

TÈCNIQUES DE MICROMANIPULACIÓ EN FECUNDACIÓ *IN VITRO*: DISSECCIÓ DE LA ZONA PEL·LÚCIDA

ANNA VEIGA

Secció de Biologia. Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Dexeus. Barcelona.

RESUM

La dissecció de la zona pel·lúcida és una de les tècniques de micromanipulació que permet incrementar la taxa de fecundació d'òcits en parelles que se sotmeten a "fecundació *in vitro*" per problemes masculins. Es presenten resultats en 167 pacients tractats, 983 òcits i una taxa de fecundació de 18,2 %.

S'obté un 15,1 % d'embarassos per transferència. Se'n descriu la metodologia i es revisen els diversos estudis publicats sobre aquesta tècnica.

SUMMARY

Partial zona dissection (PZD) was introduced in 1988 by Cohen et al as a way to improve fertilization rates in IVF for male factors.

The mature oocytes are treated with hyaluronidase to eliminate the cumulus ooforus and the corona radiata and with sucrose to a the cytoplasm and facilitate the shrink procedure.

The oocytes are micromanipulated under an inverted microscope with Nomarski optics.

The results obtained depend on the quality of the sperm samples used with fertilization rates of 15-70%. PZDis a usefudl technique for male factor IVF as a way to obtain embryos and pregnancies for couples without success with standat IVF.

DISSECCIÓ DE LA ZONA PEL·LÚCIDA

El desenvolupament d'una tècnica que doni bons resultats en la microfecundació d'òcits humans tindrà una aplicació important en el tractament de l'esterilitat masculina.

L'èxit que s'obté en fecundació *in vitro* en casos de factor masculí és limitat, malgrat que les tècniques de millora de les mostres de semen estan perfeccionades (7).

El fet de facilitar el contacte entre espermatozoides capacitats i l'òcit augmentarà la probabilitat de fecundació en pacients amb mostres de semen alterades.

En els darrers tres anys s'han publicat estudis que demostren que la micromanipulació de l'òcit incrementa d'una manera notable la taxa de fecundació en FIV quan es tracta de problemes masculins (1, 2, 6).

Una de les tècniques més utilitzades és la dissecció de la zona pel·lúcida (DZP), descrita per Cohen i col·l. (1).

Entre les tècniques de micromanipulació aquesta és la menys agressiva i la que permet, en algun grau, que es mantingui una certa selecció natural a l'orifici que es crea a la zona pel·lúcida.

Qualsevol de les tècniques de micromanipulació, i sobretot la DZP, pot utilitzar-se en tres casos diferents:

La principal indicació és en problemes masculins que no se solucionen amb una millora de la mostra de semen amb les tècniques utilitzades habitualment per FIV.

També es poden micromanipular els òcits en casos de no-fecundació o en casos que la taxa de fecundació sigui molt baixa.

Si es coneix aquesta dada per un cicle de fecundació *in vitro* anterior, els òcits són micromanipulats abans de ser inseminats.

La micromanipulació es pot dur a terme una vegada s'ha comprovat que no hi ha hagut fecundació o només de molts pocs òcits, i es procedeix aleshores a una reinseminació.

La metodologia d'aquesta tècnica és la següent:

Quan es tracta d'òcits recentment recuperats, s'ha d'eliminar el cúmul oòfor i la corona radiada per tal d'aconseguir la total alliberació de l'òcit de les cobertes oocitàries, que dificultarien la micromanipulació.

Aquest procediment es realitza mitjançant una acció enzimàtica amb hialurodinasa al 0,1 % i acció mecànica amb pipeta Pasteur afilada al foc. En alguns casos, només s'aconsegueix algunes "finestres" en la zona pel·lúcida, però s'ha de poder evidenciar el corpuscle polar de l'òcit per tenir la seguretat que l'òcit és madur i, per tant, potencialment fecundable.

Una vegada l'òcit és lliure de cèl·lules que l'envolten se'l tracta amb una solució de sacarosa al 0,1 M. La sacarosa s'afegeix al medi de cultiu i s'incorpora a l'òcit en un sol pas. Amb aquest procediment s'obté una retracció del citoplasma, que implica que l'espai perivitellí sigui més ampli i permeti una manipulació de l'òcit més fàcil i menys traumàtica.

La retracció de l'òcit pot produir-se de tres maneres diferents:

- Retracció esfèrica: l'òcit es retrau regularment en tota la seva superfície.

- Retracció irregular: l'òcit es retrau en algunes zones i no en altres. Queden, per tant, alguns ponts de membrana units a la zona pel·lúcida.

- Retracció polar: l'òcit es retrau tan sols en un dels seus pols.

La micromanipulació dels òcits es fa en un porta excavat amb 20-30 µl de medi de cultiu amb sacarosa i recobert amb oli de parafina. Si és possible, la micromanipulació dels òcits s'ha de fer en una platina calenta (37 °C.).

L'equip necessari per dur a terme les tècniques de micromanipulació és un microscopi invertit -si és possible amb òptica de Nomarski- al qual s'han adaptat dos micromanipuladors. Un d'ells ha de permetre sostenir l'òcit: s'adapta una pipeta de *holding* i es fa pressió negativa amb una xeringa o amb la boca. L'òcit es fixa a la pipeta de *holding* per poder-lo manipular. A l'altre micromanipulador s'adapta una pipeta molt afilada (agulla) que serà la que travessarà la zona pel·lúcida. S'aprofita la zona d'espai perivitellí més àmplia que se situa en la part superior de la pipeta de *holding* i que és per on travessa la pipeta de dissecció (agulla). Quan la pipeta de dissecció ha penetrat la zona pel·lúcida, s'allibera l'òcit de la pipeta de *holding* i es frega contra ella per tal d'engrandir el trauc que s'ha creat en travessar la zona pel·lúcida.

Una altra tècnica de micromanipulació similar a la dissecció de la zona pel·lúcida és la "zona *drilling*" que utilitza àcid de Tyrode per foradar la zona pel·lúcida. Els resultats d'aquesta tècnica són menys satisfactoris perquè l'acció de l'àcid és perjudicial per al posterior desenvolupament dels embrions.

El trauc que es crea en la zona pel·lúcida després de la seva dissecció es fàcilment observable al microscopi invertit.

L'eliminació de la sacarosa de l'òcit es fa en quatre etapes i l'òcit es retorna al medi de cultiu normal abans de ser inseminat.

La mostra de semen es prepara amb la tècnica de gradients de Percoll (Mini-Percoll, (7)), sobretot si són mostres que presenten oligotoospermia o oligoastenoospermia. El semen es diposita sobre una columna de tres gradients (95 %, 70 %, 50 %) de Percoll (sílice recobert de polivinilpirrolidona) i se centrifuga durant 20 minuts a 1000 rpm. Es recupera l'últim gradient (95 %) i es fa un rentat amb

medi de cultiu. Els espermatozoides més mòbils hauran travessat els gradients, i per tant, s'aconsegueix la màxima concentració d'espermatozoides mòbils per inseminar els òcits.

Els primers resultats després de l'aplicació d'aquesta tècnica són publicats el 1988 pel grup de Cohen, pioners en dissecció de la zona pel·lúcida. La tècnica s'utilitza per a reinseminació i per a òcits recentment recuperats, les taxes de fecundació són de 50 % i 63 % respectivament. S'obtenen dos embarassos múltiples (bessons) després de la transferència mixta d'embrions obtinguts per DZP i per FIV clàssica.

Malter i col·l. (5) del mateix grup, indiquen que l'activació de l'òcit per exposició a la sacarosa redueix el risc de polispermia, que és elevat amb aquesta tècnica. En una sèrie de 115 òcits, amb reinseminació, la taxa de fecundació monospermica és del 23 % i la polispermica és del 23 %.

La manera com es produeix la retracció de l'òcit és un factor de pronòstic pel que fa a taxa de fecundació.

Cohen i col·l. publiquen el 1989 (3) una nova sèrie de pacients amb factor masculí on es manipulen els òcits recentment recuperats. La taxa de fecundació és del 68 % mentre que si no s'aplica aquesta tècnica amb òcits de control només s'assoleix el 47 %.

No s'observen diferències en la morfologia dels embrions que s'obtenen per DZP, i tampoc en el ritme de desenvolupament.

No més d'un 2 a un 10 % dels òcits manipulats es lisen durant el procediment de DZP.

Si les pacients en les quals s'utilitza la tècnica de DZP es tracten amb metilprednisolona (baixa dosi d'immunorepressió), s'obtenen taxes d'embaràs més altes que en els controls (4).

En un estudi de 70 cicles només per a pacients amb factor masculí (8), es divideixen els casos en tres categories:

El 1r grup de pacients es beneficia de la DZP en obtenir una taxa de fecundació del 23 % (36 % de polispermia) i no d'obtenir-se fecundació amb inseminació convencional en FIV. La taxa d'embaràs és de l'11,4 % per cicle.

En el 2n grup de pacients no s'obté fecundació ni amb DZP ni amb inseminació convencional.

En el 3r grup de pacients la taxa de fecundació és similar per DZP i per inseminació FIV clàssica.

D'altra banda sembla que el grau de teratozoospermia pot donar un pronòstic de l'èxit que es pot obtenir amb DZP (8).

La nostra experiència amb aquesta tècnica aporta els resultats següents: es tracten 167 pacients, amb un total de 983 oòcits. La taxa de fecundació monospermica és del 10 % i la polispermia és del 8,2 %. Es fan 33 transferències i s'obté un 15,1 % d'embarassos per transferència.

Comparant dos grups d'oòcits de pacients que se someten a FIV per factor masculí, un dels quals són tractats amb DZP i uns altres amb FIV clàssica, s'obtenen taxes de fecundació del 21,6 % i 14,5 % respectivament.

En conclusió, la tècnica de DZP ha demostrat la seva utilitat de tractar per FIV problemes masculins i obtenir embrions i embarassos en parelles que no assoleixen ni tan sols fecundació dels seus oòcits per FIV clàssica.

BIBLIOGRAFIA

1. COHEN, J., H. MALTER, G. WRIGHT, C. ELSNER, H. KORT i J. MASSEY (1988). Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. **Lancet**, ii: 162.
2. COHEN, J., B. TALANSKY, H. MALTER, M. ALIAKNI, O. DAVIS, A. REING, H. LIN, J. M. BEDFORD i Z. ROSENWAKS (1988). Microsurgical fertilization and teratozoospermia. **Hum. Reprod.** 6: 188-123.
3. COHEN, J., H. MALTER, G. WRIGHT, H. KORT, J. MASSEY i D. MITCHELL (1989). Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. **Hum. Reprod.** 4: 435-442.
4. COHEN, J., H. MALTER, C. ELSNER, H. KORT, J. MASSEY i M. P. MAYER (1990). Immunosuppression supports implantation of zona pellucida dissected human embryos. **Fert. Steril.** 53: 662-665.
5. MALTER, H., B. TALANSKY, J. GORDON, J. COHEN (1989). Monospermy and polyspermy after partial zona dissection of reinseminated human oocytes. **Gamete Res.** 23: 377-386.
6. MALTER, H. i J. COHEN (1989). Partial zona dissection of the human oocyte: a non trauma method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. **Fert. Steril.** 51: 139-148.
7. ORD, T., P. PATRICIO, E. MARELLO, J. P. BALMACEDA i R. H. ASCH (1990). Mini-Percoll: a new method of semen preparation for IFV in severe male factor infertility. **Hum. Reprod.** 5: 987-989.
8. TUCKER, J., J. M. BISHOP, J. COHEN, S. R. WIKER i G. WRIGHT (1991). Routine application of partial zona dissection for male factor infertility. **Hum. Reprod.** 6: 676-681.
9. VEIGA, A. i G. CALDERON (1991). Partial zona dissection. Comunicació al 7è. Congrés Mundial de FIV. Paris, juny 1989. **Abstracts Hum. Reprod.** 6: Supp.1.