III REUNION ANUAL
SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCION
Y DESARROLLO

Santiago
3 de agosto de 1990

Conferencias

SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCION Y DESARROLLO

INTERACCIONES ENTRE GAMETOS, EMBRIONES Y TRACTO GENITAL DE LA MUJER. (Gamete and embryo interactions with the female genital tract). Croxatto, H.B., Forcelledo, M.L. Fuentealba, B., Gajardo, G., Llados, C., Morales, P., Noe, G., Ortiz, M.E., Pommer, R., Riquelme, R., Salgado, A.M., Vigil, P., Von Plessing, G. Unidad de Reproducción y Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Esta línea de trabajo comprende diversos estudios que contribuyen a la comprensión integral de los fenómenos que acontecen en el lumen del tracto genital femenino y su relación con los tejidos circundantes, así como su regulación neural y endocrina.
El rol de estradiol y progesterona en la regulación del transporte ovular en la rata ha sido extensamente estudiado a través de variadas formas de administrar estas hormonas o bloqueadores de su síntesis o de su acción así como por la determinación de sus receptores en oviducto. Actualmente se investiga el posible rol de señales del embrión, de neurotransmisores y de la expresión génica inducida por estradiol, en el transporte de embriones.
La migración espermática se está estudiando en ratas bajo la acción de hormonas y drogas que afectan este proceso y en la trompa de Fallopio humana in vitro. También hay un proyecto para estudiar migración espermática en Cebus Apella y se está utilizando micropartículas marcadas con tecnecio 99 y microesferas para evaluar el transporte ascendente y descendente atribuible a la actividad motora del tracto genital en varias especies.
Se estudia la secreción de glicoproteínas por el epitelio oviductal en roedores y su influencia sobre el desarrollo preimplantacional. En la especie humana, se investiga la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida y la capacidad de los fluidos folicular y oviductal para inducir la reacción acrosómica.

LA REGIONALIZACION Y COMPACTACION DEL EMBRION DE RATON SON EFECTOS DE INTERACCIONES CELULARES. (Regionalization and compaction of mouse embryos are effects of cell interactions). Izquierdo, L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En el embrión de una célula, la disposición espacial de sus componentes se refiere al eje centro-periferia. Desde que se observa regionalización, en el estado de 2 células, algunos componentes se disponen con referencia a él o a los planos de contacto celular. Se demuestra experimentalmente que el contacto celular es la causa eficiente de la regionalización de componentes del cortex y de la superficie celular.

En el estado de 8 células ocurre la compactación; las células pierden la forma esférica y sus contactos puntuales, formándose un embrión esférico con células aplastadas entre sí. Está demostrado que la compactación es dependiente de Ca en el medio y en experimentos de recompactación, utilizando diversos inhibidores, se demuestra que la adhesión celular no depende sólo de Ca y que el Ca también tiene un efecto intracelular, sobre el citoesqueleto, que afecta la compactación.

Se discute la naturaleza de las señales temporales que marcan el paso de estos procesos morfogenéticos iniciales del desarrollo.

Este trabajo ha sido subsidiado por CONICYT y por la Universidad de Chile.

BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LA FUNCION TESTICULAR (Reproductive biology of testicular function).
Pino, A.M., Llanos, M.N., Ronco, A.M. & Valladares, L.E. Unidad de Biología de la Reproducción, INTA, U. de Chile.

Nuestra unidad estudia los mecanismos moleculares que controlan la función testicular. Especial énfasis se le ha dado a aquellos aspectos que están relacionados con la regulación endocrina gonadal y los mecanismos moleculares y celulares que se producen en el espermatozoide para que este adquiera la capacidad fertilizante.

En la actualidad se ejecutan las siguientes líneas de investigación:

a.- Participación de los esteroides en la definición de un microambiente regulatorio en la esteroidogénesis testicular.

b.- Mecanismos multifactoriales de la regulación endocrina testicular: participación de la N-metilación de fosfolípidos de membrana en la secreción de testosterona.

c.- Efecto de melatonina en la funcionalidad de las células de Leydig.

d.- Importancia de las reacciones de transmetilación de fosfolípidos de membrana que estarían aumentadas durante la capacitación.

Financiado por: FONDECYT, OMS y DTI (U. de Chile).

Comunicaciones libres

SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCION Y DESARROLLO

REPRODUCCION DE DELFINES NARIZ DE BOTELLA, TURSIOPS TRUNCATUS, FRENTE A ISLA CHAÑARAL, III REGION, CHILE. (Bottlenose dolphins, Tursiops truncatus, breeding at Chañaral Island, III Region, Chile). Capella, J.*, Gibbons, J.*, Elgueta, E.*, Díaz, H.*, Villna, Y.**, * Red de Avistamiento de Cetáceos (RAC-Codeff). **Unidad Biol.Reprod.,Dpto.Biología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El delfín nariz de botella, T.Truncatus (Montagu,1821) (Cetacea; Odontoceti, Delphinidae) es una de las 16 especies existentes en Chile. Una agrupación de entre 35 a 40 delfines parece habitar en forma permanente el mar al sudoeste de Isla Chañaral (29°02'S,71°37'W), hecho único en el Pacífico Suroriental.

Hemos detectado la existencia de 2 períodos reproductivos durante el ciclo anual; uno entre fines de invierno y primavera y otro entre fines de verano y otoño. Observamos neonatos en Diciembre de 1988, en Setiembre de 1989 y en Abril de 1990, con un total de 5 individuos. Esto es concordante con lo descrito para algunos sitios del mundo donde también se ha encontrado estacionalidad con 2 peak reproductivos.

En dos ocasiones se fotografió la disposición espacial entre el adulto y la cría, que se caracteriza por el buceo en contacto físico entre la aleta dorsal de la cría, con la región ventral o lateral del adulto. El ejemplar adulto correspondía a un macho, individualizado por marcas naturales características. Este hallazgo es único en dos aspectos; la ubicación física de la cría respecto al adulto solo había sido documentada fotográficamente en delfines estudiados en cautiverio y el sexo del adulto acompañante ha correspondido siempre a una hembra (no necesariamente la madre).

Financiamiento Proyecto 1089-89 Sociedad Zoológica de Frankfurt-RAC-Codeff.

INMUNODETECCION DE ACROSINA EN ESPERMATOZOIDES DE HAMSTER DORADO (Immunodetection of acrosin in golden hamster spermatozoa). Capote, C., Pérez, C., Becker, M. I., De Ioannes, A. y Barros, C. Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Espermatozoides de hamster preincubados por largos períodos de tiempo pierden la capacidad de penetración de la zona pelúcida, lo cual supondría una pérdida de acrosina desde el acrosoma. Ovocitos de hamster con zona inseminados con espermatozoides preincubados por 0, 3 y 6 a 8 horas mostraron tasas de penetración de 0,97% con espermatozoides con cero hrs.de capacitación , 79.7% a las 3 horas y 34% a las 8 hrs. de preincubación. De igual forma se observó una disminución en el número de espermatozoides penetrando por ovocito y un aumento en el número de muescas sobre la zona con el tiempo de preincubación. La detección de acrosina se realizó mediante anticuerpos monoclonales y policlonales antiacrosina revelados con técnicas de oro coloidal y amplificación con plata. Estos muestran la existencia de 4 patrones de marcación: 1. Espermatozoide aparentemente no reaccionado y sin marca; 2. Espermatozoide aparentemente no reaccionado y con abundante marca; 3. Espermatozoide reaccionado con marca en la superficie de la membrana acrosómica interna y en el capuchón acrosomal; 4. Espermatozoide reaccionado y sin marca. Al aumentar el tiempo de capacitación se observa un aumento del patrón 4 y una disminución del patrón 2. Estos resultados demuestran una relación entre la pérdida del capuchón acrosomal y de la capacidad de penetración de la zona con una pérdida de acrosina desde el acrosoma.

Financiado FONDECYT 495/89

METABOLISMO DE LA CELULA DE SERTOLI DURANTE LA MADURACION SEXUAL (Sertoli cell metabolism during sexual maturation). Castellón, E. Depto. Biol. Cel. y Genética, Fac. Medicina, Universidad de Chile.

Dado que la célula de Sertoli es considerada el soporte morfofuncional para la proliferación y diferenciación de las células germinales, es razonable postular que su función experimenta significativos cambios durante el proceso espermatogénico.

En el presente trabajo, se ha establecido el funcionamiento en la célula de Sertoli, de dos importantes vías metabólicas relacionadas con el tripéptido glutatión (GSH) : el ciclo del gama-glutamilo y la vía detoxificativa conducente a la formación de ácido mercaptórico. La primera, tiene que ver en parte, con el transporte de aminoácidos al interior de la célula y la segunda con la conjugación del GSH con compuestos electrofílicos, en su mayoría nocivos para la célula.

Los resultados muestran que ambas vías metabólicas, expresadas por la actividad de sus enzimas más importantes, experimentan en el testículo, un incremento que es directamente proporcional a la edad del animal. Estas actividades provienen fundamentalmente de la célula de Sertoli, lo que se corrobora cuando estas enzimas se miden en cultivos de estas células. Las hormonas FSH y testosterona estimulan este incremento edad dependiente y el tratamiento hipotónico de los cultivos, con el objeto de eliminar células germinales contaminantes, lo disminuye. Esto sugiere que estas actividades de la célula de Sertoli pueden estar reguladas por la aparición, en el túbulo seminífero, de células germinales en diferenciación (alrededor de los 18 días), momento crítico en el cual la célula de Sertoli requiere su máxima capacidad de síntesis proteica y una adecuada maquinaria protectiva para las células germinales en desarrollo.

Financiado parcialmente por FONDECYT 778/89 y OMS 88052.

EFECTO DEL MOCO CERVICAL EN LA CAPACIDAD FECUNDANTE Y EL PATRON DE FLUORESCENCIA PARA CON-A Y WGA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS. (Cervical Mucus' Effect upon the Fertil Capacity and the Fluorescence Pattern of Human Spermatozoa) Crosby, J.* & Barros, C. Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El moco cervical estrogénico actuaría como "filtro" biológico impidiendo el paso de espermatozoides inmóviles y ciertas formas anormales. Los resultados de fecundación *in vitro* por otro lado muestran diferencias en la capacidad fecundante de los espermatozoides obtenidos por Swim Up (SU) y obtenidos por migración a través de moco cervical (MMC). Debido a esto, se estudió la posible modificación de los oligasacáridos de la membrana plasmática de espermatozoides obtenidos por SU y MMC. Los espermatozoides se almacenaron en moco cervical por 2, 24 y 48 horas y luego se incubaron con Con A-FITC y WGA-FITC para determinar sus patrones de fluorescencia. También, se realizó el test de fusión de membranas gaméticas. Los resultados mostraron que los porcentajes de fecundación varían según la muestra de semen. Las muestras almacenadas en moco presentan porcentajes de fecundación constantes a lo largo del tiempo, mientras que los de los controles disminuyen. El patrón de fluorescencia para ambas lectinas no varía entre ambas poblaciones de una misma muestra, las obtenidas por SU y por MMC, pero si existe una diferencia cuantitativa (una disminucion de mas del 40%) del patrón positivo entre las muestras almacenadas por 2 y 24 horas.

Financiado por Fondecyt 495/89. *Becario de la Fundación Rockefeller.

EFECTO DEL COLESTEROL SOBRE LA CINETICA DE LA REACCION ACROSOMICA EN ESPERMATOZOIDES DE CONEJO. (Effect of cholesterol on kynetics of the acrosome reaction in rabbit sperm). Diaz Fontdevila M.F. y Bustos Obregón E. Depto. de Biología Celular y Genetica. Fac. de Medicina. Universidad de Chile.

Se conoce que el colesterol "in-vitro" revierte reversiblemente la capacitación de conejos previamente capacitados.

Nuestro trabajo tiene por objeto determinar el efecto de un exceso de colesterol sérico, causado por una dieta con un 0,5 % de colesterol sobre la cinetica de la reacción acrosómica de espermatozoides de conejos adultos (4 a 9 meses).

Determinamos que con un aumento de colesterol sérico de 50 a 900 mg/dl, no se produjo variación en cuanto a los niveles de colesterol, triglicéridos ni lípidos totales en plasma seminal de conejos tratados respecto a los controles. Sin embargo se observó que la sobrecarga de colesterol administrada a los conejos produjo una disminución significativa ($P<0,05$) del porcentaje de reacción acrosómica de los mismos, luego de 6 hs de incubación en medio capacitante adicionado o nó de 80 ug/ml de liso - fosfatidilcolina. Estos resultados apoyan el rol del colesterol como agente rigidizante de las memranas celulares. Datos tendientes a dilucidar si existe un aumento de colesterol en las membranas del gameto masculino o una distribución diferente del mismo están en realización. Como así también incubaciones en medio depletante de colesterol para ver si existen o no diferencias en cuanto a la cinética de la reacción acrosómica.

Financiado por : Proyecto Rockefeller y Proyecto PLACIRH PLI-028/90.

FILAMENTOS DE ACTINA EN ESPERMATOZOIDES DE CRUSTACEOS DECAPODOS.

Dupré, E., *Schatten, G. Laboratorio de Biología de la Reproducción, Universidad Católica del Norte y *Universidad de Wisconsin, Madison, Wi., USA.

Microtúbulos y filamentos de actina se han demostrado en espermatozoides de peneidos y brachiuras. Filamentos de actina se ha descrito en el interior de los brazos de *Libinia emarginata*, en el proceso acicular de los espermatozoides de *Sycionia ingestis* y alrededor de la vesícula acrosómica en *Limulus polifemus*.

El presente estudio muestra la presencia de filamentos de actina en espematozoides de la langosta de Juan Fernández *Jasus frontalis* y del camarón *Orconectes propincus*, mediante fluorescencia indirecta, utilizando los fluorocromos rodamina-faloidina. Los espermatozoides se estudiaron con microscopía confocal y electrónica de barrido de bajo voltage.

El espermatozoide de *O. propincus* presenta un cuerpo esferico con 5-6 brazos, en el que se encuentra el acrosoma en forma de torus cuyo canal central presenta intensa fluorescencia para la rodamina-faloidina. Los brazos estan formados por grupos de filamentos gruesos que se extienden desde el centro del cuerpo. La cromatina no condensada alrededor del acrosoma evidenciada con Hoechst 33258. El espermatozoide de *J. frontalis* presenta un cuerpo esférico y 3-4 brazos filamentosos radiando de él. El cuerpo esta formado por una vesícula acrosómica excéntrica. La fluorescencia de la rodamina es intensa en el interior de la vesícula, la que en visión polar aparece en forma de un engranaje. El Hoechst 33258 revela un compartimento nucleo-citoplasmático sub-acrosómico y que se extiende a los brazos. Fondecyt 495/89.

GLICOPROTEINAS DE LA ZONA PELUCIDA DE HAMSTER COMPROMETIDAS EN FECUNDACION (Hamster zona pellucida glycoprotein involved in fertilization) . Giacaman, A., Melendez, J., Becker, M. I., Barros, C., De Ioannes, A.E. Labs. Inmunología y Embriología, Fac. Ciencias Biol. P. Universidad Católica.

La unión y penetración de la zona pelúcida (zp) por el espermatozoide es un paso crucial en la fecundación de los mamíferos. La zp de ratón esta compuesta por tres glicoproteínas: zp1, zp2 y zp3. Esta última interactúa con componentes de la membrana plamática del espermatozoide desencadenando la reacción acrosómica. Sin embargo, para la mayoría de los mamíferos la función específica de zp2 y zp1 es desconocida.

Se desarrollaron anticuerpos monoclonales (AMC) contra la zp de hamster para caracterizar sus componentes y tratar de entender la acción que acrosina -una enzima acrosomal- ejerce sobre ella.

Se obtuvo un panel de 8 AMC que reconocen epítopos de la zp de hamster. Al estudiar si existe reacción cruzada con otras especies de mamíferos, se encontró que los anticuerpos 2D1 y 2H10 reconocen epítopos presentes en la zp humana y murina, respectivamente. Se estudió el efecto de los AMC en el sistema de fecundación *in vitro* de hamster y se encontró que el anticuerpo 5C8 no afecta la penetración de los espermatozoides a través de la zp; los anticuerpos 7D9, 3F6 y 2H10 la afectan parcialmente y los anticuerpos 4E11 y 2D1 la afectan significativamente.

Los AMC obtenidos serán una valiosa herramienta para disectar a nivel molecular la interacción de gametos en hamster.

Financiado por FONDECYT: 577/89 y 495/89

ESPERMATOGÉNESIS DEL GATO DOMÉSTICO. (Spermatogenesis in the domestic cat). Heyn, R. y Morales, B.A. Depto. Morfología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La espermatogénesis comprende la secuencia de cambios que resultan de la transformación de espermatogonias en espermatozoides. Ha sido descrita en numerosos mamíferos, en los cuales se distingue un nº variable de estados del ciclo del epitelio seminífero. La falta de información al respecto en la especie felina motivó la iniciación del presente estudio.

Se analizaron testículos de gatos adultos; éstos fueron fijados en Bouin alcohólico y teñidos con PAS. En cortes transversales se analizó la existencia de distintas asociaciones celulares, teniendo como base los modelos descritos en rata y armadillo; además, se efectuó un recuento de 100 túbulos por animal para apreciar la frecuencia de tales asociaciones.

El núcleo sertoliano es basal, oval o triangular y de altura variable según el estado del ciclo. Se reconoció toda la secuencia celular entre espermatogonias A PAS+ y espermatozoides.

Las espermatogonias son notorias y variables en nº según el estado. De acuerdo a los cambios experimentados por el núcleo y acrosoma de las espermátidas se pueden reconocer 4 fases y 14 etapas de la espermiogénesis; las primeras 11 permiten clasificar 11 (I-XI) estados del ciclo del epitelio seminífero con asociaciones celulares bien definidas. Los estados más frecuentes corresponden a los de pre- y post-espermiación (V-VI-VII=54%).

La espermiogénesis del gato presenta 14 etapas distintas de modo similar al armadillo. Aún resta caracterizar mejor cada de los estados y determinar la duración de la espermatogénesis felina.

PARTICIPACION DE LOS NERVIOS SIMPATICOS EN LA RECUPERACION DE LA FUNCION OVARICA DESPUES DEL TRANSPLANTE. (*) (Ovarian nerves participation in the recovery of ovarian function after transplantation) Lara HE y Ojeda SR. Depto. Bioq. y Biol. Molecular. Fac. Cs. Químicas y Farmac. U. de Chile (HEL) y Oregon Reg. Primate Res. Ctr. OR USA (SRO).

Una de las dificultades para la aceptación de la participación de los nervios simpáticos en la regulación de la función ovárica ha sido el hecho que al transplantar el ovario, éste se vuelve a desarrollar y recupera la ciclicidad normal. Recientemente encontramos que el ovario contiene y expresa el gen para el factor de crecimiento nervioso (NGF), resultado que abre la posibilidad de que esta recuperación se deba a una reinervación del ovario transplantado, posibilidad que exploramos en este trabajo.

Después del transplante aparece necrosis folicular, pero entre 7-14 días vuelven a aparecer folículos preovulatorios. Estos cambios se correlacionan con la aparición (desde los 7 días) de fibras nerviosas simpáticas que contienen tirosina hidroxilasa y neuropéptido Y, indicando reinervación del ovario. Después de un aumento inicial de los niveles plasmáticos de LH y FSH, estos disminuyen a niveles controles en un tiempo que coincide con la aparición de folículos ováricos y del control de estradiol sobre los niveles de LH. Al eliminar los nervios simpáticos con anticuerpos para NGF encontramos que, junto con impedir el desarrollo de los nervios simpáticos, los niveles de LH y FSH se mantiene altos y el ovario no se desarrolla.

El conjunto de estos resultados dan fuerte evidencia para postular que se necesita una inervación simpática intacta para recuperar la función ovárica después del transplante.

(*) Financiado por NIH: HD24870; RR00163y NSF: BNS 8318017 a SRO y The Rockefeller Foundation y TWAS a HEL.

INTERACCIONES ENTRE EL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO BASICO (bFGF) Y HORMONAS LACTOGENICAS EN CULTIVOS PRIMARIOS MAMARIOS. (Interactions between basic fibroblast growth factor (bFGF) and lactogenic hormones in primary mammary culture).

Lavandero, S., Oka, T., Sapag-Hagar, M.
Depto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas-Universidad de Chile. Lab. Molecular and Cellular Biology, NIDDK, NIH, USA.

El tejido mamario constituye un sistema ideal para estudiar los procesos de diferenciación y proliferación celulares en condiciones fisiológicas bajo la acción coordinada de distintos reguladores.

Sólo en los últimos años se ha indicado la participación de los factores de crecimiento en estos procesos En este contexto hemos iniciado el estudio del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) sobre las células epiteliales mamarias secretoras de ratón. Resultados previos mostraron un gran efecto sobre la proliferación mamaria.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto del bFGF sobre la diferenciación mamaria, utilizando como modelo cultivos primarios de células epiteliales mamarias de ratón (mediana preñez), y las interacciones con hormonas lactogénicas: insulina, prolactina y corticosterona (IPC).

El análisis de los resultados indica que cuando las células se incubaron en forma secuencial,con bFGF y luego con IPC, se logró un aumento significativo de la síntesis proteica total como también de la caseína y su correspondiente RNA mensajero. Sin embargo, la incubación simultánea de la combinación lactogénica con este factor condujo a una inhibición, dependiente de su concentración, de la caseína secretada al medio incubación, e igualmente a una menor cantidad del RNA mensajero para la caseína.

Se concluye que el bFGF estimula la proliferación mamaria dependiendo su acción sobre la diferenciación del desarrollo celular y de su interacción hormonal.

(S.L. es becado de Fundación Andes. FONDECYT 88-0872).

EFECTO DE LA MELATONINA EN LA FUNCION ESTEROIDOGENICA DE CELULAS DE LEYDIG IN VITRO (Melatonin effect in steroidogenic function of rat's leydig cell in vitro).

Moraga, P., Vera, H.*, Ahumada, A.°, Valladares, L.
Unid. de Biología de la Reproducción, INTA, U. de Chile.

Melatonina altera procesos asociados a la reproducción en animales estacionales. Sin embargo, estudios en nuestro Laboratorio han demostrado que esta hormona puede también alterar directamente la función testicular de ratas. Bajo este contexto hemos estudiado el efecto in vitro de melatonina en la esteroidogénesis de células de Leydig en ratas prepúberes. Para conocer el mecanismo por el cual la melatonina altera el efecto estimulatorio de hCG sobre la síntesis de testosterona, células intersticiales de testículo de ratas Wistar entre 35-40 días de edad se incubaron con hCG radioactiva. Melatonina (10^{-7}M) no modificó ni la Kd ($3,9 \pm 0,3 \times 10^{-12}$) ni el número de receptores para gonadotrofina ($3,3 \pm 0,3$ fmoles/10^6 células de Leydig). Al incubar las células con pregnenolola radioactiva, se encontró, al separar y caracterizar los diferentes intermediarios metabólicos, que melatonina inhibiría la conversión de 17 OH-Progesterona a testosterona. Por otra parte al estudiar el efecto de diversos precursores y análogos metabólicos de melatonina (N-acetilserotonina, serotonina) se observa que la acción inhibitoria de ellos se logra a concentraciones muy por sobre las obtenidas con melatonina.
Estos resultados sugieren que melatonina, en forma específica y dependiendo del desarrollo sexual del animal, inhibe las últimas etapas de la síntesis de testosterona.

* Becado de la Fundación Andes. Financiado por FONDECYT N°1024-89, y DTI, U. de Chile B-2531-89.

° Becado de Conicyt

EFECTO DE FSH Y TESTOSTERONA EN TESTÍCULO DE RATA TRATADA CON CITRATO DE CLOMIFENO DESDE EL NACIMIENTO. (FSH and Testosterone effect on testis of clomifen-treated rats from birth).

Morales, B.A.; Barriga, M.; Palazuelos, O.; Pineda, P. y Zamora, C. Depto. Morfología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La actividad testicular depende de un fino juego endocrino (FSH-LH y Testosterona) y paracrino entre las células somáticas y germinales. La administración de Citrato de Clomifeno(CC) desde el nacimiento hasta los 45ds de edad produce atrofia testicular, quedando los túbulos seminíferos con células de Sertoli y gonias. Como una manera de apreciar el efecto hormonal sobre la espermatogénesis(E) se administró a estos animales FSH y/o Testosterona(T).
Machos tratados por 45ds con CC se distribuyeron en 4 grupos:Control(CC), CC+FSH, CC+T y CC+FSH+T. A los 21ds de tratamiento se sacrificaron, disecándose el tracto reproductivo; éste fue pesado y fijado para M.O. En cortes transversales testiculares se determinó diámetro tubular, altura del epitelio seminífero y avance de la E.
Eos grupos CC y CC+FSH son significativamente menores en peso y tamaño respecto a los CC+T y CC+T+FSH. Estos últimos presentan los mayores valòres en todos los parámetros estudiados. Los animales con CC tienen sólo Sertoli y gonias;con FSH aumenta considerablemente el nº de gonias y con T avanza hasta espermátida ovalada.
La proliferación gonial en las gónadas tratadas con FSH y/o T implica la presencia de un factor mitogénico estimulable por ambas. El sinergismo FSH-T hace posible una mayor proliferación gonial. La existencia de varios mitógenos sertolianos sugeriría un mecanismo paracrino en la proliferación gonial.

POTENCIAL FECUNDANTE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS CON PERCOLL Y SWIM-UP (Fertilizing ability of sperm selected by Percoll and Swim-Up). Morales P., Vantman D., Barros C., y Vigil P. Unidad de Reproducción y Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Se han usado diversas técnicas para seleccionar espermatozoides móviles, entre ellas gradientes de albúmina y de Percoll (P), "swim-up" (S-U) y filtración en lana de vidrio. La característica mas deseable de los métodos de separación espermática es obtener una alta recuperación de células con motilidad progresiva. Otra consideración tanto o más importante es la funcionalidad de las células recuperadas con estas técnicas. En este estudio, hemos comparado dos métodos de separación de células mótiles, S-U y P. En este estudio.se usaron muestras de semen de 12 hombres. Cada muestra se dividió en dos alícuotas que fueron procesadas con S-U y P, usando medio de cultivo Tyrode modificado. Para cada técnica se determinó la cantidad de espermatozoides recuperados y el porcentaje de células con motilidad progresiva III-IV. Posteriormente, se ajustó la concentración espermática a $1x10^7$ cels./ml. Las suspensiones espermáticas se incubaron a 37 °C, en una atmósfera de 5 % CO_2 en aire. Los espermatozoides seleccionados con estas técnicas fueron evaluados con los siguientes bioensayos: cinética de reacción acrosómica (espontánea e inducida por fluído folicular humano), penetración a ovocitos de hamster sin zona pelúcida y unión a la zona pelúcida humana. Los resultados obtenidos indicaron que el porcentaje de espermatozoides recuperados fue mayor con P que con S-U ($P<0.001$). Sin embargo, no se detectó diferencias significativas entre estas dos poblaciones en el porcentaje de reacción acrosómica o en la penetración de ovocitos de hamster sin zona. Además, el número de espermatozoides unidos por zona pelúcida humana fue similar entre estos dos grupos. Se concluye que no existen diferencias funcionales entre espermatozoides seleccionados con P vs S-U.

RELACION ENTRE LOS CAMBIOS DE CONCENTRACION DE LA GLOBULINA LIGANTE DE ESTEROIDES SEXUALES Y DE LEVONORGESTREL (Sex Hormone Binding Globulin regulates levonorgestrel levels in Norplant^R users). G. Noé. Instituto Chileno de Medicina Reproductiva.

En este trabajo se examinó la influencia de la Globulina Ligante de Esteroides Sexuales (SHBG) sobre la concentración plasmática de levonorgestrel (L-Ng) en mujeres que usan Norplant^R, implante subdérmico que libera 95 nmol de L-Ng al día. Dos fueron los objetivos principales: establecer si la acción antagónica de etinilestradiol (EE_2) sobre L-Ng, necesaria en determinadas situaciones clínicas, es por retención del progestágeno en el plasma; y describir la dinámica de los cambios en la concentración de L-Ng en función de los niveles de SHBG en un sistema en que la producción del ligando es constante.

Diez mujeres se trataron con EE_2 50 ug/diario por 10 días. Se tomaron muestras seriadas de sangre para determinar la concentración de SHBG, L-Ng y otros ligandos endógenos (E_2, T, DHT). El EE_2 produjo un aumento significativo (4 a 5 veces) de la SHBG, paralelamente la concentración de L-Ng total y la fracción unida a glicoproteínas aumentaron de 0.91 a 5.97 nmol/l y de 0.73 a 4.42 nmol/l respectivamente. Esto se observó del mismo modo cuando los ligandos endógenos aumentaron, disminuyeron o no variaron lo que indica que no interfirieron en la unión de L-Ng a SHBG. A pesar del gran aumento de SHBG la fracción de L-Ng libre se mantuvo constante, lo que sugiere que el antagonismo entre EE_2 y L-Ng se produce sólo a nivel tisular. No habiendo interferencia de esteoríde endógenos se concluye que la relación temporal y cuantitativa entre los cambios de la concentración de SHBG y L-Ng corresponden al comportamiento de un sistema en que el clearance metabólico es la variable principal.

LOCALIZACION DE MICROFILAMENTOS Y PROTEINAS SIMILARES A TUBULINA EN ESPERMATOZOIDES DE *Rhynchocinetes typus*. (Localization of microfilaments and tubulin-like proteins in *Rhynchocinetes typus* spermatozoon). Pérez, C., Roco, M., Castro, A., Dupré, E., Schatten, G. y Barros, C. Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La apertura de los brazoz del espermatozoide de *R. typus* al tomar contacto con el agua de mar es uno de los cambios morfológicos que sufre este espermatozoide en el proceso de interacción gamética, el cual por su complejidad podría estar involucrando elementos del citoesqueleto. Mediante el uso de Faloidina-FITC fué posible reconocer la presencia de microfilamentos de actina tanto en los brazos como espinas radiales de los espermatozoides de *R. typus* no así en el proceso acicular ni la membrana interbrazos. Por otra parte utilizando anticuerpos policlonales anti tubulina y monoclonales anti alfa-tubulina fué posible observar la existencia de proteinas similares a tubulina las que presentan el mismo patrón de marcación presentado por los microfilamentos de actina. La transferencia a nitrocelulosa de las proteinas del espermatozoide reveló la existencia de dos proteinas de 97 kD y 120 kD que son reconocidas por los anticuerpos antitubulina. Variaciones en los procedimientos de extracción de las proteinas no variaron la migración de las proteinas reconocidas por los anticuerpos antitubulina. Estos resultados demuestran la existencia de actina en estructuras que participan en los cambios morfológicos del espermatozoide. La función de las proteinas similares a tubulina debe aún ser investigado. Financiado por GAPS 8710 Fundación Rockefeller y Proyecto Fondecyt 495/89.

EFECTO DE Zn^{++} "IN VITRO" SOBRE LA MOTILIDAD Y REACCION ACROSOMICA DE ESPERMATOZOIDE HUMANO. Riffo, M. y Leiva, S. Depto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El espermatozoide de mamífero fecunda al ovocito cuando adquiere una motilidad progresiva, se capacita y experimenta la reacción acrosómica. En la inducción de estos procesos participan una serie de factores endógenos y exógenos, estos últimos presentes tanto en el tracto genital masculino como femenino. El Zn^{++} uno de los elementos traza que se encuentra en altas concentraciones en el semen humano, seria necesario en la regulación enzimática de la cual depende la función espermática. Este estudio se realizó con el objeto de analizar el efecto del Zn^{++} como un factor exógeno en la motilidad y la reacción acrosómica. Espermatozoides eyaculados fueron lavados y separados por columna de perlas de vidrio, luego de ajustar la concentración a $10x10^6$ cel/ml, se incubaron en un medio de capacitación "in vitro"por determinados periodos de tiempo, bajo diferentes concentraciones de Zn^{++}. Las incubaciones se realizaron a 37°C en una atmósfera humificada de 5% CO_2/95% aire. Luego de 2, 4 y 6 h, se evaluó motilidad, vitalidad (test eosina) y reacción acrosómica (Triple tinción). Las suspensiones de espermatozoides incubados en presencia de Zn^{++} presentaron inhibición de la motilidad (grados III y IV) y de la reacción acrosómica, en relación al control (adición de PBS). Estos datos indican que el Zn^{++} ejercería un efecto inhibitorio de la motilidad, y cuyo bloqueo sería preferentemente a nivel mitocondrial o a eventos asociados a las estructuras del flagelo. Se sugiere que es el Zn^{++} espermático y no el del plasma seminal el relacionado directamente con la motilidad; la reacción acrosómica se inhibe de manera dosis dependiente, donde el Zn^{++} estaría bloqueando algún evento propio de la capacitación y/o reacción acrosómica, como sería la inactivación de algunas enzimas que esten relacionadas directa o indirectamente en estos procesos. (Proyecto B-2687-8823 D.T.I., U. de Chile).

REGULACION DE LA PROLIFERACION DEL EPITELIO SEMINIFERO, EN RATON ADULTO : CHALONAS, FSH Y T.

Rodríguez, H. y E. Bustos-Obregón
Depto. Biología Celular y Genética, Fac. Med. Div. Norte, U. de Chile, Santiago y Depto. Cs. Biológicas, Fac. Rec. Naturales, Univ. de Talca, Talca. Chile.

La proliferación del epitelio seminífero se regula por factores paracrinos testiculares y hormonas gonadotróficas y esteroidales. Se propone estudiar los efectos de las Chalonas (Ch) testiculares como factor inhibidor de la proliferación gonial y los efectos de la administración de distintas dosis de FSH y T, evaluando los posibles cambios en la síntesis de ADN testicular y los niveles circulantes de FSH y T.

Se usaron 80 ratones machos de cepa ASnell, con edades entre 2,5 a 3 meses y pesos entre 18 a 34 grs. Los animales fueron irradiados localmente al escroto con 300 r y luego de 7 días, sometidos a inyecciones de FSH y T cada 24 horas y de Ch cada 12 hrs, por un período de 5 días. El esquema experimental fue el siguiente : Control PBS; T; Ch: 5: 10 y 15 UIFSH; 5 UIFSH + T; 10 UIFSH + T; 15 UIFSH + T; 5 UIFSH + Ch; 10 UIFSH + T y 15 UIFSH + Ch. Luego los animales son sacrificados por dislocación cervical. Dos horas antes del sacrificio, los animales se inyectan con timidina tritiada (2 µCi/gr).

El extracto testicular inhibió la síntesis de ADN testicular en un 74%, lo que sólo es revertido por altas dosis de FSH (15 UI). La administración de T, implicó una drástica caída en los niveles séricos de FSH (2,5 ng/100 µl), sin alterar la síntesis de ADN testicular. La administración de FSH, hizo disminuir los niveles circulantes de T, a valores cercanos al 50% del control, sin que la proliferación gonial se alterara. Aparentemente, los niveles requeridos de FSH y T intratesticular para la proliferación gonial serían menores que los valores circulantes normales.

(Proyecto FONDECYT 948/90).

EFECTO DEL TRATAMIENTO POSTNATAL DE ANDROGENOS Y ANTIANDROGENOS SOBRE EL DESARROLLO DEL PENE EN *Octodon degus* (Rodentia)

Rojas M.A., Morales B., Grandón P., Spotorno A., Deptos. de Morfología Experimental y Biología Celular y Genética. Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

Se ha descrito en roedores silvestres de América del Sur una serie de complejas adaptaciones del pene destinadas a asegurar el éxito reproductivo en esas especies: no obstante, existe un grupo de cricétidos que han evolucionado con simplificación del báculo, lo cual se ha interpretado como el resultado de un retardo en el inicio de la secreción de testosterona postnatal. Nos interesó modificar experimentalmente el inicio de la secreción de andrógenos en un roedor caviomorfo de pene complejo e inducir cambios en la expresión de caracteres peneanos específicos.

Se utilizó 36 machos *O. degus* de 18 días, 3 meses y 6 meses los cuales fueron tratados diariamente con Enantato de Testosterona 5 mg por animal cada 4 días, un grupo y Flutamide 25 mg/kg peso corporal el otro grupo durante 21 días: se sacrificaron, se realizó disección del pene y se procesó este material con técnicas histológicas. Se trabajo además con un grupo de 15 animales como control.

En los animales controles se desarrolló un pene con hueso esponjoso y compacto, externamente se formaron espinas córneas, las cuales, también se observaron en el interior del saco intromitente. En los tratados con testosterona se evidenció un aumento de tamaño de las espinas córneas, las cuales alcanzaron en el saco intromitente características de espículas. En el grupo tratado con flutamide no se observa diferencias significativas.

Debido a que las espinas del saco intromitente, son susceptibles de transformarse en espículas o en estructuras muy similares, durante el desarrollo postnatal se concluye que los andrógenos pueden generar cambios en las características específicas del pene de este roedor caviomorfo.

Proyecto Fondecyt 88-1013

PRODUCCION DE ESTRADIOL EN CULTIVO CELULAR CONTINUO DE GRANULOSA HUMANA. EFECTO DE FSH.

Romero,C., Sepúlveda, M., Piñones, E., León, J., Luna, L., Cavieres, R. Laboratorio Bioquímica, Dep. Obstetricia y Ginecología, Hospital Clínico U. de Chile, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, U. de Chile.

Actualmente contamos con un cultivo celular contínuo de células de la granulosa humana, las cuales están en la generación 43. El objetivo de este trabajo fue el de obtener una línea celular de células de granulosa humana con el propósito de estudiar el efecto de diferentes factores en la esteroidogénesis, y cuyas muestras fueran fáciles de obtener y que cumplieran con los requisitos de las células "in vivo". Es así, como las células de este cultivo contínuo, tiene la capacidad de producir estradiol mediante la incubación de dos horas en medio de cultivo M-199 y F-12 D a 37ºC, en atmósfera de 95% de O2 y 5% de CO2 en presencia de testosterona a una concentración de 10-6M y 10-7M.

La producción de estradiol aumenta en presencia de FSH, a una concentración de 3 UI/L (concentración máxima encontrada en líquido folicular de folículos preovulatorios de mujeres con ciclos espontáneos). dicha producción se ve incrementada cuando las células se preincuban con 20 UI/L de LH (concentración máxima encontrada en líquido folicular de folículos preovulatorios de mujeres con ciclos espontáneos). Paralelamente, se encontró que el aumento en la producción de estradiol por efecto de FSH es dosis dependiente; Por otra parte, se encontró que existía unión específica a FSH radioactiva.

Estos resultados preliminares demuestran que el cultivo contínuo de células de granulosa humana tienen receptores a FSH, y podría ser un sistema ideal para el desarrollo de un bioensayo "in vitro" para FSH.

PRODUCCION Y CAPACIDAD RECEPTORA PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO I ANALOGO A LA INSULINA (IGF-I) EN LA GLANDULA MAMARIA DE RATA. (Production and binding of Insulin like growth factor I in rat mammary gland).

Santibáñez, J.F., Lavandero, S., Ocaranza, M.P., Ferreira, A.* y Sapag-Hagar, M.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
* Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Universidad de Chile.

Recientes trabajos de nuestro Laboratorio han indicado que el factor de crecimiento de tipo I análogo a la Insulina (IGF-I) produce importantes acciones metabólicas y mitogénicas en la glándula mamaria de rata. También hemos descrito la presencia de receptores funcionales para este factor en el tejido mamario. Puesto que se ha indicado que un gran número de tejidos y células pueden sintetizarlo en forma paracrina y/o autocrina, decidimos evaluar la capacidad de la glándula para producirlo y correlacionar sus niveles con sus receptores durante el ciclo lactogénico de la rata.

Los resultados mostraron que los explantes mamarios producen IGF-I, medido por radioinmunoensayo en el medio de incubación, y que su síntesis y secreción disminuye apreciablemente por acción de la cicloheximida. También se observó una correlación inversa entre la producción autocrina y/o paracrina del IGF-I y la capacidad de unión en la glándula mamaria de rata, pues la mayor sensibilidad de ésta para el factor se manifiesta en los primeros días de gestación, período en que su síntesis fue menor.

Se concluye que el tejido mamario produce IGF-I por un mecanismo paracrino y/o autocrino y que sus niveles y la capacidad receptora para el IGF-I dependen de la etapa del desarrollo tisular.

(S.L. es becado de Fundación Andes. FONDECYT 88-0872).

IDENTIFICACION DE COMPONENTES ESPECIFICOS DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO INVOLUCRADOS EN FECUNDACION (Identification of specific components of human sperm involved in fertilization).

Vera, H.*, Becker, M. I., De Ioannes, A. Unidad de Inmunología, Fac. Cs. Biol., P. Universidad Católica de Chile.

En las primeras etapas de la fecundación se producen interacciones donde participan moléculas localizadas tanto a nivel de la zona pelúcida y la membrana plasmática del ovocito como en la superficie espermática. En los últimos años se ha acumulado información sobre los mecanismos que participan en la fecundación de roedores, pero aún se sabe poco sobre los que participan en humanos, es así como se conocen pocos antígenos espermáticos humanos involucrados en la fecundación. La comprensión de estos mecanismos en la especie humana permitirá entender la etiología de algunos tipos de infertilidad y desarrollar métodos que permitan regularla.

Con el propósito de identificar componentes específicos de la superficie de espermatozoides humanos, se produjeron anticuerpos policlonales en conejos, mediante protocolos de inmunización con extractos de testículo y solubilizado de espermatozoides humanos. La evaluación de la respuesta de los animales se determinó cuantitativamente por ELISA, la que indicó un alto título contra espermatozoides humanos completos; la localización de los antígenos reconocidos por estos anticuerpos se estudió por inmunofluorescencia indirecta e indicó la presencia de anticuerpos dirigidos preferentemente contra la región acrosomal y la pieza media del espermatozoide; por último, los sueros se caracterizaron por sus propiedades inmunoquímicas mediante Western Blot con solubilizados de espermatozoides humanos y se demostró la presencia de seis bandas de alto peso molecular inmunodominantes, presentes en los dos animales inmunizados.

Los resultados obtenidos con estos sueros nos permitirán identificar componentes de la superficie del espermatozoide humano involucrados en el proceso de fecundación humana.

Financiado por Proyecto FONDECYT N° 0577
* Becado de la Fundación Andes.

MIGRACION ESPERMATICA EN MOCO POST PARTO (Sperm migration into post partum cervical mucus).

Vigil, P., Riquelme, R., Uribe, L., y Morales, P.
Unidad de Reproducción y Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

El moco cervical es secretado por las células cilíndricas localizadas en el canal cervical, y sus características reológicas varían en respuesta a las fluctuaciones en los niveles de estradiol (E_2) y progesterona (P) durante el ciclo menstrual. Estos cambios en el moco cervical han sido utilizados para definir los períodos de fertilidad e infertilidad de la mujer, y por lo tanto de la pareja humana. Durante la lactancia, ocurre una condición de "inactividad ovárica", caracterizada por niveles bajos de las hormonas ováricas E_2 y P, con un aumento de la hormona hipofisiaria prolactina. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el score y penetración espermática a moco cervical post-parto, de acuerdo a los parámetros establecidos por la OMS, en mujeres en amenorrea y lactancia exclusiva. Además, se efectuaron estudios ultraestructurales con microscopía electrónica de barrido del moco post-parto. A 54 mujeres se tomó muestras de moco cervical a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días post parto. Como control en los experimentos de migración espermática se utilizaron muestras de moco periovulatorio obtenido de seis mujeres ciclando regularmente. La cantidad promedio de moco cervical obtenido durante el período post parto fue de 93±13 µl. Veinte y una (39%) de las 54 muestras obtenidas durante los intervalos post parto en estudio dieron una prueba de migración espermática positiva. Se observó migración espermática al moco cervical en todos los intervalos post parto en estudio. La cristalización en forma de hojas de helecho fue el único parámetro individual del moco cervical que se correlacionó con la migración espermática. Existió una correlación positiva ($P<0.01$) entre score cervical y migración espermática. Se obtuvo migración espermática positiva en todas las muestras de moco con score superior a 8, sin embargo también se observó migración espermática en muestras con score entre 2 y 7. Los estudios ultraestructurales mostraron la apariencia esponjosa característica del moco periovulatorio. El moco post parto impenetrable por los espermatozoides estaba formado por una densa red macromolecular semejante en apariencia a una roca. El moco penetrable por los espermatozoides presentaba areas de consistencia esponjosa entremezcladas con areas de alta celularidad y apariencia rocosa.