seva

gran rellevància i extensió del seu ús, existeix informació complementària sobre aquesta tècnica en l'últim apartat d'aquest capítol.

Valoració de la fecundació

Es realitza aproximadament a les 16-20 hores després d'haver posat en contacte els oòcits amb els espermatozoides o d'haver realitzat la microinjecció espermàtica. El signe usat per a detectar que un oòcit ha estat fecundat és la **visualització en el seu interior de dos nuclis**, anomenats pronuclis. Aquests pronuclis són les estructures cel·lulars que contenen la informació genètica d'origen patern i matern i només són visibles durant un curt termini de temps. Just en aquest moment s'identifiquen els oòcits correctament fecundats (embrions) i es descarten per al cultiu cel·lular aquells oòcits no fecundats o que presenten anomalies de fecundació.

Per a valorar la fecundació en els casos en què s'ha aplicat la inseminació convencional dels oòcits, prèviament cal disgregar les cèl·lules de la granulosa i corona radiata que envolten a l'oòcit, ja que impedeixen la correcta visualització de l'oòcit. En els casos d'ICSI la disgregació ja haurà estat feta el dia anterior just abans de la microinjecció.

Cultiu embrionari

Els oòcits fecundats, anomenats preembrions o embrions, es mantenen en cultiu en l'incubador durant diversos dies per a permetre que es desenvolupin. El **desenvolupament embrionari** es basa en un procés que es diu divisió cel·lular pel qual es produeix un augment del nombre de cèl·lules de l'embrió. Durant el procés cal adaptar les condicions de cultiu a les necessitats metabòliques dels embrions ja que aquestes varien.

És important controlar minuciosament les condicions ambientals i de cultiu (temperatura, pH, humitat, esterilitat, qualitat de l'aire) per a garantir unes **condicions òptimes** per al desenvolupament embrionari "in vitro".

La idoneïtat de les condicions de cultiu així com la capacitat de desenvolupament intrínseca de cada embrió condicionaran la seva capacitat de progrés, i li proporcionaran un aspecte més o menys òptim segons sigui el cas.

La supervisió i avaluació dels embrions durant el procés permetrà a l'embrióleg seleccionar els embrions amb major capacitat d'implantació per a transferir o congelar, i descartar els inviàbles. Els criteris usats per a la valoració embrionària són bàsicament morfològics i comprenen aspectes com el ritme de divisió cel·lular, la regularitat en la grandària i forma de les cèl·lules que componen l'embrió, la presència i el grau de fragmentació existent a l'embrió, l'aspecte del citoplasma, la vacuolització, l'aspecte de la zona pel·lúcida o coberta de l'embrió, la presència de multinucleacions a les cèl·lules, etc.

Transferència embrionària

La transferència consisteix en el **dipòsit dels embrions dins de la cavitat uterina**. Es realitza introduint amb gran delicadesa una fina cànula a través del coll de la matriu fins a fer-la arribar a l'interior de l'úter i posteriorment injectar a través d'ella els embrions. Tot el procés es controla sota ecografia abdominal, fet que fa necessari

que la dona tingui la bufeta plena. La transferència no és un procés dolorós i és excepcional el requeriment d'anestèsia general o l'ús de vies alternatives a la cervical per a accedir a la cavitat uterina, com poden ser la transferència transmiometrial o intratubàrica. La dona pot abandonar el centre després d'uns minuts de repòs, en condicions normals.

El moment en què es porta a terme la transferència dels embrions i el nombre d'embrions introduïts (1, 2 o 3) s'individualitza en funció de les característiques de cada cas i de l'aspecte que han presentat els embrions durant el seu desenvolupament. Normalment es porta a terme dos o tres dies després de la recuperació dels oòcits però hi ha situacions en les quals pot ser aconsellable esperar fins a cinc o sis dies.

Microinjecció espermàtica (ICSI)

La microinjecció espermàtica intracitoplasmàtica (Intracytoplasmatic Sperm Injection, ICSI) és una tècnica que es pot aplicar en el curs d'una FIV i consisteix en **la introducció d'un espermatozoide dins d'un oòcit madur**. El seu objectiu és facilitar la consecució de la fecundació. L'ICSI és per tant una alternativa a la tècnica d'inseminació "convencional" dels oòcits.

La tècnica proporciona percentatges de fecundació situats al voltant del 70% dels oòcits microinjectats i les taxes de degeneració són inferiors al 10%. Els casos en què no hi ha fecundació aplicant l'ICSI són rars i són deguts a un baix nombre i/o qualitat dels oòcits, a problemes ocults en els espermatozoides, o bé per oòcits que impedeixen una correcta activació (inici del procés de desenvolupament posterior a la fecundació) de l'oòcit fecundat.

L'ICSI requereix, a diferència de la inseminació convencional dels oòcits, una preparació específica dels oòcits i dels espermatozoides, així com un complex procés de micromanipulació dels gàmetes per a dur-la a terme.

Indicacions

L'alta eficàcia del procés d'ICSI ha provocat la generalització del seu ús, més enllà de la indicacions originals per a les quals es va començar a aplicar la tècnica, i que són les següents:

- **Anomalies dels paràmetres seminals**
L'ICSI està especialment indicada en aquells casos en què els pacients compten amb baixa concentració i/o morfologia i/o mobilitat espermàtica. En aquests casos les possibilitats de fecundació serien escasses o nul·les inseminant els oòcits de forma convencional. També l'ICSI ofereix bons resultats en aquells homes amb factor immunològic (presència d'anticossos antiespermatozoides en el semen).
- **Ús d'espermatozoides testiculars**
L'ICSI permet fins i tot obtenir bones taxes de fecundació quan l'ejaculat no conté espermatozoides (azoospermia) a causa d'un problema obstructiu o secretor. En aquesta situació s'obtenen els espermatozoides directament dels testicles mitjançant una aspiració (TESA) o una biòpsia testicular (TESE). Aquestes intervencions són curtes, es realitzen sota anestèsia local i el

pacient pot reprendre la seva activitat habitual pocs minuts després del procediment.

- Cicles previs de FIV amb baixa taxa o absència de fecundació.
Pot haver-hi casos en què la inseminació convencional dels oòcits ha revelat una baixa o nul·la capacitat dels gàmetes per a interactuar i donar lloc a embrions. Hi ha factors seminals, però també oocitaris, que poden provocar aquest efecte. En la majoria de casos l'ICSI soluciona el problema.

Existeixen algunes situacions extremes en les quals no és possible o aconsellable recórrer a l'ICSI com a tècnica de fecundació. Entre elles estan els casos en què no és possible trobar espermatozoides ni en l'ejaculat ni en el testicle (si bé en algun d'aquests casos es poden localitzar en testicle cèl·lules precursors d'espermatozoides i injectar-les) o els casos en què l'existència de problemes genètics en la formació dels espermatozoides desaconsella la seva utilització per a finalitats reproductives. La incidència d'aquest tipus de problemes genètics augmenta com més afectada estigui la qualitat seminal. Sempre que hi hagi un factor masculí d'esterilitat, és important tenir una valoració andrològica que permeti detectar aquests casos.

Metodologia

1. Decumulació dels oòcits

Els oòcits recuperats en una FIV estan envoltats d'un extens i nombrós grup de cèl·lules anomenades cèl·lules de la granulosa que formen una massa que rep el nom de "cumulus oophorus" o "corona radiata".

Així com en la FIV amb inseminació convencional es posen en contacte els espermatozoides amb els oòcits envoltats de les seves cèl·lules del cúmulus i corona, en la FIV-ICSI cal alliberar els oòcits d'aquestes cèl·lules. El procés, que es diu decumulació, requereix l'acció combinada d'una substància o enzim anomenat hialuronidasa amb la repetida aspiració i expulsió de l'oòcit per un fi capil·lar.

La decumulació permet deixar a l'oòcit lliure de cèl·lules acompanyants i d'aquesta forma pot ser valorat el seu aspecte, el seu grau de maduresa i dur a terme la microinjecció sense entrebancs. El diàmetre aproximat d'un oòcit és de 150µm (aproximadament una desena part d'un mm).

2. Selecció dels oòcits madurs

És imprescindible seleccionar per a la microinjecció els oòcits en estadi de Metafase-II, ja que solament aquests presenten el grau de maduresa necessari per a ser correctament fecundats. Els oòcits molt immadurs presenten en el seu interior un nucli anomenat Vesícula Germinal (estadi de Profase-I). Un grau de immaduresa menys accentuada és l'estadi de Metafase-I, estadi en què desapareix el nucli. Finalment, quan l'oòcit està plenament madur (estadi de Metafase-II) apareix una petita cèl·lula adjacent a l'oòcit anomenada Corpúscle Polar, que conté cromosomes sobrants.

3. Preparació de la placa de microinjecció

La placa de microinjecció és un petit contenidor especial de plàstic on se situaran unes microgotetes (gotes molt petites) amb medi de cultiu dins de les quals es col·locaran els oòcits madurs. També disposarem una microgota amb

un medi viscos on se situaran els espermatozoides. El medi viscos reduirà la velocitat dels espermatozoides, i permetrà immobilitzar-los i atrapar-los amb més facilitat. Totes les gotes es cobreixen amb un oli que les protegeix de la dessecació.

4. Preparació de l'equip de micromanipulació

El procés d'ICSI requereix un equipament sofisticat. Es tracta d'un microscopi situat en una zona estable del laboratori en el qual estan adaptats uns aparells anomenats micromanipuladors. Els micromanipuladors disposen d'un complex sistema que permet controlar el moviment de les pipetes que portaran a terme la micromanipulació amb una precisió inferior a un micròmetre. Uns altres aparells diferents, els microinjectors, s'encarregaran d'aplicar una pressió de succió o d'expulsió de líquid per l'interior de les citades pipetes. Les pipetes són uns capil·lars de vidre finíssims usats per a subjectar l'oòcit (pipeta de subjecció), així com per a aspirar i microinjectar l'espermatozoide (pipeta de microinjecció). Les pipetes són estèrils, d'un sol ús i cal situar-les i centrar-les correctament abans de cada ICSI.

5. Microinjecció

Consisteix en la introducció d'un espermatozoide dins d'un oòcit mitjançant micromanipulació. El procés comença per seleccionar un espermatozoide que presenti mobilitat i immobilitzar-lo mitjançant una pressió de la pipeta de microinjecció sobre la cua de l'espermatozoide. Seguidament s'aspira l'espermatozoide amb la mateixa pipeta. Després es fixa l'oòcit amb la pipeta de subjecció. Finalment s'introdueix la pipeta de microinjecció a l'interior de l'oòcit i s'hi allibera l'espermatozoide. Aquest procediment es repeteix per a cadascun dels oòcits madurs.