

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CAPACITACION DEL SEMEN EN EL RESULTADO DEL TESTE DE HAMSTER.

B. Arán, M. Boada, I. Belil, P. N. Barri.

Servei de Medicina de la Reproducció.

Departament d'Obstetrícia y Ginecologia

Instituto Dexeus. Barcelona.

SUMMARY:

INFLUENCES OF SPERM PREINCUBATION TIME IN THE HAMSTER TEST

In this study, hamster egg penetration rate after short and long preincubation period of human sperm are compared.

The same sperm sample was preincubated for 5 to 6h. or for 22 to 24h. prior to insemination of hamster oocytes.

43 sperm samples were analysed and 2549 hamster oocytes were checked : 1440 with the short incubation period and 1109 with the long incubation.

No significant differences were observed on penetration rates between both groups : 22,01% (short period) and 24,79% (long period).

Penetration rates were the same for the two methods in 46,51% of cases.

Penetration rates increased in 25,58% of cases and decreased in 27,90% after the long incubation period. These differences between the long and the short protocol have led to a different result of the hamster test in 8 cases (18,60%). In 6 cases the result have change from negative to positive and in 2 cases from positive to negative.

We think these variations take place because of a different preincubation time is required for each sample for capacitation. There ins't absolute superiority of any given preincubation time. That's why, we think, we can avoid some falses negatives using the two methods.

Key words : Penetration rate, capacitation, oocyte.

INTRODUCCIO

Yanagimachi et al. 1976 (1) van demostrar que el semen humà capacitat podia penetrar oòcits de hámster sense zona pel·lúcida i va sugerir que podia servir per diagnosticar l'infertilitat masculina.

El temps d'incubació utilitzat per la capacitació del semen, als diferents laboratoris, varia de 0 a 24h. (2).

Els resultats obtinguts pels diferents autors son bastant discordants. Mentre que Johnson et al. (3) troben un porcentatge de penetració mes alt després d'un període llarg d'incubació del semen (19-22h), Zausner-Guelman (4) obté percentatges de penetració mes elevats amb períodes curts (2,3h). Rogers et al (5) descobreixen variacions en el temps òptim de capacitació per a cada individu i

aconsellen l'incubació del semen durant més o menys temps depenent de cada cas.

Donades aquestes discrepàncies vem creure interessant realitzar el test per duplicat sempre que es pogués. Es a dir, amb incubació curta (5-6h) i llarga (22-24h) de la mateixa mostra de semen.

MATERIAL I MÈTODES

Preparació de la mostra de semen.

S'han estudiat 43 mostres de semen. Amb cada una d'elles es realitza el test de hànter amb els dos períodes d'incubació. La mostra de semen s'obté per masturbació després d'un període d'abstinència sexual de 3-4 dies. Després d'uns 20 min. per la liquefacció es realitza una valoració subjectiva de recorte i motilitat de la mostra inicial mitjançant una càmera de Mackler.

Repartim la mostra en fraccions de 1-2 ml. en diferents tubs afegint 3 ml. de medi BWB, suplementat amb 3 mg/ml. d'albumina humana, per cada ml. de semen.

Realitzem un primer centrifugat de la suspensió a 600 g. durant 8-10 min. per eliminar el plasma seminal y seguidament seleccionem les formes mòbils per migració amb 1 ml. de BWB durant 45 min. a 37°C i 5% de CO₂.

A continuació es realitzen 2 rentats més i s'ajusta la concentració final d'espermatozoides mòbils a 10 M/ml. afegint BWB suplementat, aquest cop, amb 33 mg./ml. d'albumina humana. Finalment es deposita la suspensió de semen en plaques de Petri formant gotes

de 200ul recobertes de vaselina líquida. Es preparen 2 plaques per mostra pels 2 períodes d'incubació i es deixen capacitar al incubador a 37°C y 5% de CO₂ durant 5-6 h. en el cas d'incubació curta i durant 22-24h en el cas d'incubació llarga del semen.

Passat aquest temps es procedeix a l'inseminació dels oòcits de hámster.

Obtenció del oòcits de hamster.

Es superovulen les femelles de hámster (*Mesocricetus aureatus*) amb una injecció intraperitoneal de 40 UI de PMSC el primer dia del cicle; (els hámster tenen cicles de 4 dies); seguida d'un injecció de 40 ui de hCG a les 48-72h. Els hámsters són sacrificats 16-17h post hCG.

Es recuperen els oòcits mitjançant l'extirpació del oviducte i la rotura de la zona ampular. Es tracten amb hialuronidasa al 1% per disgregar el cumulus i amb tripsina al 2,5% per extreure la zona pel·lúcida.

Es deixen coincubar amb el semen (20 ovocits per gota de 200 ul de suspensió de semen) durant 2-3h a 37°C i 5% de CO₂. Passat aquest temps es procedeix al chequeix de fertilització amb un microscopi de contrast de fases. Els oòcits es col·loquen sobre un portaobjectes previament preparat amb 4 gotes d'una barreja de cera i vaselina líquida de manera que al col·locar el cubreobjectes, aquestes gotes, quedin a les cantonades. Les anirem pressionant alternativament fins que els oòcits es comprimeixin lo just per analitzar-los sense trencar-los.

Valoració de la fertilització

El criteri de fertilització es sempre l'observació d'un o més caps d'espermatozoide descondensat amb cua a l'interior del oòcit (Fig.1 y Fig.2).

El percentatge de penetració (P.P.) és la relació del número de oòcits fertilitzats per número total d'oòcits chequejats (Tabla I).

Es considera hámster test positiu quan el P.P. és superior o igual al 15%.

RESULTATS

S'han chequejat un total de 2549 oòcits de hámster : 1140 per l'incubació curta (Grup A) i 1109 per la llarga (Grup B). D'aquests van ser fertilitzats 317 i 275 respectivament, suposant un P.P. mig de 22,01% pel grup A i de 24,79% pel grup B (Tabla II). No existeixen diferències significatives entre els dos grups ($\chi^2 = 0,06$).

Els P.P. oscilen entre 0 i 100% tant en el grup A com en el grup B.

En la tabla III es mostren les variacions dels percentatges de penetració obtinguts pels dos protocols al analitzar cada un dels casos individualment. Tenim en conte les diferències $> 5\%$.

El P.P. es manté igual en el 46,51% dels cassos amb els dos mètodes (diferències < 5%).

En un 25,58% del cassos obtenim un P.P. més alt amb l'incubació llarga que amb la curta. Aquest augment va suposar un canvi en el resultat del test de positiu a negatiu en un 54,54% (6/11).

En el 27,90% de les mostres trobem una disminució del P.P. amb l'incubació llarga, malgrat que només en 2 cassos (16,67%) suposa un canvi de resultat positiu a negatiu. En aquests 2 cassos el P.P. després de 22-24h. d'incubació va ser 0%.

DISCUSSIO

Els nostres resultats demostren variacions en el resultat del test de hamster depenent del temps d'incubació del semen a més de la meitat del cassos (53,48%); proporció prou important com a tenir en conte.

Creiem que el canvi de resultat del test de negatiu a positiu que trobem en 6 casos o simplement l'augment del P.P. que es dona en el 25,58% amb l'incubació llarga, es degut a que els espermatozoides d'aquestes mostres necessiten d'un temps d'incubació més llarg per la capacitat.

En un 27,90% de les mostres observen un descens de la mobilitat dels espermatozoides associat a temps llargs d'incubació. En aquests cassos els percentatges de penetració seran mes elevats amb l'incubació curta que amb la llarga. De fet en els dos unics cassos en el quals hi ha hagut una variació en el resultat del test de positiu a negatiu es va observar un descens molt important de la

mobilitat després de 24h. d'incubació i el P.P. va ser 0% en ambdós cassos.

Es important destacar però que no tots el cassos en que el P.P. amb incubació llarga es inferior al P.P.

Els nostres resultats demostren que cada mostra de semen necessita d'un temps determinat per la capacitació. Utilitzant l'incubació llarga donem la possibilitat de fertilització a aquelles mostres que els seus espermatozoides necessiten més temps per capacitar i poder penetrar un oòcit; mentre que utilitzant també l'incubació curta detectem la capacitat fecundant d'aquells semens que pateixen una reducció ràpida de la mobilitat.

Es per aixó que, malgrat l'encariment de la prova, creiem convenient la realització del test amb els 2 temps d'incubació ja que, d'aquesta manera, eliminem alguns falsos negatius.

Aquest punt es de gran importancia clínica quan el test de hamster es realitza previament a un cicle de Fertilització "in vitro" i el que es preten és donar una orientació diagnóstica.

B.L.I.B.I.O.G.R.A.F.I.A

- 1.- YANAGIMACHI, B, YANOGIMACHI, H., ROBERT, B.J., 1976 : The use of zona-free animal ova. as a test system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa.
Bio. Reprod. 15: 471.
- 2.- PERRQULT, S.D., ROGERS, B.J., 1982 : Capacitation pattern of human

spermatozoa.

Fert.Steril, 38: 248-260.

- 3.- JOHN, J.P., ALEXANDER, N.J., 1984 : Hamster egg penetration comparison of preincubation periods.

Fert.Steril., 41:4, 599-602

- 4.- ZAUSNER-GUELMAN, B., BLASCO, L., WOLF, D.P., 1981 : Zona-free hamster eggs and human sperm penetration capacity: a comparative study of proven fertil donors and infertility patients

Fertil.Steril, 36: 771

- 5.- ROGERS, B.J. , 1988 : The sperm penetration assay : its usefulness reevaluated.

In : Modern Trends in Infertility and Conception Control.

Eds. Wallach y Kempers (1988), chap. 27,425-444.

TARLA I

número fertilitzats
 P.P. = _____ x 100 nº oocits inseminats

TARLA II

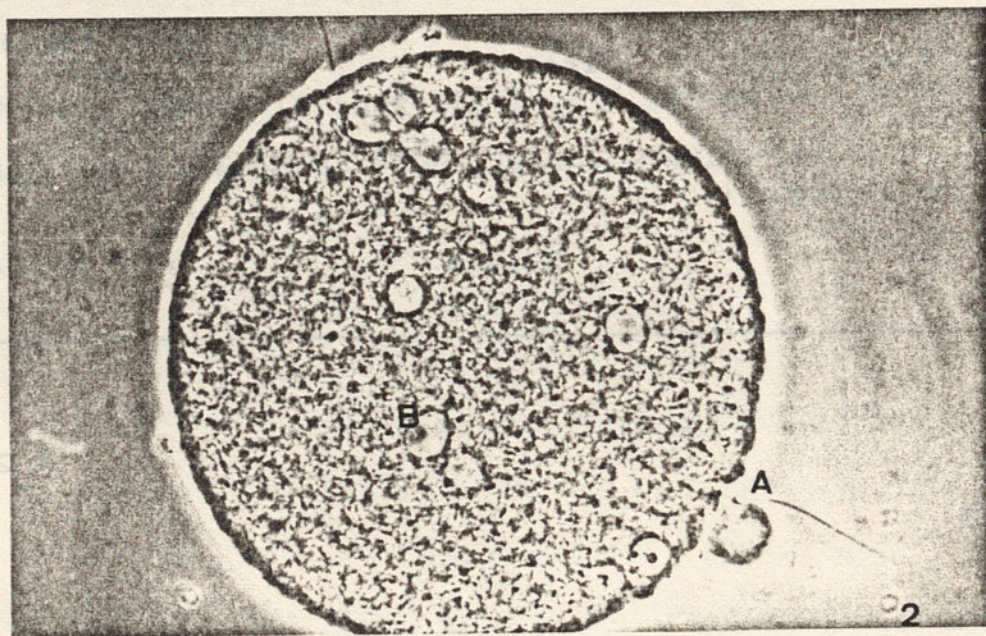
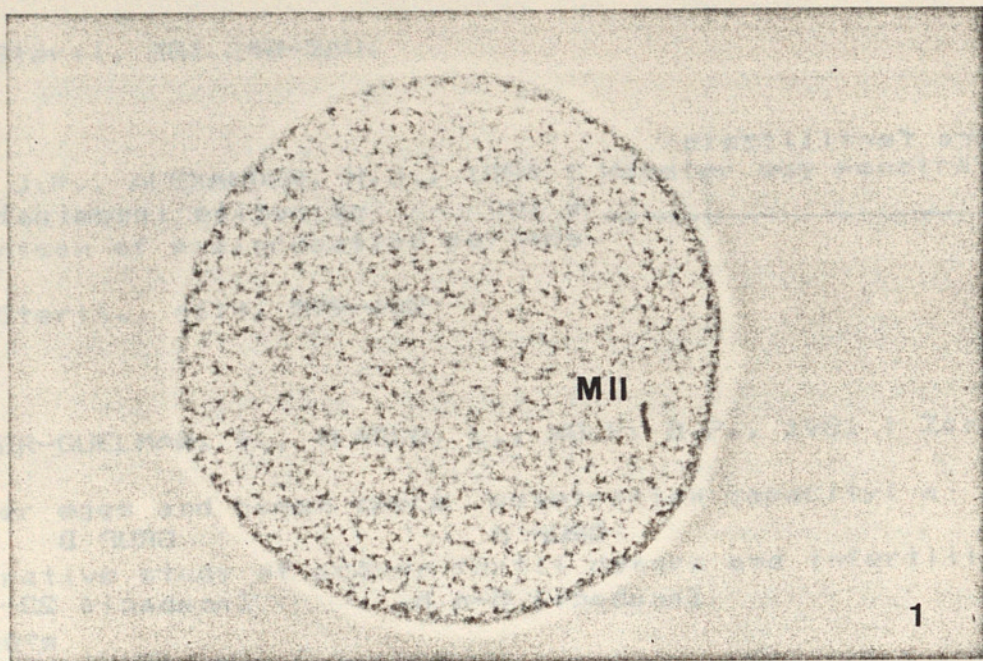
GRUP A GRUP B
 Incubació 5-6 h. Incubació 22-24h

Nº oocits penetrats	317	275
Nº oocits inseminats	1440	1109
Porcentatge penetració mig.	22,01%	24,79%

X 2 = 0,06

TARLA III

43 casos : 46,51% (20/43) P.P. incub. curta = P.P. incub. llarga
 25,58% (11/43) P.P. incub. curta < P.P. incub. llarga
 27,90% (12/43) P.P. incub. curta > P.P. incub. llarga



PEUS DE FIGURA

Fig. 1. ; Oòcit de hámster no fertilitzat ; placa metafàsica (MII)

Fig. 2 ; Oòcit de hámster polipenetrat. S'aprecia la diferència de mida entre els caps dels espermatozoides superficials (A) i els que han penetrat i s'han descendensat dins l'oòcit (B).

En la FIV influyen 3 factores: calidad de los oocitos, capacidad fecundante del semen y condiciones de incubación, entre estas la calidad del MC es esencial. En este trabajo vamos a exponer cómo controlamos la calidad del MC. También es válido el sistema para conocer si el utillaje: platos, tubos, jeringas, etc. contienen algún elemento tóxico que afecte a la FIV. Presentamos los resultados del último año: 26 lotes de MC.

MATERIAL Y MÉTODO (MC). El MC que utilizamos en la FIV es el HMG-P10 liofilizado que se disuelve en agua bidestilada apirógena y se complementa con bicarbonato, lactato cálcico, penicilina, estreptomicina y suero nativo inactivado. Se esteriliza filtrándolo a través de filtros milipore. Una fracción del MC preparado se incuba a 37°C, al menos 12 horas en atmósfera de 5% de CO₂ en aire y 95% de humedad, antes de iniciar el control de calidad.

ANIMALES. Ratonas hembras adultas cepa B6CBA F1 adaptadas al estabulario con 12 horas de luz diaria, agua y comida balanceada ad libitum. Se les estimula con 5UI de PMS intraperitoneal y, a las 18 horas, 5UI de hCG, por la misma vía. En este momento se pone cada ratona con un macho, cepa CD1, de fertilidad probada. Se usan de 2 a 5 ratones por cada control de calidad. A las 18 horas de puesta en contacto con el macho se observa si hay tapón vaginal, señal de apareamiento; dos horas después (20 h desde la inyección de hCG) se sacrifican las hembras. Se extraen los oviductos y se colocan en placas de petri con MC. Se puncionan los oviductos con agujas bajo control de estereomicroscopio para obtener los embriones que están en estadio de 2 pronucleos (PN). Se lavan 3 veces con MC y se incuban en tubos Nunc de fondo plano durante 5 días. Se observan al invertoscopio cada día y se anota número y estadio de los embriones. Cada control se hace por duplicado.

RESULTADOS. Ratonas estimuladas: 93. Con tapón vaginal: 33 (39'25%). Oviductos de los que se extrajeron embriones: 153 (92'17%). Se incubaron 24 horas y se contó el nº de embriones de 2 células: 222 en total. (15'8 embriones por oviducto viable y 20'11 embriones por ratona con tapón vaginal). Embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto expandido: media de los lotes: 42'16% con límites: entre 77'24 y 100%.

EVALUACION DE LOS RESULTADOS. Si el 70% ó más de los embriones de 2 células incubados alcanzan el estadio de blastocisto se considera que el MC es apto para usarlo en FIV humana.

CONCLUSION. El control de calidad de los MC en FIV exige un esfuerzo y un costo elevado pero permite asegurar que si no se ha producido fecundación es debido a la calidad de los gametos y no al MC.