



bioscio

TRATAMIENTO DE  
REPRODUCCIÓN ASISTIDA

**Autora: Laura I. Sarasola**

## I. Laboratorio de embriología

En los laboratorios de embriología se desarrollan procesos de reproducción asistida (FIV/ICSI), y concretamente inseminación de ovocitos, evaluación de fecundación, selección de gametos y capacitación etc.. Estos procesos requieren un ambiente extremadamente controlado, en el que no haya contaminaciones ni manipulaciones indebidas de las muestras. Se extreman las precauciones respecto a la temperatura (24 °C ambiente y 37°C en incubadores), la presión positiva, contaminaciones volátiles, y otras partículas.

Para mantener el aire puro, el laboratorio dispone de filtros de aire comunes y filtros de carbón y HEPA. El material que se utiliza debe ser estéril, desechable y homologado para la manipulación embriológica; tras la manipulación de una muestra, el material debe ser inmediatamente desechado, ya que la contaminación de las muestras puede ocasionar graves repercusiones.

El acceso al laboratorio está altamente restringido, y se debe acceder según la normativa para evitar las contaminaciones (vestuario, sin maquillaje o colonias y sustancias nocivas para las células).

## II. Seminograma

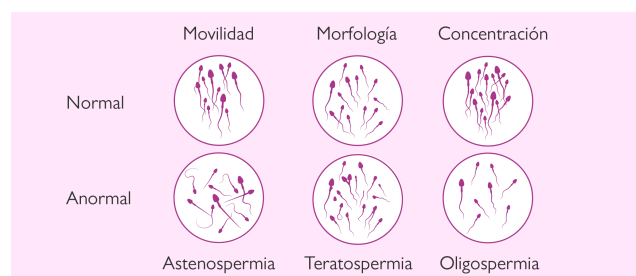
El **seminograma** o espermiograma es la prueba diagnóstica clínica empleada para evaluar la fertilidad masculina. Consiste básicamente en analizar la muestra de semen de manera cualitativa y cuantitativa y a nivel tanto microscópico como macroscópico. Los parámetros y exámenes a poder realizar son los siguientes:

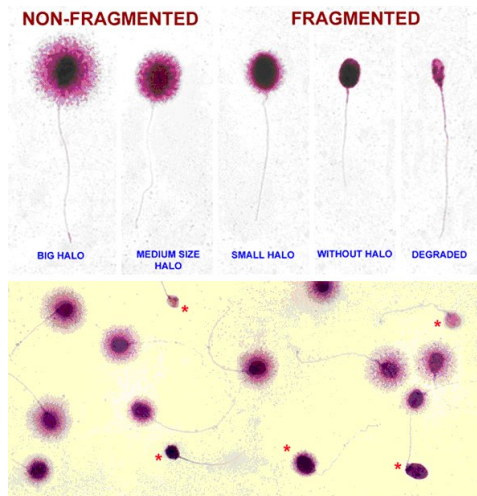
**Concentración.** Cantidad de espermatozoides por ml de muestra.

**Motilidad.** Clasificación A;B;C;D dependiendo de la motilidad, desde un patrón de movilidad progresiva a los inmóviles.

**Vitalidad.** Se emplea la tinción eosina nigrosina. Los espermatozoides muertos son permeables a las tinciones, por lo que se emplea la coloración de los gametos para descartarlos.

**Morfología.** A la hora de seleccionar los espermatozoides son preferibles aquellos que no presentan anomalías morfológicas, ya que podrían estar sujetas a aberraciones genéticas.





Estas pruebas son las más comunes y aportan una idea general de la calidad del esperma. Sin embargo se han empezado a incluir estudios de biomarcadores, los cuales proporcionan mayor información sobre la muestra; los estudios más relevantes son los genéticos: FISH, microarray, detección de microdeleciones del cromosoma Y, epigenética y fragmentación del ADN (fragmentación monocatenaria o bicatenaria). Dependiendo de las características del esperma (concentración, motilidad, morfología) se recomienda un tipo de test u otro.

La fragmentación del ADN puede tener varias causas: la gametogénesis, el estrés oxidativo, el entorno, la edad... En cualquier caso, el resultado de la fecundación por un espermatozoide con ADN dañado es un embrión inviable y en la mayoría de casos ocurre el aborto (aunque pueda llegar a desarrollarse, el feto no llega a nacer vivo).

## Selección espermática

Se pueden emplear distintos métodos para seleccionar los espermias, dependiendo del procedimiento que se vaya a realizar posteriormente.

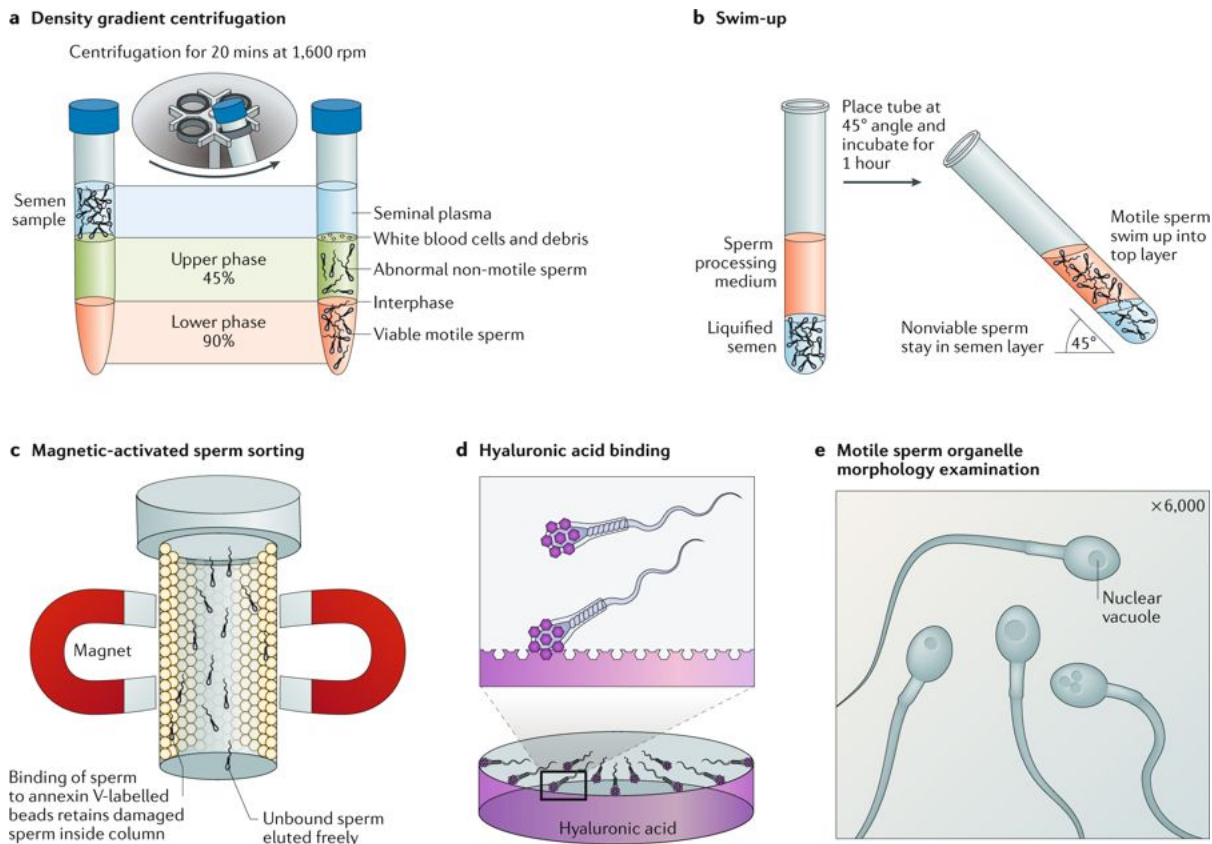
**Swim up.** Esta técnica consiste en seleccionar los espermatozoides con mayor capacidad móvil. Se centrifuga la muestra y se añade medio sin resuspender el *pellet*; los espermatozoides con mayor motilidad son capaces de desplazarse al nuevo medio, por lo que transcurrido el tiempo de incubación, se recoge este medio para la fecundación.

**Gradiente de densidad.** Esta estrategia aprovecha la diferencia de densidad de los diferentes componentes seminales y la movilidad y morfología de los espermatozoides. Los más móviles (tipo A y B) conseguirán atravesar más rápidamente las diferentes capas de los gradientes hasta situarse en el fondo, mientras que los tipo C y D junto con otros componentes seminales (restos celulares, plasma seminal) quedan en capas del gradiente superiores.

**Sperm-slow.** En esta técnica de recuperación de esperma se emplean sustratos de ácido hialurónico; los espermatozoides capacitados, expresan receptores de AH, por lo que los espermatozoides inmovilizados se seleccionan para la fecundación. En este ensayo se observan los espermatozoides inmovilizados por la cabeza, pero con gran motilidad en la cola.

**Columnas de anexina.** Consiste en la captación de espermatozoides apoptóticos por medio de sustratos magnéticos en la columna. Esta técnica se basa en la presencia de fosfatidilserina en las membranas de las células apoptóticas; el sustrato magnético es capaz de unir la fosfatidilSer y por lo tanto no deja eluir los gametos apoptóticos.

**IMSI.** Consiste en la selección de espermatozoides por morfología, y se emplea mayormente en técnicas de FIV



### III. Fecundación *in vitro* - Transferencia embrionaria

La fecundación *in vitro* convencional consiste en la unión del óvulo y el espermatozoide en el laboratorio, para posteriormente implantarlo en el endometrio de la madre. Pararealizar la FIV, se requieren varios óvulos y se realizan varias fecundaciones para asegurar la formación de un embrión viable. El proceso es el siguiente:

1. Estimulación hormonal de la mujer. Para poder conseguir varios óvulos se debe controlar el ciclo hormonal de la mujer; se emplean análogos o antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas -GNRH- (reguladora de la secreción de hormonas LH y FSH), inhibiendo la secreción hipotalámica de GnRH. De esta manera se previenen las ovulaciones espontáneas. De esta manera, la menstruación podrá ser controlada por las hormonas administradas exogenamente.
2. Extracción de óvulos. Se realiza una punción folicular para extraer el líquido; se limpia el folículo para arrastrar las células foliculares no deseadas y se aspira el óvulo para su extracción. El proceso se realiza con instrumentos especializados y mediante visualización ecográfica. El óvulo extraído debe ser maduro, por lo que debe estar en la metafase (un cuerpo polar unido).
3. Unión de óvulo y espermatozoide. Tras seleccionar las muestras, se incuban el óvulo y espermatozoide para que suceda la fecundación espontáneamente. Se observa la fecundación y el desarrollo del embrión hasta el estadio mórula o blastocisto.
4. Implantación ene el endometrio. Tras la fecundación y desarrollo inicial del embrión se

implanta en el endometrio de la mujer. 15 días después de la implantación se realiza una prueba de embarazo.



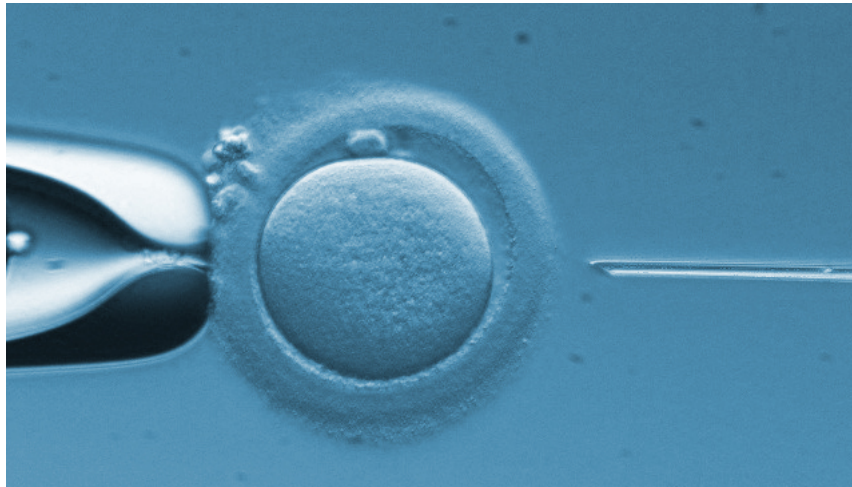
## IV. Técnicas de microinyección-ICSI

La técnica de reproducción asistida ICSI (Fecundación *In vitro* Intracitoplasmática con microinyección) consiste en la inyección de un solo espermatozoide en el óvulo. La obtención y selección de gametos se realiza de la misma manera que en el FIV convencional.

1. Microinyección. Se seleccionan los espermatozoides previamente realentizados por PVP. Se recogen en posición para la fecundación y se insertan directamente al óvulo rompiendo la membrana.
2. Observación. A las 16 h de la fecundación se observan los pronúcleos. A los 2 días se forma el blastómero de 4 células y se duplica al 3 día con 8 blastómeras. Al cuarto día se puede observar la mórula y al quinto el blastocisto; en estos últimos estadios se puede implantar en el endometrio. Al sexto día el blastocisto es expulsado del revestimiento zona pelúcida.
3. Selección de embriones e implantación. Antes de la implantación se seleccionan los embriones con mayor viabilidad; solamente se pueden implantar 3, y en la mayoría de los casos se implantan 2. Los embriones seleccionados se recogen en catéteres que son insertados en el útero para ser depositados en el endometrio. Si el endometrio no está receptivo, se crioconservan las muestras para su próxima implantación.

## V. Criopreservación

La criopreservación consiste en la congelación de óvulos, espermia o embriones para su próxima aplicación. Las razones de criopreservar las muestras pueden ser varias, desde la preservación



por quimioterapia hasta criopreservación social. Actualmente se realizan dos tipos de criopreservación de distinto procedimiento:

**Congelación lenta.** Esta técnica es más antigua y la tasa de supervivencia es bastante baja.

**Bitrificación.** Consiste en la congelación inmediata de la muestra y requiere un tratamiento previo. Primero se deshidrata la muestra para sustituir el medio por compuestos crioprotectores; la muestra se sumerge en soluciones de bitrificación de concentración ascendente, hasta que el medio haya sido totalmente sustituido. Una vez la muestra esté crioprotegida (1 min) se recoge con el cryo-top, de manera que la muestra queda en la punta y se libera del exceso de medio crioprotector. Se sumerge en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se conserva en congelación. El proceso de desvitrificación se realiza de manera rápida, exponiendo la muestra congelada directamente a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; la muestra se estabiliza extrayendo el medio crioprotector.

En la crioconservación es muy importante identificar las muestras adecuadamente; en la muestra deberá constatar el tipo de muestra, fecha, identificador...es decir toda información necesaria para conocer bien la muestra.

En la crioconservación del embrión, se deshace la zona pelúcida; las técnicas para este procedimiento pueden ser la inyección, la aspiración o rotura por laser. También se aplican estas técnicas en ICSI, cuando la zona pelúcida presenta mayor resistencia a la inyección.