137

MORFOMETRIA DEL NERVIO OPTICO DE RATAS KV. (Morphometry of optic nerves of KV rats).

Margozzini, P. y Carvallo, C. Unidad de Neurobiología Molecular, P. Universidad Católica. Santiago. (Patrocinio: Jaime Alvarez).

La cepa de ratas Sprague-Dawley KV presenta una alteración del metabolismo de la glucosa y malformaciones del sistema óptico (anoftalmia, monoftalmia y microftalmia). En esta cepa se realizó un estudio morfométrico del nervio óptico.

En ratas KV bioftálmicas (aparentemente normales) tanto al área de sección de los nervios como la población axonal fueron semejantes a los controles, en cambio, en las microftálmicas y monoftálmicas fueron significativamente menores. Sin embargo, los axones de estos nervios eran normales en cuanto a distribución de calibres y contenido microtubular. La disminución del tamaño del nervio es debido a una reducción de la población axonal.

La malformación oftálmica de las ratas KV presenta graduación entre individuos, y dentro del mismo individuo (monoftalmia). Esto sugiere que la expresión de la perturbación genética debe variar cuantitativamente incluso dentro del mismo individuo. La disminución del número de axones sugiere que una alteración del desarrollo impide la formación de neuronas o que hay una eliminación exagerada en etapas posteriores. La conservación de los calibres y ultraestructura de los axones sugiere que la reducción de la población es un fenómeno aleatorio y que las neuronas que sobreviven no presentan alteraciones residuales detectables. Finalmente, la asimetría observada sugiere la existencia de factores locales.

138

ESTUDIOS INMUNOCITOQUIMICOS DE ANF Y TUMORIGENICIDAD EN UNA LINEA CLONAL DE AURICULA. (ANF-inmunocytochemical and tumorigenesis studies on auricular clonal cells).

Cáceres, J., y Vargas, F. Depto. de Biología, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso y Depto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Los factores natriuréticos auriculares (ANFs) representan una familia de péptidos con potentes propiedades natriuréticas, diuréticas y vasorrelajantes. El péptido precursor es sintetizado y almacenado en gránulos secretores de los miocitos cardíacos.

Bajo la acción de factores aún no caracterizados presentes en medios condicionados de células tumorales de tiroides de rata, se obtuvieron células transformadas. Técnicas de marcación inmunocitoquímicas revelan propiedades miohistotípicas en células clonadas las cuales producen rabdomiosarcoma en animales isogénicos.

Medios con 1% de suero bovino y/o diferentes hormonas a concentraciones fisiológicas no producen variaciones importantes en el patrón inmunocitoquímico de almacenamiento para ANF.

Financiado por Proyecto Conicyt 91-1305.

REPRODUCCION Y DESARROLLO

139

ORGANOGENESIS TESTICULAR EN HAMSTER DORADO. (Testicular organogenesis in golden hamster).

Glisser, E., Cury, M., * Arrau, J., Guzmán, F. Depto.Cs. Biológicas, Div.Occidente, Fac. Med., U. de Chile. * Biología de la Reproducción y Desarrollo, Fac.Med. U. Valparaíso.

Para que la gónada se desarrolle y se organice, es necesario que las células germinales que la colonizan se asocien a células somáticas. Esta asociación es de gran importancia para que se realicen los eventos biológicos involucrados en la organización y diferenciación gonadal. Respecto al origen de las células somáticas existe gran controversia. En los últimos años se ha considerado al mesonefros como el órgano clave involucrado en los procesos del desarrollo gonadal.

En este trabajo se estudió la participación de los cordones mesonéfricos y epitelio celómico en la constitución de la gónada macho de hamster dorado entre los 11 y 14 días post coito (p.c.). De cada individuo se separó la asociación gónada mesonefros, se fijaron en glutaraldehído 2,5%, post fijaron en Os O4 e incluyeron en Epon 812. Se realizaron cortes de 1 um y se tiñeron por flotación en Azul de Toluidina-Borax.

A los 11 días p.c.: se observó aparente organización cordonal. Migración de células del epitelio gonadal y de cordones mesonéfricos al interior de la gónada. 12 días p.c.: estructura cordonal heterogénea tridimensional con células germinales en su interior, abundantes vasos en el intersticio. Se inicia una separación entre corteza y médula. Disminuye la penetración de células epiteliales y mesonéfricas. 13 días p.c.: cordones seminíferos y albugínea testicular bien definidos. Aparición de células basófilas de 25 um de diámetro, de aspecto epitelioídeo en el intersticio periférico. 14 días p.c.: migración de las células antes indicadas y ubicación de ellas en el intersticio cordonal.

En esta especie hay aporte de células somáticas desde los cordones mesonéfricos y epitelio gonadal, lo que ocurre cronológicamente en el mismo período del desarrollo.

140

ES LA INFANCIA UN PERIODO DE REPOSO TESTICULAR ? (Does childhood corresponds to testicular rest ?)

Rey, R., Naqle, C, y Chemes, H. CEDIE (Hospital de Niños R. Gutierrez) y CEMIC, Buenos Aires, Argentina.

El periodo infantil ha sido clásicamente caracterizado como una etapa de quiescencia en el desarrollo testicular. Nosotros hemos estudiado por métodos estereológicos los cambios histológicos testiculares entre el nacimiento y el comienzo de la pubertad en tres grupos de monos Cebus : G_1 representó el periodo neonatal; G_2, la infancia y G_3, el comienzo de pubertad. El diámetro tubular (µm) fue en G_1 = 70.3 ± 15.3, G_2 = 70.3 ± 4.0 y G_3 = 78.1 ± 9.2; la densidad de volumen de los tubos seminíferos (%) : G_1 = 40.9 ± 5.2, G_2 = 46.7 ± 9.1 y G_3 = 60.0 ± 6.2; el número de células de Sertoli por sección tubular transversal : G_1 = 5.3 ± 1.4, G_2 = 5.3 ± 1.4, G_3 = 4.2 ± 0.3 y el número de células germinales por sección : G_1 = 10.9 ± 1.6, G_2 = 8.4 ± 3.4, G_3 = 22.7 ± 3.9. En todas estas variables no se ven cambios significativos durante la infancia. En cambio, el Volumen Testicular (VT, en ml) fue : G_1 = 0.04 ± 0.05, G_2 = 0.16 ± 0.04, G_3 = 0.25 ± 0.05; el Volumen Absoluto de los Tubos Seminíferos (VATS, en ml) : G_1 = 0.016 ± 0.020, G_2 = 0.073 ± 0.020 y G_3 = 0.150 ± 0.030; el Volumen Absoluto de Células Germinales (VACG, en ml) : G_1 = 0.002 ± 0.002, G_2 = 0.006 ± 0.003, G_3 = 0.033 ± 0.005; el Número de Células Germinales por Testículo (CGxT, en millones) : G_1 = 1.5 ± 0.3, G_2 = 5.0 ± 2.2, G_3 = 37.2 ± 7.5; el Volumen Absoluto de Células de Sertoli (VASC, en ml) : G_1 = 0.014 ± 0.011, G_2 = 0.067 ± 0.013, G_3 = 0.117 ± 0.015; el Número de Células de Sertoli por Testículo (CSxT, en millones) : G_1 = 18.2 ± 18.8, G_2 = 81.0 ± 31.4, G_3 = 100.5 ± 18.7 y la Longitud Tubular (LT, en mts.) : G_1 = 6.7 ± 7.0, G_2 = 22.9 ± 4.9, G_3 = 38.9 ± 9.6. En conclusión, si bien algunas variables no sufren modificaciones durante la infancia, el aumento en VT, VATS, LT y número y volumen absoluto de las células de Sertoli y germinales reflejan una importante actividad proliferativa en las células del tubo seminífero durante el periodo infantil que constituye un requisito preparatorio esencial para un desarrollo puberal posterior, indicando asimismo que la infancia es un periodo de activa diferenciación y crecimiento testicular.

141

ESTUDIO MORFOMETRICO Y FUNCIONAL DE LAS CELULAS DE LEYDIG EN TESTICULOS DE MONOS CEBUS DESDE EL NACIMIENTO HASTA EL FIN DE LA PUBERTAD (Morphometric and functional analysis of Leydig cells in Cebus from birth till the end of puberty). Rey, R., Ayuso, S., Campo, S., Nagle, C. y Chemes, H. CEDIE (Hospital de Niños R. Gutierrez) y CEMIC, Buenos Aires, Argentina.

Nuestro objetivo fue estudiar los cambios histológicos cuantitativos y funcionales que ocurren en la población leydigiana durante el desarrollo infanto-puberal del mono Cebus. 18 animales fueron divididos en 4 grupos : G_1=período neonatal, G_2=período infantil, G_3=comienzo de pubertad y G_4=fin de pubertad. El estudio morfométrico fue realizado aplicando técnicas estereológicas sobre secciones semifinas, en las que se evaluó : el volumen ocupado por el intersticio leydigiano (VAIL), el número total de células de Leydig por testículo (CLT), la relación entre número de células de Leydig maduras y células de Leydig inmaduras (CLM/CLI) y el volumen celular medio de las células de Leydig (VCM). La capacidad esteroidogénica fue analizada en incubaciones de tejido in vitro, determinándose las concentraciones tisulares de pregnenolona (P_5), dehidroepiandrosterona (DHEA), progesterona (P_4), androstenediona (A), testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT) y 3-alfa-androstenodiol (Diol). Se evaluó : la vía metábolica preferencial a través de la relación P_5+DHEA/P_4+A; la eficiencia de la biosintesis de T : T/P_5+DHEA y la metabolización a productos 5-alfa--reducidos : DHT+Diol/T.

	G_1	G_2	G_3	G_4
VAIL (mm^3)	13 ± 12	43 ± 9	52 ± 12	128 ± 42
CLT ($x10^6$)	11 ± 10	36 ± 13	62 ± 9	84 ± 27
CLM : CLI	1 : 7,7	1 : 7,1	1 : 10	1 : 3,7
VCM (μm^3)	821 ± 208	957 ± 61	766 ± 164	1175 ± 105
P_5+DHEA/P_4+A	9,9	16 ± 12	7 ± 0,7	3,6 ± 1,5
T/P_5+DHEA	0.4	0,6 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,4
DHT+Diol/T	0,4	0,54 ± 0,3	0,15 ± 0,03	0,12 ± 0,02

Conclusión : el volumen ocupado por las células de Leydig aumenta en los períodos neonatal y durante la pubertad debido a un incremento continuo en CLT y a un aumento de VCM en la pubertad. La vía preferencialmente utilizada es la delta-5 a lo largo de todo el desarrollo, la eficiencia máxima en la producción de T es lograda tempranamente en el desarrollo puberal y la metabolización a productos 5-alfa-reducidos es baja, más aún luego del comienzo de la pubertad.

142

ANALISIS DE LA SECRECION DE PROGESTERONA EN CELULAS DE LEYDIG DE RATA. ENDOCRINOLOGIA DE CELULAS INDIVIDUALES. (Analysis of progesterone secretion from rat Leydig cells Single-cell endocrinology). Inostroza, H. y Pino, A.M. Unidad de Biología de la Reproducción, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. (Patrocinio: L.E. Valladares).

En la rata macho madura, la producción de esteroides proviene principalmente de la actividad de las células de Leydig. Anteriormente, estudiamos la actividad secretora de testosterona (T), el principal esteroide sintetizado, mediante una técnica que permite detectar la secreción de células individuales. A través de esta técnica, el ensayo de placa hemolítica reversa (EPHR) nos interesamos ahora en caracterizar la secreción de progesterona (P) desde células individuales de una población purificada de células de Leydig. Las células de Leydig purificadas desde testículos de ratas maduras fueron co-incubadas con eritrocitos de cordero cubiertos con proteína A en cámaras de reacción cubiertas con poli-l-lisina. El medio de incubación contenía hCG (25 ui/ml) o segundos mensajeros para la acción hormonal, sustratos esteroidogénicos si es que corresponde y antisuero anti-P de alta especificidad (WHO). Luego del tiempo de incubación se agregó complemento (suero de conejo) para promover la lisis de los eritrocitos que han reaccionado con el anticuerpo unido a la P secretada por las células. Las células secretoras, se reconocen por el halo de lisis (placa) que las rodea. Se determinó que la formación de placas de lisis y su tamaño dependen del tiempo de incubación; a los 90 min. obtuvimos una respuesta máxima. Los resultados muestran que solo un 36,9% de las células secretan P como respuesta a la gonadotrofina o a AMPc. Se concluye que la población de células de Leydig tiene una capacidad heterogénea para secretar P; parámetros morfométricos de la subpoblación de células secretoras pueden relacionarse con esta actividad influídas por factores de regulación local.

Financiado proyecto FONDECYT Nº973-88.y UCH 30-91.

143

CUANTIFICACION CITOFOTOMETRICA DE LA ENZIMA 3-ß HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA (3ß-HED) EN CELULAS DE LEYDIG DE RATA. (Cytophotometric quantification of 3ß HSD activity in rat Leydig cells). Contreras, H.* y Ronco, A.M.. Dpto. Biología Celular y Genética, Fac. de Medicina, U. de Chile* y L. de Biología de la Reproducción, INTA, U. de Chile. (Patrocinio: L. Valladares).

Una de las enzimas claves en la producción de testosterona por las células de Leydig es la 3ß-HED, que convierte pregnenolona en progesterona en la membrana microsomal. El presente trabajo pretende cuantificar la actividad enzimática 3ß-HED mediante la utilización de una técnica citofotométrica que permite correlacionar el grado de tinción con la actividad enzimática intracelular.

Las células de Leydig de ratas adultas (60-70 días) fueron purificadas en una gradiente contínua de Percoll (10-80%) y posteriormente incubadas durante 1 h a 34ºC con la solución de tinción específica para la 3ß-HED. Las células así tratadas fueron lavadas y fijadas en formaldehído-ácido acético (3:1) y montadas en portaobjetos para su posterior observación y determinación de la D.O. de células individuales.

Nuestros resultados demuestran la existencia de una gran heterogeneidad del tamaño celular que se relaciona directamente con la actividad enzimática 3ß-HED presente. Mediante este criterio, se establecieron dos poblaciones celulares de diferente tamaño y propiedades densitométricas. Un 20-25% de las células tiene un tamaño mayor (630um a.s.) y una mayor D.O. y un 75-80% presentan un tamaño menor (400um a.s.) y una D.O. menor.

Este modelo experimental nos permitió evaluar el efecto de agentes que participan en el proceso esteroidogénico y que pudiesen estar afectando la actividad 3ß-HED.

Financiado por FONDECYT 1024-89

144

EFECTO DE hCG SOBRE LOS MASTOCITOS TESTICULARES. (Effect of hCG on testicular mast cells). Morales,B.A. y Heyn, R Depto. Morfología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 2988 Correo 1, Santiago.

El mastocito es una célula que cumple un importante rol en los cambios vasculares del proceso inflamatorio. Se ha observado degranulación de mastocitos perivasculares en la glándula adrenal por efecto de ACTH y en ovario por el peak ovulatorio de LH.

La administración de hCG/LH en el macho produce un aumento de la permeabilidad vascular testicular en un proceso de tipo inflamatorio.

Nos interesó estudiar el efecto de diferentes dosis de hCG sobre los mastocitos testiculares periarteriales.

Se distribuyeron ratas Donjou, machos y adultos, en grupos de 5 animales que recibieron distintas dosis de hCG: 0 (control)-50UI,100UI y 200UI. A las 6h posthCG se les inyectó tinta china IV en la cola. Fueron sacrificados a las 6,24 y 48h más tarde. Los testículos fueron diseca - dos, pesados y fijados para M.O. En cortes longitudina - les se observó la presencia de tinta china extravasada y se realizó un recuento de los mastocitos periarteriales, así como el estado funcional de sus gránulos.

Los testículos de los animales tratados con hCG presen - tan un mayor peso. Todos los animales tratados evidencia ron tinta china en el extravascular, indicando un aumento en la permeabilidad vascular. Se observó una disminución por degranulación del nº de mastocitos a las 6 y 24 h posthCG, no encontrándose diferencias a las 48h con respecto al Control.

La evidencia de degranulación mastocitaria por hCG es un efecto similar al observado en adrenal por ACTH y en ovario por LH. La ausencia de diferencias en el recuento de mastocitos a las 48h se debería al proceso normal de regranulación. Estos hallazgos implicarían que los mastocitos juegan un rol importante en la respuesta vascular testicular a hCG, pues coexiste su degranulación con extravasación de tinta china postadministración.

FINANCIA: DTI U. de Chile B-3192-9012.

145

INTERACCION ENTRE PROTEINAS SECRETADAS POR LA VESICULA SEMINAL Y LOS ESPERMATOZOIDES EN ROEDORES. (Interaction between seminal vesicle secretions and spermatozoa in rodents). Carballada, R. y Esponda, P. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, Madrid, España.

Los fluidos de vesícula seminal de rata son capaces de inducir anticuerpos que reconocen todas las proteínas de la secreción de esta glándula. Cuando dichos anticuerpos se utilizaron para inmunofluorescencia indirecta sobre espermatozoides de rata recién eyaculados, se comprobó que aparecía un notable marcaje en algunas regiones de la cabeza y en la cola de los gametos. Un hecho similar se observó luego de incubar con estos antígenos espermatozoides colectados del epididimo. Por otra parte, se verificó que la capacidad de unión de estos antígenos a la membrana de los gametos estaba controlada por el grado de madurez (epididimaria) de ellos, así como por moléculas provenientes de otras glándulas accesorias. Además, los espermatozoides de ratón demostraron también una reacción similar, luego de su incubación con los antígenos de rata. Estos resultados sugieren que algunos componentes del plasma seminal interactúan con áreas definidas de la membrana plasmática del espermatozoide maduro; interacción que no parece muy especie-específica, dado las reacciones cruzadas que ocurren con el ratón. Este último hallazgo insinúa que tales moléculas podrían ser utilizadas durante los procesos previos al reconocimiento (especie-específico) que ocurre entre el espermatozoide y la membrana (o envolturas) del gameto femenino.

146

CARACTERIZACION DE NUCLEOS DE CELULAS GERMINALES EN REPLICAS DE CRIOFRACTURA DE TUBULOS SEMINIFEROS AISLADOS POR TRANSLUMINACION EN VARIOS ESTADIOS DEL CICLO ESPERMATOGENICO. (Characterization of germ cell nuclei in freeze-fracture replicas of seminiferous tubules isolated by transillumination at various stages of the spermatogenic cycle). Cavicchia, J.C. y Morales, A. Instituto de Histología y Embriología (IHEM), Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Mendoza, Argentina.

Túbulos seminíferos fueron aislados y sus estadíos identificados por transiluminación (VII-VIII, IX-XI, XII-XIV y V-VI) según Parvinen and Vanha-Perttula (1972) y este método combinado con criofractura para estudiar la distribución de poros nucleares en los diversos tipos celulares. Las espermatogonias A, las únicas localizadas en estadíos VII-XIV muestran distribución homógenea de poros, las tipo B (estadíos V-VI), exhiben por el contrario un perceptible agrupamiento de poros, las tipo B (estadíos V-VI), exhiben por el contrario un perceptible agrupamiento de poros. Los preleptotenes (VII-VIII) muestran un intenso agrupamiento. Los leptotenes (IX-XI) y cigotenes (XII-XIV) cambian a un modelo de distribución de poros más homogéneo. Los paquitenes (I-XII) despliegan una disposición geométrica regular en un agrupamiento intenso mientras que los diplotenes (XIII) exhiben nuevamente una distribución homogénea. Los espermatocitos secundarios, encontrados solamente en estadío XIV entremezclados con perfiles meióticos de metafase-anafase, se caracterizan en las réplicas por una distribución homogénea de escasos poros nucleares. En conclusión 1) es posible identificar por este método diversas células germinales en las réplicas de criofractura y 2) parece existir una estrecha correspondencia entre la distribución de poros nucleares y el patrón de cromatina de cada tipo celular. (Con apoyo financiero de CONICET, Argentina).

147

BARRERA HEMATOTESTICULAR EN CASOS DE PATOLOGIA TESTICULAR HUMANA. (The blood-testis barrier in patients with testicular pathology). Ortiz de Bet, L. y Cavicchia, J.C. Instituto de Histología y Embriología (IHEM), Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Mendoza, Argentina.

El objetivo de este estudio fue observar la barrera hematotesticular (BHT) en patología testicular humana, como "Síndrome de Sertoli-only", agenesia de células germinales y criptorquidismo. Se procesaron biopsias correspondientes al área peritumoral en casos de seminomas donde se ha descripto la presencia de áreas de hiperplasia de células de Sertoli (también conocidas como áreas de túbulos hipoplásicos, zonas disgenéticas o adenomas tubulares), halladas también en un 20% en áreas no tumorales de pacientes con tumor testicular y en la mitad de los pacientes con criptorquidia (1). Las muestras se fijaron en glutaraldehido al 5% en buffer s-collidina 0.1 M, pH 7.4 con el agregado de nitrato de lantano al 4% como trazador electro-opaco que penetra por los espacios intercelulares y se detiene a nivel de las uniones estrechas entre las células de Sertoli donde la BHT es competente. El tejido se procesó para microscopía óptica y electrónica. En las muestras estudiadas se observaron túbulos seminíferos constituídos fundamentalmente por células de Sertoli en los que el trazados penetró las uniones estrechas y llegó hasta la zona central en todos los casos indicando falta de BHT. Las células de Sertoli presentan cambios semejantes a los hallados en testículos prepuberales. 1) Schual,A.R. (1956) J. Urol. 75 : 285. (Con apoyo financiero de CONICET y CIUNC, Argentina).

148

ROL FISIOLOGICO DE VESICULAS AISLADAS DEL EPIDIDIMO DE RATA (Physiological rol of isolated rat epididymal vesicles). Fornés, M. Instituto de Histología y Embriología, Fac. de Medicina, Univ. Nac. de Cuyo, Mendoza, Argentina.

La presencia de vesículas (V) en los fluídos del tracto masculino ha sido descrita en diferentes especies, con origen en distintos órganos y funciones contradictorias. Recientemente, hemos descrito la presencia de V en el epididimo de rata, su aislación y contenido de enzimas. Actualmente, estudiamos su relación con la motilidad y potencial fertilizante de los espermatozoides.

La motilidad in vitro se estudió mediante la suspensión de una gota de fluído caudal epididimario, obtenido por punción del epididimo, en un medio que estimula la motilidad, depositada sobre un porta mantenido a 36°C. Este control varió a experimental por la adición en concentraciones conocidas, de el sonicado de V intactas, a el medio de suspensión. Se encontró una inhibición de la motilidad del tipo concentración-dependiente.

La relación con el potencial fertilizante se analizó mediante la inseminación de hembras adultas. Mediante incisión abdominal, se expusieron ambos cuernos uterinos y se colocó una suspensión de espermatozoides con buena motilidad en el cuerno control, mientras que en el experimental el medio de suspensión tenía cantidades conocidas de un sonicado de V. La recuperación de embriones en el cuerno experimental fue menor que en el control.

Proponemos que las V, epididimarias de rata tienen acción inhibitoria sobre la motilidad e interfieren en el mecanismo de fecundación.

149

EFECTO DE BUSERELINA, FSH Y TESTOSTERONA SOBRE EL ADN TESTICULAR.
(Effect of Buserelina, FSH and testosterone on testicular DNA).
Bustos-Obregón, E, Frías, JC y Belenni, M. (Dpto. de Biol. Cel. y Gen. Fac. de Medicina, U. de Chile).

En el animal adulto, la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada regula el proceso de la espermatogénesis. Sin embargo, aún se desconoce cómo los niveles sanguíneos de gonadotrofina (FSH) participan en tal proceso, aunque se postula que FSH sería promotora de la proliferación gonial. Se propone estudiar el efecto de diferentes niveles sanguíneos (NS) de FSH sobre la actividad específica de ADN testicular (AE-ADNt) como respuesta a la administración de Buserelina (B), FSH y testosterona (T).

Se usaron 40 ratones A/Snell, adultos (3 meses) con pesos entre 18 y 24 grs. Los animales recibieron un régimen de 12 hs. de luz y 12 de oscuridad y alimentación ad-libitum. Se formaron 8 grupos de 5 animales, los que fueron sometidos a la administración de Buserelina, FSHh y T, con el siguiente esquema experimental: Grupo Control(1); FSHh(2); FSHh+T(3); FSHh+B+T(4); FSH+B(5); T(6); T+B(7) y B(8). La Buserelina, fue administrada diariamente (0.5 µg/ratón) durante 17 días y la FSH (15 UI/ratón) y T (2.0 mg/ratón), desde el día 12 al 17, cada 24 hrs. Diez horas después de la última inyección, a todos los animales se les administró Timidina tritriada (2 µCi/gr), luego de 2 horas fueron sacrificados y se recuperó: suero sanguíneo y gonádas.

RESULTADOS

GRUPO	1	2	3	4	5	6	7	8
FSH(ng/100µl)	8,2	>>10	2,6	2,7	3,2	1,9	0,5	0,3
AE/ADNt cpm/µg	14,1	21,9	66,7	24,5	7,3	12,9	7,8	7,9

La adminsitración de FSHh implicó un aumento de la AE-ADNt y un alza de los NS de FSH; la adición de T, suprime parcialmente los NS de FSH endógeno con un gran aumento de la AE-ADNt; la supresión ejercida por la Buserelina sobre la actividad gonadotrófica hipofisiaria, no difiere del esquema B+T, y resulta en una disminución de aprox. 50% en la AE-ADNt y ésta no se restituye por la sola administración de FSH; en el adulto, la administración de T mantiene la AE-ADNt aunque suprime en aprox. 75% los NS de FSH. El esquema FSH+B, tiene un comportamiento semejante a T+B y B, en relación a la AE-ADNt. Por lo tanto, en los grupos con NS de FSH cercanos a 3 ng/100 µl, la gran diferencia de la AE-ADNt es atribuible a la T. Además, la B sola y B+T, dan los NS de FSH más bajos, a los cuales es sensible la AE-ADNt.

Por lo tanto, bajos NS de FSH, disminuyen la AE-ADNt, la cual puede restituirse al administrar altas dosis de FSH y/o FSH+T, o suprimirse al administrar B.
(Fondecyt 0948/90 y Placin PLC-012/90)

150

FORMACION Y MADURACION DEL ACROSOMA EN EL COBAYO.
(Formation and maturation of Guinea pig acrosome).
Burgos M.H. y Gutierrez L.S. Instituto de Histología y Embriología, Fac. de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.

Se estudió la formación y maduración del acrosoma de cobayos adultos normales control, castrados, castrados con testosterona y normales con ligadura de la cabeza del epidídimo, todos durante 14 días.

Los testículos y epidídimos controles y los epidídimos de los castrados fueron perfundidos por vía aórtica con técnicas convencionales para microscopía electrónica y con las técnicas para polisacáridos (Thiery y Rambourg, 1974) y densidad acrosomal con PTA-cromio (Morré y Mollenhauer, 1973).

Los resultados revelan la formación de territorios de distinta densidad durante la etapa de diferenciación del acrosoma en relación con el aparato de Golgi y el posterior desplazamiento de tales territorios durante el tránsito epididimario. Los paquetes más densos (PTA-Cr) se ubican en la cara cóncava del acrosoma y el territorio acrosomal menos denso en la región convexa del mismo. Con respecto a los polisacáridos ocurre un fenómeno inverso, la reacción se localiza únicamente en la región convexa del acrosoma al finalizar el tránsito epididimario.

Estos cambios son inhibidos por la castración y reintegrados por la administración de testosterona y no ocurre en el ligado. Concluimos que los cambios territoriales del agrosoma son andrógeno dependientes a través del epidídimo.

151

CAMBIOS DE TEMPERATURA EN EL MEDIO DE INCUBACION INDUCE REACCION DE ACROSOMA EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO.(Changes of temperature in the incubation medium induces acrosome reaction in human spermatozoon).Sánchez R. Unidad de Fisiopatología.Universidad de la Frontera. Temuco.

El aumento de la reacción de acrosoma (RA) en eyaculados después de su descongelamiento nos indujo a estudiar la posible RA en el espermatozoide humano inducida por cambios de temperatura. Los espermatozoides fueron obtenidos de semen de donantes fértiles y de pacientes con problemas de esterilidad conyugal y seleccionados por el método de "swim-up". Los espermatozoides fueron tratados en 2 diferentes protócolos: 1) Grupo Control (GC):24 horas a temperatura ambiente seguido por una incubación adicional a 37ºC por 3 horas, 2) Grupo Experimental (GE) 24 horas a 4ºC seguido por una incubación adicional a 37ºC por 3 horas. La RA de los espermatozoides viables fue evaluado por la técnica de triple tinción descrita por Talbot y Chacón. En el grupo de pacientes como en el grupo de donantes fértiles se evidenció una significativa RA después de la exposición a baja temperatura ($p<0.0005$), el mayor porcentaje de RA fue en el grupo de donantes fértiles (23.3%). Por otra parte se evaluó la función de los espermatozoides sometidos a cambios de temperatura y se correlacionó el % de espermatozoides reaccionados con el score del test de fusión gamética (TFG). En el GE todos los parámetros fueron incrementados significativamente en relación al GC, especialmente la tasa de penetración espermática ($p<0.0005$) y el número de cabezas descondensadas por ovocito ($p<0.0005$). La tasa de penetración espermática fue el parámetro más significativamente correlacionado con RA (Spearman test, $r=0.572$, $P<0.0035$). Los resultados indican en forma consistente que el incremento de la RA en los medios de incubación aumenta considerablemente la posibilidad del espermatozoide de fusionarse al ovocito de hamster denudado de zona pelúcida. La utilización de baja temperatura como sincronizador de la RA puede ser particularmente usado para disminuir los resultados falsos negativos del TFG. Esto entrega una nueva y económica posibilidad de una mejor evaluación de la capacidad fertilizante de espermatozoide humano en el hombre no fértil.

FINANCIADO: AvHUMBOLDT, BONN, ALEMANIA Y DIRECCION INVESTIGACION UFRO.

152

SITIO DE PRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO EN ESPERMATOZOIDES DE HAMSTER. (Site of production of hydrogen peroxide by hamster spermatozoa).
Bize, I y Sharpe, C. Departamento de Obstetricia y Ginecología, State University of New York, Syracuse, New York. (Patrocinado por C. Barros).

La generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por el espermatozoide de hamster parece estar involucrada en la capacitación del mismo. En este estudio comenzamos a determinar la localización del sitio de producción de H_2O_2 en espermatozoides obtenidos del epidídimo. La disminución en la fluorescencia de escopoletina debida a su oxidación por H_2O_2 fué usada para determinar la tasa de producción de este metabolito. El ensayo en la presencia y ausencia de catalasa fue usado para descartar oxidaciones inespecíficas. Espermatozoides mótiles generan H_2O_2 a una tasa de 0.18 ± 0.02 nmoles/hora/10^6 espermatozoides. La tasa de producción de H_2O_2 por espermatozoides sometidos a un tratamiento hipoosmótico que remueve la membrana plasmática pero mantiene intacta la función mitocondrial, es similar (0.17 ± 0.08 nmoles/hora/10^6 espermatozoides). Espermatozoides de una suspensión previamente hervida no producen H_2O_2 (0.01 ± 0.09 nmoles/hora/10^6 espermatozoides). La sensibilidad a cianuro y azida en la producción de H_2O_2 por parte de la mitocondria es usada frecuentemente para diferenciar entre este sitio y la membrana plasmática como lugar de generación de H_2O_2. Ensayos efectuados en ausencia de catalasa indican que la tasa de producción de H_2O_2 no es inhibida por azida. Ensayos efectuados en la presencia y ausencia de catalasa indican que la generación de H_2O_2 tampoco es inhibida por cianuro. En conjunto nuestros resultados indican que el H_2O_2 producido por el espermatozoide de hamster es de origen mitocondrial y que las mitocondrias del espermatozoide son atípicas.

153

SITIOS LIGANTES DE ZINC EN ESPERMATIDAS DE RATA. (ZINC BINDING SITES IN RAT SPERMATIDS).

RAQUEL ARAYA A., Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.
Patrocinio J. Reyes.

Zinc es un elemento traza que se encuentra en altas concentraciones en semen (1,5-3 mM). En espermatozoides, Zinc regula condensación de la cromatina y metabolismo energético.

Usando las células precursoras de los espermatozoides, las espermátidas, hemos establecido que Zinc se asocia un tercio del total en un compartimento extracelular. El Zinc intracelular está en un 80% o más unido a organelos celulares. Usando geles de PAGE-SDS y electrotransferencia a nitrocelulosa, renaturación, unión de $^{65}Zn(II)$, seguido de autoradiografía no se observa unión de Zinc a proteínas de espermatidas. Sin embargo, espermátidas adicionadas directamente a nitrocelulosa en similares concentraciones de proteína y posteriormente sometidas a similar procedimiento, si unen $^{65}Zn(II)$.

Los sitios de unión de Zn(II) a proteínas de espermátidas son denaturadas irreversiblemente por tratamiento con SDS-ditiotreitol.

Financiado Proyecto 90/142 FONDECYT; Grant GAPS 9016; Fundación Rockefeller y Proyecto 125.787/91 UCV.

154

FISIOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE DE POTRO : CAPACITACION ESPERMATICA Y REACCION ACROSOMICA. (Stallion spera physiology : spera capacitation and acrosomic reaction).

Rodriguez, H. ___ Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca y Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (P. E. Bustos-Obregón)

La fisiología y manejo del espermatozoide de potro ha presentado dificultades para su estudio y utilización intensiva, dado que aparentemente presenta ciertas variantes en su biología, respecto a otras especies como toro, carnero, verraco. La fisiología de la membrana espermática debe ser óptima, para que los espermatozoides experimenten una posterior capacitación y reacción acrosómica, efectiva para fecundar.

Se propone estudiar la funcionalidad de membrana del espermatozoide durante su maduración epididimaria y ensayar diferentes esquemas de inducción de la capacitación y reacción acrosómica, adicionando BSA y LFC, a espermatozoides de potro.

Se usaron 4 potros corraleros chilenos, adultos, para obtener eyaculados y epididimos de 9 potros FSC, adultos. Obtenidos los espermatozoides, se evaluó el espermiograma corriente, (Díaz, Arancibia,1971) el test hipo-osmótico (Jeyendran et al, 1984), la triple tinción (Talbot y Chacón, 1981) al ser incubados con diferentes concentraciones de BSA (3.0, 30 y 60 mg/ml) y LFC (25, 50 y 100 µg/ml) por diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas). Así se evaluaron la permabilidad de membrana, la motilidad y reacción acrosómica en los espermatozoides.

Se obtuvo un patrón de maduración de la permeabilidad de membrana, con máximos valores en cauda epididimaria (48%) en paralelo con la adquisición de la motilidad espermática progresiva (65%). En cauda epididimaria existe un grado de reacción acrosómica espontánea (entre 5 - 10%). En eyaculados los máximos valores, mantenidos en el tiempo para la motilidad espermática y reacción acrosómica, se encuentran en condiciones de incubación con 30 mg/ml de BSA y 50 µg/ml de LFC. Adicionalmente, se encontró que altas dosis de LFC (100 µg/ml) tienen efectos adversos sobre la motilidad espermática. (FONDECYT 948/90 y PLACIRH PLC-012/90).

155

INMUNOLOCALIZACION DE ACROSINA EN ESPERMATOZOIDES DE CONEJO DURANTE LA REACCION ACROSOMICA. (Immunolocalization of acrosin in rabbit spermatozoa during the acrosome reaction).

Valdivia, M.*, Yunes, R.* y Barros, C. Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La reacción acrosómica permite la liberación de acrosina, que se supone necesaria para la penetración de la zona pelúcida. De un panel de 10 anticuerpos monoclonales antiacrosina ensayados mediante inmunofluorescencia indirecta se encontró que dos monoclonales antiacrosina humana (C2B10 y A8C10) y uno antiacrosina de bovino (C2E5) dieron reacción cruzada con los espermatozoides de conejo.

El monoclonal A8C10 se utilizó junto con un segundo anticuerpo unido a oro coloidal amplificado con plata para la localización de acrosina durante la capacitación y reacción acrosómica, lo que permitió distinguir 4 tipos de espermatozoides: a) sin marca, con acrosoma aparentemente intacto; b) marca sobre el borde del acrosoma; c) marca sobre toda la región acrosomal con excepción del segmento ecuatorial; y d) con acrosoma reaccionado pero sin marca. Al iniciar la incubación, el 90% de los espermatozoides presentaba el patrón "a", el cual disminuía a 17% después de 32 horas de incubación. Por otra parte al fin de la incubación el 71% de los espermatozoides presentaba patrones de marcaje "b" y "c" y sólo un 12% presentaba un patrón "d". Valores similares se obtuvieron mediante el ionóforo de Ca^{++} A23187 pero en un período total de 7 horas.

Los resultados obtenidos sugieren que los espermatozoides de conejo podrían retener acrosina sobre la membrana acrosómica interna por un período prolongado después de ocurrida la reacción acrosómica.

Financiado por FONDECYT 749/91 y Fundación Rockefeller GAPS 91/01. *Becarios P. Universidad Católica de Chile.

156

Inmunolocalización de acrosina durante la capacitación de espermatozoides de toro. (Acrosin immunolocalization during the bovine sperm capacitation)

M. De Los Reyes, C. Pérez*. Laboratorio de Embriología, P. Universidad Católica de Chile.

La localización de acrosina en el acrosoma de espermatozoides de hamster, cobayo y humanos se ha demostrado con anticuerpos mono y policlonales, presentando diversos patrones de marcación.

La cinética de liberación de acrosina de espermatozoides de toro, durante la capacitación *in vitro*, se estudió en muestras de semen incubadas por diferentes tiempos (0 a 4 hrs.) en medio capacitante. La detección de acrosina se realizó mediante la técnica de oro coloidal y amplificación con plata utilizando el anticuerpo monoclonal anti acrosina de bovino C2E5. Las observaciones demostraron la presencia de acrosina asociada a la región acrosomal del espermatozoide. Se distinguieron al menos cuatro tipos de espermatozoides: a) sin marca; b) marcación intensa del borde periacrosomal anterior y leve marcación del resto del acrosoma, c) marca leve en todo el acrosoma, d) marca intensa de toda la región acrosomal. Los resultados demostraron que a mayor tiempo de capacitación se produce una disminución del porcentaje de espermatozoides sin marca, de un 71%, a las 0 hrs, a un 28% a las 4 hrs. El resto de los patrones de marcación aumentaron de valores cercanos al 10% a las 0 hrs. hasta un 20% a 29% a las 4 hrs. Estos resultados demostrarían que los patrones de marcación de acrosina detectados en espermatozoides de toro son similares a los observados en espermatozoides humanos.

Financiado por Fondecyt 749/91, Fundación Rockefeller GAPS 91/10 a C. Barros y DTI A3139-9012 * Becario CONICYT.

157

FUNCIONES DE ACROSINA EN LA FECUNDACION DE MAMIFEROS. (Acrosin functions in mammalian fecundation)

Sepúlveda, M.S., Meléndez, J. & Rivera, M.(*)
Fac. Cs. Biológicas, P. Universidad Católica de Chile y (*)P. Universidad Católica de Ecuador.

Acrosina, una serina proteasa acrosomal que se activa durante la reacción acrosómica, se diferencia de otras serinas proteasas por combinar varias propiedades funcionales en una misma molécula. Posee la tríada catalítica de la proteasa, que participa en la penetración, posee dominios hidrofóbicos responsables del carácter especial de asociación a la membrana y poseería un sitio de unión a carbohidratos, mediante el cual participaría en la unión secundaria a la zona pelúcida.

Para estudiar las funciones de acrosina en la fecundación, se realizaron ensayos biológicos de co-incubación de gametos humanos (espermatozoides y zonas pelúcidas), en presencia de diferentes anticuerpos monoclonales (AMC) anti-acrosina, que fueron previamente seleccionados por ensayos de ELISA, como dirigidos contra regiones cercanas al sitio activo o como dirigidos contra regiones cercanas al sitio de unión a carbohidratos.

Los resultados mostraron inhibición de la unión secundaria o "binding" a la zona pelúcida, por ambas familias de AMC. Sin embargo, los AMC dirigidos contra regiones cercanas al sitio de unión a fucosa, inhiben en mayor proporción. Los efectos mostrados por los AMC son dependientes de los tiempos de incubación y de la concentración utilizada.

Estos resultados sugieren que ambos sitios podrían estar en regiones cercanas de la molécula, o que existiría algún tipo de regulación de una función con respecto a la otra.

Financiado por FONDECYT 91-0011 y 749/91; Fundación Rockefeller GAPS 91/01

158

PARTICIPACION DE UNA PROTEASA TIPO QUIMOTRIPSINA EN EXOCITOSIS. LA REACCION ACROSOMICA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS. (A role for a chymotrypsin-like protease in exocytosis. The human sperm acrosome reaction).

Llanos M.*, Vigil P., Salgado A.M. y Morales P. Unidad de Reproducción y Desarrollo. Fac. Ciencias Biol. P. Univ. Católica de Chile. Unidad de Biología Reproductiva. *INTA. Univ. de Chile. Santiago, Chile.

Una de las etapas fundamentales de la fecundación en mamíferos es la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP). En esta interacción se distingue la unión y penetración a través de la ZP y la reacción acrosómica (RA). En el presente trabajo investigamos el efecto de inhibidores y sustratos sintéticos específicos de quimotripsina sobre la capacidad de los espermatozoides humanos de experimentar la RA. Espermatozoides móviles fueron obtenidos a través de una gradiente de Percoll e incubados in vitro en medio Tyrode's modificado (2,6% BSA) a 37 °C, 5% CO_2:95% aire, a una concentración de 1 x10^7 cels/ml. Después de incubar por 4.5 h, los espermatozoides fueron tratados con 25 µM del inhibidor irreversible TPCK (N-tosil-L-fenilalanina-clorometil cetona) o con 0.1 % DMSO (control) por 30 min. Luego, los espermatozoides se coincubaron con 3-4 ZP (obtenidas de oocitos humanos no viables) por 30 min y se cuantificó el porcentaje de espermatozoides reaccionados en la superficie de la ZP. Los resultados indican que TPCK inhibe la RA inducida por la ZP (55% inhibición), sin afectar significativamente el proceso de unión. Resultados adicionales indican que TPCK (25-50 µM) y el sustrato sintético ATEE (1 mM, N-acetil-L-tirosina etil ester) inhiben la RA inducida por el fluído folicular en un 79 % y en un 94 %, respectivamente. Esta es la primera evidencia en sugerir que una proteasa endógena del tipo quimotripsina podría participar en el proceso de RA de espermatozoides humano. Financiado por FONDECYT 0823/90 y RF GA PS 9110 .

159

FECUNDACION Y DESARROLLO IN VITRO DE OVOCITOS DE BOVINO PROVENIENTES DE OVARIOS CONSERVADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS. (In vitro fertilization and development of bovine oocytes from ovaries stored at different temperatures).

Risopatrón, J., Del Campo, H. Depto. Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Casilla 100 Valdivia, Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: M. Bretos).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto que ejerce la temperatura en que se mantienen los ovarios de bovinos faenados antes de la colección de los ovocitos sobre las tasas de fecundación y desarrollo in vitro, de los ovocitos.

Los ovarios fueron recuperados en un matadero y distrubuídos al azar en 2 grupos: 1) mantenidos a 4 °C y 2) mantenidos a 38 °C. Los ovocitos de ambos grupos fueron recuperados y procesados en condiciones similares de temperatura (38 °C) y cultivados en TCM-199, con 10% SFB y 0.02 mg/ml de HFE en incubador con 5% CO_2 (maduración). Posteriormente fueron co-cultivados por 6 horas con espermatozoides epididimales previamente capacitados por el método Brackett y Oliphand 1975, luego de este período, fueron cultivados en TCM-199 con un 10% SFB y fueron evaluados a las 18 horas (tasas de fecundación) y a las 48 horas (tasas de desarrollo) post-inseminación.

Las tasas de fecundación (grupo 1: 55,1% y grupo 2: 66,6%) y de desarrollo (grupo 1: 52,7% y grupo 2: 60,6%, no fueron diferentes entre los grupos ($p > 0,05$). Sin embargo los ovocitos del grupo 1 exhibieron una mayor incidencia ($p < 0,05$) de poliespermia que los del grupo 2 (25% y 6,6%, respectivamente).

Estos resultados indicaron que los ovarios de bovino pueden ser conservados a 4 °C sin reducir la capacidad de los ovocitos de fecundarse y desarrollarse hasta los estados 2 - 8 células in vitro.

160

RECUPERACION DE GAMETOS Y EMBRIONES DEL TRACTO GENITAL FEMENINO DEL MONO Cebus apella.(Recovery of gametes and embryos from the female genital tract of the new world monkey Cebus apella.)

Ortiz, ME., Gajardo, G., Herrera E., Valdéz, E.
Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Se describe la adaptación de métodos para estudiar las interacciones de gametos y embriones con el tracto genital de la mona Cebus apella. Se monotorizó el ciclo menstrual por frotis vaginal en 22 hembras adultas durante 2 o 3 ciclos y en el último ciclo también se determinó los niveles séricos de estradiol, progesterona y LH. Quince hembras en un total de 25 ciclos se aparearon en un primer intento con machos fértiles en los días periovulatorios de su ciclo menstrual, 6 hembras en un total de 8 ciclos se han apareado en un segundo intento. Las hembras apareadas se operaron entre 1 y 50 horas después de la cópula; después de verificar la ovulación por inspección de los ovarios, se perfundió segmentariamente el tracto genital in situ; en los perfusados se determinó el número y estado funcional de los espermatozoides marcados con lectina fluorescente y los huevos fueron analizados por microscopía de luz. Se comprobó que el ciclo menstrual del Cebus apella dura entre 19 y 21 días con un período periovulatorio de 3-5 días durante el cual ocurre el pico de estradiol y el alza de LH y progesterona. El número de espermatozoides recuperados varió ampliamente entre los segmentos (ámpula, istmo, útero) y entre los animales, ni guardó relación evidente con el intervalo post-copulación. La proporción de espermatozoides reaccionados fue mayor en el oviducto que en el útero. Cuatro de los 11 huevos recuperados presentaban aspecto microscópico de huevos en desarrollo.

Los resultados muestran que esta especie es un modelo adecuado para estudiar el comportamiento de los gametos y embriones en el tracto genital femenino de los primates. Financiado por FONDECYT 0750-91, OMS 89157 y Rockefeller Foundation 88077.

161

DESARROLLO INICIAL DE EMBRIONES DE RATON: EFECTO DE LITIO.(Early development of mouse embryos: effect of lithium.)**Basso, C., Naves, R., Pey, R.*** Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Se ha demostrado que la incubación de embriones en un medio con LiCl retarda su segmentación pero no su blastulación y en consecuencia blastulan con menos células lo cual afecta la morfogénesis. Con el fin de precisar que etapa(s) son sensibles a litio se incubaron embriones en este medio a partir de distintos estados de segmentación y se determinó el número de células a las 99 hrs de edad (blastocistos). Se observó que litio no tiene efecto en estados con menos de 8 células. Incubando con LiCl embriones de 2 células y transfiriéndolas a medio control en distintos estados se confirmó que el periodo sensible se extiende desde las 79.5 hrs. hasta las 91.5 hrs.de edad. Esta ventana corresponde a distintas etapas de la compactación en una población de embriones de 8 células. Sincronizando la población respecto a la división de 2 a 3 células, se pudo determinar que etapa de la compactación es afectada por litio. Se analizan los resultados en términos de la diferenciación de procesos celulares.

Financiado por FONDECYT y Universidad de Chile.
* becario del Grant RF 88077

162

EFECTO DE LECTINAS EN LA REGIONALIZACION DEL EMBRION DE RATON.(Effect of lectines on the regionalization of the early mouse embryo.)
Ahumada, A.(*).
Dpto. Biología, Fac. Ciencias, U. de Chile.
(Patrocinio: L. Izquierdo).

Durante el desarrollo inicial de mamíferos ocurre el proceso de especificación regional que se reconoce citoquímicamente por la actividad de 5'-nucleotidasa o de fosfatasa alcalina a partir del estado avanzado de 4 células en las regiones de contacto celular. El fenómeno puede ser anticipado al estado de 2 células por agregación de embriones, por lectinas en solución o fijadas en microesferas de agarosa y por estimuladores de proteína quinasa C. Estos resultados sugieren que el contacto es la causa normal de la regionalización, que habrían sacáridos de la superficie celular involucrados en la recepción del estímulo de contacto y que habría participación de mensajeros intracelulares en la difusión del proceso. La adaptación de un método bioquímico ha permitido cuantificar la actividad enzimática por embrión y los resultados obtenidos confirman las observaciones citoquímicas. El efecto de las diferentes lectinas (Con A, WGA, SBA, etc.) es dependiente de su concentración y tiempo de incubación y es específico, como se comprueba por la incubación con azúcares que inhiben su acción. Se describe el efecto de las lectinas sobre la diferenciación y morfogénesis del embrión.

Financiado por Proyecto FONDECYT 91-0838
(*) Becario CONICYT

163

IMPLANTACION "IN VITRO" DEL BLASTOCISTO DE RATON: EFECTO DEL CONTACTO Y DEL MEDIO DE CULTIVO. ("In vitro" implantation of the mouse blastocyst: effect of contact and of the culture medium).**Mancilla,A.*, Vargas,V.** e Izquierdo,L.**. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La "implantación" de blastocistos (bl) in vitro revela pérdida de la zona pelúcida, adhesión al substrato y extensión del trofoblasto (tf) . Hemos evaluado el desarrollo del tf en términos morfológicos y bioquímicos en : implantación in vitro con o sin suero e igualmente con matriz extracelular o sus componentes en suspensión y comparado embriones implantados con embriones cultivados en gota colgante . Los resultados revelan que: 1- los bl no implantan en ausencia de suero y el tf no adhiere ni extiende; 2- adhieren e iguales condiciones si se revisten las cápsulas con fibronectina o laminina; 3- en embriones cultivados en gota colgante y con suero hay cierta diferenciación de las células trofoblásticas; 4- en todos los implantes ensayados varía la diferenciación del tf pero no el contenido de proteínas ; 5- en los cultivos en gota colgante el contenido de estas es menor. Se infiere que: el contacto con el substrato es suficiente para estimular el crecimiento en cualquier medio y que la presencia de suero, sin contacto, no estimula ni el crecimiento ni la mayor diferenciación del tf. Los resultados sugieren la función de factores de crecimiento y/o componentes de matriz extracelular en la diferenciación del tf.

* Becario CONICYT ** Becario Programa de Biología de la Reproducción de la P.U.Católica de Chile, Grant RF 88077-B.
Financiado por FONDECYT, Proyecto 91- 0838.

164

FACTORES GENETICOS Y MATERNOS EN LA INHIBICION DE LA FUSION PALATINA DEL RATON POR INDOMETACINA IN VITRO.
(Genetic and maternal factors associated with the inhibition of palatal fusion by indomethacin in vitro).
Montenegro MA, Pereda MT, Cardemil C y Palomino H.
Dptos. Morfología Experimental y Biología Celular y Genética, Fac. Medicina, U. de Chile.

Diferencias en la susceptibilidad a la fisura palatina inducida por glucocorticoides y por indometacina está asociada al complejo mayor de histocompatibilidad (H-2).

Este trabajo analiza el efecto de la indometacina, un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, en la fusión palatina de embriones de ratón provienentes de cepas de diferente susceptibilidad y de los cruzamientos recíprocos y retrógrados respectivos.

Se utilizaron ratones de las cepas A/Sn (haplotipo H-2a susceptible) y B/10 (haplotipo H-2b resistente) y embriones híbridos obtenidos del cruzamiento de estas dos cepas. Se disecaron los procesos palatinos de embriones de 13 días de gestación y se cultivaron 72 h a 38 C en medio normal o que contenía la droga (50ug). El material fue procesado para M.O. y M.E.

La indometacina inhibe la fusión de los procesos palatinos in vitro en ambas cepas, pero en la cepa A/Sn existe una significativa mayor frecuencia de no fusionados. Del mismo modo existe un aumento significativo de fisurados en los híbridos de madre A/Sn, en cambio en los cruces de madre B/10 este porcentaje aumenta levemente, pero las diferencias no son significativas.

Al comparar los resultados con los obtenidos de embriones de cepas puras, se observa que cuando la madre es susceptible, los porcentajes de fisuras se asemejan a los de embriones provenientes de cepas puras susceptibles y recíprocamente se observa el mismo fenómeno.

Esto estaría evidenciando un importante efecto materno en la inhibición de la fusión palatina in vitro inducida por indometacina.

Proyectos DTI 2368 U. de Chile y 89-0801 FONDECYT.

165

DESARROLLO ONTOGENETICO DEL ORGANO SUBCOMISURAL DE LA RATA. (Ontogenetical development of the rat subcomissural organ). Schoebitz,K. Instituto Histología y Patología, Fac. Medicina, Universidad Austral de Chile.

El desarrollo del órgano subcomisural (OS) fue estudiado en embriones y fetos de ratas durante el período de gestación (G, 21 dias) y desde el nacimiento (día 1) hasta el estado adulto (día 46).

El OS y las regiones cervicales de la médula espinal (ME) fueron fijados en Bouin y procesados para microscopía de luz, utilizando técnicas convencionales e inmunocitoquímicas; en estas últimas se usó anticuerpos contra la Fibra de Reissner (FR, producto de secreción del OS) y el método de la peroxidasa anti-peroxidasa.

El análisis de los resultados obtenidos permiten concluir que: 1) Material secretorio inmunoreactivo (MI) está presente por primera vez en el día 14 G, en el OS y en la pared de la flexura Pontina (PFP); 2) A partir del día 18 se observan los primeros signos de secreción de MI hacia el III ventrículo (V); 3) A partir del día 1 de nacimiento: a) el MI de PFP desaparece; b) aparece MI fibroso en el V; 4) Desde el día 6 postnacimiento aparece la FR en la región cervical de la ME.

Los resultados indican que el OS es una de las primeras estructuras en diferenciarse. La presencia de MI en células de la PFP sugieren que la secreción de este órgano podría estar influenciado en la formación de la FR.

Financiado por: Proyecto S-89-01 Dir.Invest. U.A.Ch.; 91-0956 FONDECYT y Grant I/63-476 Stiftung Volkswagenwerk.

166

DESARROLLO DEL PLASMA PERINUCLEAR, HUSO DE SEGMENTACION Y DIVISION DESIGUAL DEL HUEVO DE SANGUIJUELA. (Development of the perinuclear plasm, cleavage spindle and unequal division of the leech egg). **Olea,N., Téllez, V., González, R. y Fernández, J.** Dept. Biología, Fac. de Ciencias. U. de Chile.

Tres dominios ooplásmicos ricos en organelos se establecen a lo largo del eje animal\vegetal del huevo de sanguijuela: los teloplasmas (tp) en los polos y el plasma perinuclear (pp) en el centro. El desarrollo del pp ha sido estudiado por inmunofluorescencia, microscopía electrónica, electroforesis en SDS-PAGE e incorporación de metionina-S 35.

El pp se forma por acumulación de ooplasma alrededor del centrosoma aportado por el espermatozoide. Durante este proceso la proliferación de organelos membranosos se acompaña de elevada incorporación de metionina S-35, mientras la división del centrosoma gatilla la conversión del monáster en anfidiáster. El huso de segmentación se ensambla dentro del pp, gradualmente adquiere asimetría estructural y posicional y su polo más desarrollado se asocia estrechamente a los tp. Durante la citoquinesis cada blastómero recibe una mitad del pp.

Conclusiones: 1) El pp está fuertemente involucrado en la síntesis de proteínas, tal vez dirigida por transcriptos maternales de RNAm, y podría contener el "pool" de proteínas estructurales y reguladoras que permiten el ensamblaje de microtúbulos y sus cambios de organización durante el ciclo celular; 2) la división desigual del huevo y la segregación diferencial de sus tp parecen depender de la asimetría del huso de segmentación.

Financiado por Fondecyt, proyecto 89-1128.

167

UBIQUITINACION DE PROTEINAS HISTONICAS DURANTE LOS PRIMEROS ESTADOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL ERIZO DE MAR Tetrapygus niger. (Ubiquitination of histone proteins during the first stages of embryonic development of the sea urchin Tetrapygus niger.) Bustos, A., Nicolaides,D., Inostroza, D., Puchi, M., Imschenetzky, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales y Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

Las modificaciones post-traduccionales representan mecanismos importantes en la regulación de eventos celulares, tales como, replicación, reparación del ADN y diferenciación celular.

Con el objetivo de investigar la relación entre la ubiquitinación de proteínas cromosomales histónicas (variantes CS) y la proliferación celular, se analizó esta modificación por métodos inmunobioquímicos durante los dos primeros ciclos celulares en embriones de erizo de mar. Se obtuvieron anticuerpos policlonales anti ubiquitina en conejos que se utilizaron para revelar los Western-blots de proteínas CS obtenidas en las fases premitótica, mitótica y post-mitótica.

Los resultados obtenidos revelan ubiquitinación principalmente de una proteína histónica, cuyo peso molecular aparente es 39 Kd, y que se resuelve en dos variantes en electroforesis bidimensional, encontrándose menos ubiquitinada en la etapa de mitosis.

Además, el análisis del efecto Zn (II), inhibidor de la desubiquitinación, demostró que se altera fuertemente el desarrollo embrionario permaneciendo la ubiquitinación de proteínas histónicas invariable a lo largo de los primeros ciclos de división celular.

Proyectos 20.31.35 y 91.31.39-1 de la Dirección de Investigación, Universidad de Concepción.

168

MICROMORFOLOGIA DE LAS CAPSULAS OVIGERAS DE **Concholepas concholepas** (GASTROPODA; MURICIDAE). MICROMORPHOLOGY OF EGG CAPSULE IN **Concholepas concholepas** (GASTROPODA: MURICIDAE). Garrido, O. y Gallardo, C. Instituto de Embriología e Instituto de Zoología, Universidad Austral de Chile.

Se recolectaron cápsulas ovígeras (CO) de **Concholepas concholepas** (Cc), en dos localidades del litoral Sur Mehuín y Metri. Se determinó el estado de desarrollo de los embriones existentes dentro de las cápsulas y luego se procesaron para MET y MEB. Los preparados se observaron en un MET H-700 y en un MEB Nanolab 2000.

La región peduncular de la CO tiene una delgada cubierta externa con repliegues superficiales de densidad electrónica baja, un estrato denso con estriaciones periódicas (similares al colágeno) y un estrato central de aspecto esponjoso con láminas de alta densidad electrónica.

La región media de la pared capsular tiene una cubierta externa con abundantes repliegues, un estrato estriado externo compacto delgado ,un estrato esponjoso laminar central, un estrato estriado interno grueso y una delgada cubierta de superficie lisa que tapiza la cavidad interna de la cápsula.

La zona apical de la pared capsular tiene los mismos componentes que la zona media, presentando un tapón de material estriado en la región opercular.

La CO de Cc tiene una ultraestructura general similar a la encontrada en **Nucella**, pero presenta diferencias especificas tanto al MET como al MEB. Se discute los cambios que experimentan las CO en relación con el estado de desarrollo de los embriones que contienen. Las estriaciones y láminas que se observan al MET nos hacen suponer una distribución ordenada de proteínas fibrilares en la pared de la CO.

Financiado por Proyecto DID. UACH. S-91-14 y Proyecto C-90-5.

169

ESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LA PARED DE LA CAPSULA OVIGERA DE **Concholepas concholepas**. Egg capsule wall of **Concholepas concholepas** structure and composition.

Jaramillo, R. Goicoechea, O. y Paschke, K. Institutos de Embriología y Biología Marina. Universidad Austral de Chile.

Se estudió a microscopía óptica las características histológicas de la pared de las cápsulas de **Concholepas concholepas** al inicio y al término del período intracapsular, mediante técnicas histológicas e histoquímicas. Además se cuantificaron los contenidos glucídicos, protéicos y lipídicos de la pared de la cápsula en iguales períodos, mediante las técnicas de Raymond et al. (1963) modificada por Dallager (1985), Lowry et al (1951) modificada por Hartree (1972) y Marsh y Weinstein (1966) modificada por Mann y Dallaguer (1985).

Secciones longitudinales del cuerpo de la cápsula de **Concholepas concholepas** indican que la pared está constituida, desde el exterior al interior, por seis zonas claramente diferenciable: 1) una delgada cubierta externa con repliegues, 2) una delgada capa compacta homogénea externa, 3) una capa esponjosa, 4) una capa fibrosa, 5) una capa compacta homogénea interna y 6) una delgada lámina que tapiza la superficie interna de la cápsula.

La zona opercular de la cápsula posee idéntica composición que la zona media del cuerpo, sin embargo, presenta en su interior un tapón de material acidófilo.

El análisis cuantitativo de los componentes protéicos y de carbohidratos no muestra variaciones significativas entre los diversos estados analizados, sin embargo la composición lipídica presenta una leve tendencia a bajar en los estados previos a la eclosión

Financiamiento: **Recursos Propios**
Parcialmente fondos PNUD CHI/88/024

170

INTERACCION GAMETICA EN EL CAMARON DE ROCA *Rhynchocinetes typus*. (Sperm-egg interaction in the shrimp *Rhynchocinetes typus*.).

Dupré, E., Ríos, M.*, Bellolio, G. Universidad Católica del Norte, Coquimbo y P. Universidad Católica de Chile, Laboratorio de Embriología.

En la fecundación de *R. typus* el espermatozoide inmóvil debe atravesar tres cubiertas ovocitarias, después de lo cual se forma el cigoto por fusión de membranas. El núcleo ubicado en los rayos espermáticos se reorganiza para formar el pronúcleo macho. En este trabajo se han estudiado las características de las cubiertas y la formación del pronúcleo macho.

La cubierta más externa, corion, mide 0,5µm de espesor y presenta abundantes proyecciones filamentosas de 0.03µm de diámetro. La cubierta intermedia tiene un espesor de 0.85µm y la apariencia de una red laxa. Finalmente la envoltura más interna, membrana vitelina, tiene 4.2µm de espesor y la apariencia de red compacta. Estas cubiertas en geles de poliacrilamida-SDS presentan al menos 5 bandas de proteínas entre 180KDa y 48KDa. La inseminación in vitro es inhibida en 45% por 2.5 µM de SBTI.

Después de atravesar las cubiertas se forma el cigoto fusionándose la membrana plasmática del extremo del proceso acicular con las microvellosidades del ovocito. El núcleo que se encuentra en cada uno de los brazos, migra hacia la región del centro de los rayos donde se condensa, originando una formación semi-esférica con prolongaciones hacia los brazos. Junto con la condensación de la cromatina, comienza la desorganización de los componentes espermáticos, excepto la pieza de conexión que se encuentra presente hasta la metafase de la primera segmentación.

Financiado por proyecto Fondecyt 749-91 y Rockefeller GAPS 9101 a C. Barros. *Becaria P. Universidad Católica de Chile.

171

FECUNDACION EN EL OSTION DEL NORTE Argopecten purpuratus LAMARCK. (Fertilization in the scallop Argopecten purpuratus Lamarck).

Lohrmann, K. y Munizaga, R. Depto. Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo. (Patrocinio : Enrique Dupré M.).

El ostión del Norte Argopecten purpuratus se cultiva masivamente en nuestro país a partir de juveniles obtenidos tanto en el medio natural como en condiciones de laboratorio. Esto último implica controlar desde la fecundación hasta metamorfosis. El presente trabajo realiza una descripción del proceso de fecundación ya que existe escasa información al respecto en pectínidos.

Se fijaron ovocitos de 1', 5' y 10' post inseminación (p. i.) para MET y MEB con Karnovsky y post-fijaron con Tetróxido de Osmio reducido. Para microscopía de fluorescencia (MF) se fijaron ovocitos de 1', 5', 10', 20', 40' y 60' p.i. con una mezcla de glutaraldehído y formaldehído. Se aclararon en Carnoy (3:1) y tiñeron con Hoechst.

El ovocito es desovado en metafase I y presenta una cubierta vitelina en la cual se embeben microvellosidades. El espermatozoide, de tipo primitivo, sufre la reacción acrosómica quedando expuesta la membrana acrosomal interna que se contacta con una de las microvellosidades, iniciándose así la fusión de los gametos. No se observa reacción cortical. Con MF se observa la salida de los dos polocitos y la formación del pronúcleo masculino, primero en una posición cortical, y luego en posición central donde se contacta con el femenino sin llegar a fusionarse. Los cromosomas se condensan en cada pronúcleo, se desorganizan las envolturas nucleares y se forma el primer huso mitótico.

El proceso de fecundación en esta especie es similar a lo descrito en otros bivalvos.

172

ALTERACIONES MORFOLOGICAS EN EL EMBRION DE POLLO (Gallus gallus) por acción del etanol. (Morphological alterations in the chick embryo (Gallus gallus)by ethanol action).

Coloma S., L.; Illanes J. Dpto. Histología y Embriología, Universidad de Concepción. Dpto. Morf. Experimental, Universidad de Chile.

En embriología experimental se utilizan diversos métodos para analizar mecanismos causales del desarrollo, por ejemplo se recurre a sustancias químicas susceptibles de producir diferentes alteraciones en el transcurso de desarrollo embrionario, lo que suministra datos e información para el conocimiento deseado, es así como conocidos los adversos efectos provocados por el alcohol en el desarrollo embriofetal humano por ingesta de la madre gestante, se administró etanol para conocer su acción teratogénica en un modelo biológico correspondiente al desarrollo embrionario del pollo.

Se incubaron huevos fecundados de gallina a 38º C. Se inyectaron sus cámaras de aire con 0.1 ml de etanol, el grupo A el primer día y el grupo B al 4to. día, existiendo en ambos casos 3 subgrupos (inyectados con 20, 40 y 60% de etanol respectivamente). Los grupos controles fueron inyectados con el mismo volumen de solución fisiológica salina. Todos se extrajeron a los 11 días de incubación para realizar el análisis morfológico macro y microscópico.

Se pudo apreciar que todos los embriones tratados, manifestaron un retraso del crecimiento del cuerpo (en longitud de largo espinal y de extremidades superiores e inferiores) y disminución de su peso. Además presentaron diversas anomalías que comprometieron la morfogénesis a distintos niveles : craneofacial (del premaxilar, maxilar, retina del ojo, microftalmia, tejido nervioso encéfalico, etc.), presencia de vísceras evertidas, edema corporal, espina bífida de vértebras cervicales, etc.

Se concluye que el patrón de desarrollo normal analizado se observa notoriamente alterado al recibir el embrión de pollo dosis agudas de etanol absoluto al primer y cuarto día de incubación, mostrando los tratados un retraso en su formación y la presencia de anomalías que comprmeten a diferentes sistemas orgánicos

PROYECTO 203604 DIRECCION DE INVESTIGACION. UNIVERSIDAD DE CONCEPCION.

173

MORFOLOGIA Y FISIOLOGIA DE LAS CELULAS CILIADAS DE OVIDUCTO DEL CONEJO IN VITRO. (Morphology and Physiology of the rabbit oviductal ciliated cells in vitro). Villalón, M., Langley, L., y Verdugo P. Laboratorio. de Endocrinología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Center for Bioengineering, University of Washington, Seattle, USA.

La actividad ciliar en el oviducto de coneja ha sido propuesta como un componente importante para el transporte de los gametos en este órgano. Sin embargo, el conocimiento del control funcional de las células ciliadas en los mamíferos es escasa. Estudios realizados in vivo o in vitro sobre el control de la actividad ciliar, usando preparaciones frescas de epitelio ciliar pueden ser difíciles de interpretar debido a la presencia de moco y/o terminales nerviosos del tejido. La introducción de técnicas de cultivo de tejido para crecer células ciliadas del oviducto ha permitido controlar la carga hidráulica de los cilios y evitar las incertidumbres derivadas de la carga producida por la presencia del moco. Existe poca información sobre las características morfológicas y funcionales de las células ciliadas durante su desarrollo en cultivo. Este estudio describe el curso temporal de la ultraestructura, frequencia del batido ciliar y el efecto del ATP extracelular sobre dicha frequencia en células ciliadas del oviducto de conejo crecidas in vitro.

Trozos de mucosa del oviducto se cultivaron en Cámaras de Rose con medio de cultivo Eagle, en presencia de 10% de suero de caballo. Las cámaras se incubaron hasta 7 días a 37° C. La frequencia del batido ciliar se registró con la técnica de espectroscopía de dispersión de rayos laser.

Se observó que después de 5 a 7 días en cultivo, las células epiteliales forman una monocapa confluente 20-25 veces el área del explante original. Las células son poligonales, planas y con contornos bien definidos. Cada célula ciliada tiene en su centro un grupo de aproximadamente 150 cilios y el resto de la superficie está cubierta por microvellosidades. No se encontraron células secretoras durante el período observado. La frequencia de la actividad ciliar fué de 23±1.9 (Promedio ± DE). En cultivos de 5-7 días la frequencia aumentó en un 60% al agregar 100 µM de ATP.

Estos resultados muestran que la técnica empleada para cultivar células ciliadas in vitro es un excelente modelo para describir la actividad ciliar y estudiar los mecanismos de control fisiológico en células ciliadas de mamíferos.

Financiado por la Rockefeller Foundation 89033 y DIUC 91/03E

174

CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DEL RECEPTOR H1 DE HISTAMINA EN MIOMETRIO HUMANO Y DE RATON: EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES. Rodrigo González, Verónica Neumann. Departamento de Farmacología, Universidad de Concepción.

En el miometrio, el contenido de histamina, aumenta a medida que progresa la gestación y luego disminuye hasta niveles controles horas después del parto. En presencia de prostaglandinas, histamina es un ocitócico potente, por lo que nos pareció importante caracterizar sus receptores y analizar la influencia de las hormonas sexuales y la gestación.

Mediante estudios de inhibición de la unión de ^{3}H-histamina a membranas de útero de humanos y de ratón se demostró la presencia de dos sitios receptores para histamina. El de mayor afinidad, dadas sus características farmacológicas, corresponderia al receptor H1 de histamina (CI_{50}: 50nM y 100nM para humano y ratón respectivamente), el cual mediaria la respuesta contráctil del miometrio, en cambio el de menor afinidad (CI_{50}:8.9µM y 10µM respectivamente) corresponderia a un sitio receptor $H2_3$

Estudios de saturación con ^{3}H-pirilamina en membranas de útero humano, demuestran que al final la gestación el receptor H1 aumenta su afinidad (K_d: 61.3 ± 8.4nM). Esto último también se observó en el útero de ratón (K_d: 71 ± 5.3nM gestante y 130 ± 11nM no gestante en estro bajo predominio de estrogenos y 102 ± 3.5nM no gestante en diestro bajo predominio de progesterona).

Todos los estudios demostraron que, en ambas especies, el receptor H1 no posee cooperatividad.

Proyectos FONDECYT 91-0365 y D.I. U. de C.20.33.56.

175

NIVELES SERICOS DEL FACTOR UTEROTROFICO PLACENTARIO BOVINO (bUTPF) POR ENZIMOINMUNOANALISIS (Serum levels of bUTPF by Enzyme Immuno assay). Iñiguez,G.,Galanti,M.,Boric,M.A.,Ferrando,G. y Muñoz,B. Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) Facultad de Medicina,Facultad de Ciencias Veterinarias,Facultad de Agronomía, Universidad de Chile.

El Factor Uterotrófico Placentario bovino (bUTPF) es una proteína obtenida de placentas bovinas a término.
El objetivo de este trabajo es determinar los niveles séricos de bUTPF durante la gestación en bovinos y observar si al igual que en humanos (con hUTPF) se encuentra un pico de secreción durante las primeras semanas de gestación.
se desarrolló un Enzimo Inmuno Análisis (EIA) de tipo competitivo encontrándose que es lineal entre 0,1 y 100 ug. de proteína placentaria por ml.
Se colectaron muestras séricas bovinas que se distribuyeron en 10 grupos : Grupo 0 no preñadas,Grupos 1 al 9 corresponden a 1 a 9 meses de gestación respectivamente (cada grupo de 10 animales).
Los resultados obtenidos en las muestras séricas por el EIA desarrollado se muestran en la tabla siguiente :

GRUPO	bUTPF ug/ml +/- EES	GRUPO	bUTPF ug/ml +/- EES
0	1,7 +/- 0,3	5	2,0 +/- 1,3
1	7,5 +/- 1,5	6	1,5 +/- 1,5
2	3,5 +/- 1,0	7	1,8 +/- 0,7
3	3,0 +/- 0,8	8	2,7 +/- 1,0
4	2,8 +/- 1,0	9	3,3 +/- 0,8

EES = Error estándar de la media

Se observa que los niveles séricos de bUTPF son significativamente mas altos durante el primer mes de gestación comparado con el estado de no gestación (grupo 0)
En base a estos resultadns las mediciones séricas de bUTPF podrían tener aplicación en el diagnóstico precoz de gestación en bovinos.

Proyectos Fondecyt 183-88 T y OMS 89004

176

FRACCIONAMIENTO DE hUTPF POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION Y AFINIDAD,ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS E INMUNOTRANSFERANCIA.(hUTPF Fractionation by Filtration and Affinity Chromatography,PAGE-SDS and Immunoblotting). Pérez,E.,Beas,F.Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI),Facultad de Medicina,Universidad de Chile.

El Factor Uterotrófico Placentario humano (hUTPF) es una proteína obtenida de placentas humanas de término;se han descrito acciones biológicas a nivel uterino,en glándula mamaria y en cultivos de embriones pre-implantacionales.En mujeres presenta un pico de secreción en las primeras semanas de gestación
En placentas humanas de término se realizaron extracciones salinas y ácidas obteniéndose un extracto ácido (EA).El EA se cromatografió en Sephadex G-75 obteniéndose la actividad biológica e inmunológica en la fracción excluída del gel,esta fracción se cromatografió en Sephadex G-200,resolviéndose en tres fracciones,todas con actividad inmunológica.La fracción excluída del G-200 después de ser purificada por cromatografía de afinidad en Concanavalina A Sefarosa presentó,en geles de PAGE-SDS en gradiente del 3 a 12 %, principalmente 3 fracciones cuyos Pesos Moleculares fueron: 270 KD, 51 KD y 27 KD.Estas 3 fracciones fueron reconocidas por Inmunotransferencia con el antisuero generado contra la fracción excluída del G-200 (resultados también observados mediante un EIA desarrollado en nuestro laboratorio).
estos resultados muestran que hUTPF obtenida de placentas presenta al menos tres formas moleculares.Será necesario investigar cual o cuales de éstas presentan la actividad biológica y cual o cuales son las formas circulantes en el plasma.

Proyecto Fondecyt 183-88 T y OMS 89004

177

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ENZIMA(S) TIPO CALICREINA EN UTERO DE RATA DURANTE LA PREÑEZ TEMPRANA (Isolation and characterization of kallikrein-like enzyme(s) in rat uterus during early pregnancy). Valdés.G., Corthorn.J., Gaete, V., Soto.J., Foradori, A. Centro de Investigaciones Médicas y Laboratorio Medicina Nuclear. Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

En útero de rata, durante el ciclo estral y la preñez, hemos demostrado inmunoreactividad utilizando un anticuerpo policlonal para calicreína(CAL) urinaria de rata. En la gestación, esta reacción coincide con las áreas de aumento del flujo sanguíneo (Clin. Exper. Hyper. and Hyper. Pregnancy B10:97,1991). El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar el antígeno uterino.

Uteros de ratas no preñadas y de 7 días de preñez, perfundidos con salino e inmediatamente congelados en N2 líquido y guardados a -80°C, fueron homogenizados y sometidos a cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y a filtración en Sephadex G-150. Las fracciones fueron analizadas mediante RIA usando anticuerpo poli y monocional contra CAL urinaria de rata. Tanto los homogenizados crudos como las fracciones eluídas produjeron con ambos anticuerpos una curva paralela a la de la curva estandar de CAL urinaria pura. La actividad cininogenásica se determinó por RIA de bradicinina, incubando las fracciones con cininógeno de rata parcialmente purificado. La actividad cininogenásica y la CAL inmunoreactiva coeluyeron entre 0.2 y 0.3 M NaCl. Las actividades inmunológica y enzimática aumentaron durante la preñez. La actividad cininogenásica se manifestó después de activar con tripsina, indicando que la enzima se encuentra en forma latente. Esta actividad enzimática fue inhibida por aprotinina, y no por por otros inhibidores de tripsina como SOYA BEAN y OVOMUCOIDE.

Estos resultados demuestran que el útero de rata contiene una serina-proteasa capaz de generar cininas, relacionada inmunológicamente con CAL glandular. La presencia de enzima cininogenásica, tipo CAL, apoya el rol sugerido para el sistema CAL-cininas en la regulación del flujo uterino de la preñez establecida y lo implica en los fenómenos vasoactivos de la implantación.

178

LA ADMINISTRACION DE OVUM-FACTOR A RATONAS PSEUDOPREÑADAS REVIERTE SU AUSENCIA DE RESPUESTA EN EL TEST DE INHIBICION DE ROSETAS. (Ovum factor administration to pseudopregnant mice can reverse it's lack of response in the Rosette Inhibition Test). Fuentes, A., Smith, R., Anido, M. y Alba, J. Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI). Hospital Clínico San Borja - Arriarán. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

La unión de "early pregnancy factor" (EPF) a linfocitos T estimula la liberación de moléculas solubles efectoras, con potencial inmunosupresivo en el paradójico contexto inmunológico materno fetal. La actividad EPF es sensiblemente detectada por el test de inhibición de rosetas (RIT), en el cual el suero de una embarazada precoz ejerce una actividad inhibitoria sobre la capacidad de los glóbulos rojos de cordero o de inmunoesferas anti-IgG, IgM e IgA para adherirse a sitios específicos de la membrana citoplasmática de los linfocitos T. A través del fraccionamiento con sulfato de amonio se ha establecido que a la formación de EPF concurren dos componentes producidos por: el oviducto (EPF-A) y el cuerpo lúteo gravídico (EPF-B). En los estadíos pre-implantacionales el conceptus es incapaz de ejercer actividad EPF; sin embargo, libera al medio una glicoproteína denominada Ovum Factor (OF). Este factor es imprescindible para que los componentes EPF-A y EPF-B puedan ejercer su rol en el RIT. El suero de ratonas pseudopreñadas no produce acción alguna sobre el RIT, a pesar de que este animal es capaz de secretar EPF-A durante el estro. Nosotros cultivamos embriones de 4 a 6 células durante 24 horas rescatando el medio de cultivo después de este plazo y administrándoselo intraperitonealmente a ratonas pseudopreñadas en el día 1 después del cruzamiento. Los animales fueron sacrificados a las 24 horas con el propósito de medir actividad EPF en suero a través del RIT. Los resultados hasta el momento establecen una diferencia en la capacidad de inhibir el RIT entre casos y controles. De mantenerse esta tendencia ellos sugerirían la importancia de este factor en el diálogo inmunitario embrio-materno pre-implantacional.

(Financiado parcialmente por OMS, Grant # 89182 e IDIMI).

179

CARACTERIZACION HISTOQUIMICA Y FUNCIONAL DE CELULAS CEBADAS DE RATON. (Functional and histochemical characterization of mouse mast cells). J.Navarrete, K.Reinicke (Patrocinio: M.I.Rudolph). Departamentos de Farmacologia y de Histologia y Embriologia, Universidad de Concepción.

El conocimiento actual referente a las células cebadas sumado a las evidencias experimentales obtenidas en nuestro laboratorio han permitido postular la posible participación de las células cebadas uterinas en el trabajo de parto.
Como una forma de conocer mas detalladamente las caracteriticas funcionales de estas células, se están implementado técnicas que permitan estudiar su comportamiento frente a la acción de diferentes mediadores endógenos y de algunos fármacos capaces de favorecer o inhibir su degranulación.
El modelo experimental utilizado es el de cuernos uterinos de ratón donde se ha estudiado la liberación de histamina desde tejido intacto y se ha procedido a aislar células cebadas para observar, bajo microscopio, su capacidad de degranular ante diferentes condiciones experimentales.
Se ha observado que estas células cebadas son degranuladas por efecto de A23187(0.2 µg/ml), veratrina(10 µg/ml), veratridina(10 µM), en cambio son insensibles a la acción del compuesto 48/80(6µg/ml) y a soluciones que contienen K (100 mM). Estos resultados coinciden con la medida de la liberación de histamina desde tejido intacto. Por otro lado, se ha observado que las células cebadas obtenidas de animales en estro (predominio hormonal de estrógenos), son mas susceptibles a ser degranuladas que las de animales en diestro (predominio hormonal de progesterona).
Proyectos FONDECYT 91-0365 y D.I.U.de C.20.33.56 y 913605-1

180

EFECTO DE INHIBINA BOVINA 32K Da SOBRE LA SECRECION DE GnRH IN VITRO. (Effect of 32K Da bovine inhibin on GnRH secretion in vitro). Castillo, R.J., Instituto de Fisiología, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: S.G. Espinoza.

Aún persiste controversia sobre el mecanismo de acción de inhibina y se postula que además de actuar a nivel hipofisiario, podría involucrar centros superiores relacionados con el control de la secreción de GnRH. Se investiga el posible efecto de esta hormona sobre la secreción de GnRH in vitro. En este estudio se perfundieron eminencias medias basales (EMB) de ratas Sprague-Dawley machos adultos con Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) gasificado por 20 min. con 95% O_2 y 5% CO_2 + bacitracina 0.03%. Se realizaron perfusiones simultáneas (6 cada vez) a 37°C con flujo constante de 25 ul/min. En cada experimento se trabajó igual número de EMBs en ausencia (CONTROL) o en presencia de inhibina (5 y 25 ng/ml). Las perfusiones duraron 6h y al término de la hora 4 se reemplazó el medio de perfusión por DMEM + bacitracina + K^+ (40 mmol/l) para inducir depolarización del tejido hipotalámico. Se recolectaron fracciones (375 ul) cada 15 min a 4°C y se almacenaron a -20°C para la determinación de GnRH por RIA.

La presencia de inhibina 5 y 25 ng/ml no modificaron significativamente (p 0.005) la secreción de GnRH basal o inducida por potasio.

	Control n=5	INH 5 n=6	Control n=5	INH 25 n=5
Basal	13.4 ± 1.9	9.2± 4.9	30.3± 8.25	39.2± 10.2
K^+	79.9 ± 5.8	62.7± 11.7	202.4± 34.40	222.8± 6.0

Valores = pg GnRH/EMB al final hora 4.

Estos resultados proporcionan evidencia preliminar de que el hipotálamo no participa en la génesis del efecto supresor de la secreción hipofisiaria de FSH por parte de inhibina bovina 32K Da.

181

OVARIO POLIQUISTICO 1:CAMBIOS EN LA SINTESIS,CONTENIDO Y LIBERACION DE CATECOLAMINAS EN HIPOTALAMO DE RATA.*(Polycystic ovary 1:Changes in the synthesis,content and release of catecholamines of the rat hypothalamus.)Luza,S. Vecchiola,A.Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.U de Chile.(Patrocinio:H.Lara P.)

El ovario poliquístico(PCO),es una patología de alta incidencia en humanos.En PCO hemos encontrado un aumento en la liberación y el contenido de Norepinefrina(NE) del ovario,lo que nos sugiere un aumento en la actividad nerviosa.Se sugiere que esta vía nerviosa tendría su origen en el hipotálamo,razón por la cual estudiamos,la actividad de Tirosina hidroxilasa(TH) y de Dopamina-B-hidroxilasa(DBH);el contenido de NE y Dopamina(DA) y la incorporación y liberación de ^{3}H-NE en hipotálamo anterior(HA) y medio(HM) de ratas con PCO.En HA la actividad de TH y DBH presentó variaciones durante el ciclo estral.Al contrario de la DBH,la mayor actividad de TH apareció durante el estro.En ratas con PCO la actividad de TH correspondió a los valores bajos del ciclo,mientras que la actividad de DBH a los altos.En HM,ni TH ni DBH variaron durante el ciclo estral.En ratas con PCO se observó una leve disminución de actividad para DBH.Tanto para HA e HM,el menor contenido de NE se encontró en el PE al igual que en ratas con PCO.Esto correlaciona con el bajo contenido de DA encontrado en HA.No hubo cambios en la liberación de ^{3}H-NE durante el ciclo estral ni en HA ni en HM, sin embargo una población de ratas con PCO presentó un gran aumento en la liberación desde HA y otra fué similar a los controles.En ningún caso hubo cambios para el HM.La baja actividad de TH y de contenido de DA en HA de ratas con PCO sugiere una inhibición en neuronas dopaminérgicas del HA.Además,el aumento en la liberación de NE en el HA,sin aumento en su contenido,sugiere que en ratas con PCO,se estaría activando el pool de fácil liberación desde neuronas noradrenérgicas.

*Financiado por DTI 2750-9033,The Rockefeller Fundation y Fondecyt 90-1001.

182

OVARIO POLIQUISTICO 2: CAMBIOS EN LA SECRECION DE ESTEROIDES OVARICOS. PARTICIPACION DE LA INERVACION SIMPATICA*. (Polycystic ovary 2: Changes in ovarian steroid secretion. Role of sympathetic innervation). Barría,A., Lara, H. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. U. de Chile.

La secreción de esteroides es regulada por gonadotrofinas y por la activación de receptores B-adrenérgicos presentes en las células secretoras ováricas.

En el ovario poliquístico (PCO) aumentan los andrógenos (A) y el estradiol (E2) plasmático,y la densidad de fibras noradrenérgicas. La inducción de PCO en rata interrumpe la ciclicidad estral, disminuye el tamaño y peso de los ovarios y aumenta la actividad nerviosa ovárica. En este trabajo analizamos si esta activación resulta en un incremento en la secreción de esteroides ováricos.

En rata la secreción de progesterona (Pg),A y E2 cambió durante el ciclo estral. La menor secreción espontánea de Pg ocurrió durante la mañana del proestro (ePE), y aumento en el estro (E) y en el metaestro (ME). La secreción de A y E2 fue máxima en ePE. La presencia de Isoproterenol (I) y de hCG estimuló la secreción de Pg, siendo máximo el efecto en el E y el ME. El I no estimuló la secreción de A ni de E2, pero potenció el efecto de hCG sobre A en ePE y sobre E2 en el ME.

En ovarios de ratas con PCO aumentó considerablemente la secreción espontánea de Pg,A y E2. La secreción de Pg se estimuló con I, hCG y hCG más I, alcanzando valores más altos que los controles, pero no alteraron la secreción de E2. La secreción de A fue similar al ePE. Al denervar el ovario se recuperó la ciclicidad de las ratas. A los 10 días se produjo un aumento en el peso y tamaño de los ovarios y disminuyó la secreción de esteroides a valores cercanos a los normales.

Estos resultados apoyan fuertemente la idea que durante el PCO hay una activación nerviosa que mantiene la alta actividad secretora característica de la patología.

(*)Financiado por:DTI 2750-9033,The Rockefeller Foundation y Fondecyt 90-1001.

183

ESTUDIO MORFOFUNCIONAL DE SUBPOBLACIONES DE CELULAS LUTEAS HUMANAS (Morphofunctional study of subpopulations of human luteal cells). Oksenberg, D.; Castro, O.; Retamales, I. y Devoto, L. Instituto de Investigaciones Materno-Infantil, Deptos. Biol.Cel. y Gen. y Ob/Gin. Central, Hosp. Clín. San Borja-Arriarán, Fac.de Medicina, U. de Chile. (Patrocinio : M. Vega).

Se ha descrito en primates y no primates que el CL posee dos subpoblaciones celulares con distinta morfología y distinta capacidad de síntesis de esteroides. Con el objeto de establecer la morfología y de estudiar la capacidad esteroidogénica y su regulación en estos tipos de células lúteas en el humano, se obtuvieron CL 5-9 ds post pico de LH. Un trozo de cada CL fue preparado para histología, teñido con hematoxilina-eosina, el resto fue dispersado con colagenasa y DNasa. Luego de separar los glóbulos rojos de las células lúteas por ficol, las subpoblaciones fueron obtenidas por gradiente discontinuo, 5-40% de percol, obteniéndose una banda con mezcla de células grandes (CLG) y pequeñas (CLP) (A, 10% percol) y una banda enriquecida en CLP (B, 20% percol). A y B fueron cultivadas en M-199, 24 h 37°C, 5% CO_2/aire, con o sin hCG (10 UI/ml), dbcAMP (1 mM), E_2 (2,5 µM), T (10^{-4} M). P y E_2 fueron determinados por RIA específicos y la morfología por morfometría. Los resultados histologicos indican que las CLG tienen un diámetro de 22-35 µm y las CLP de 12-22 µm, siendo el 40,8% CLG y el 51,5% CLP. La síntesis in vitro de P aumentó 2,5 veces con hCG y dbcAMP, en tanto en CLG + CLP (A) el aumento fue de 1,5 veces. En presencia de T, la síntesis de E_2 en CLP incrementó 7,5 veces, siendo de 1,6 veces en CLG + CLP. Estos resultados confirman que el tamaño de los dos tipos celulares en CLh es semejante al de otras especies y además, sugieren que ambos tipos celulares sintetizan P y E_2, pero las CLP responden mejor a la hCG, además de poseer un sistema aromatasa más activo. (Proyecto DTI M-3205).

184

LUTEOLISIS : PRODUCCION DE ESTEROIDES Y DE GLUTATION REDUCIDO (GSH) EN CELULAS LUTEAS HUMANAS. (Luteolysis : Steroids and GSH production by human luteal cells). Castillo, T.; Troncoso,J.L. y Vega, M. IDIMI, Deptos. Biol.Cel. y Gen. y Ob/Gin. Central Hosp.Clín. San Borja-Arriarán, Fac. de Medicina, U. de Chile.

La luteólisis o pérdida de la capacidad de síntesis de progesterona (P) en el CL se relaciona con el proceso natural de envejecimiento en este tejido. Existen antecedentes en animales de experimentación que sugieren que los radicales libres tendrían un rol en la regulación de la capacidad esteroidogénica en estas células. El objetivo de este trabajo es estudiar el posible rol de los radicales libres en el envejecimiento natural de las células lúteas humanas. CLh, 4-8 ds y 9-14 ds post-ovulación (CL Int y CL Tar) (por ecografía y biopsias CL y endometrio), fueron tratadas con colagenasa y DNasa. Luego, las células lúteas fueron cultivadas en M-199, 24 h a 37° C, 5% CO_2/aire. Se midió niveles basales y tratados con hCG (10 UI/ml), E_2 (2,5 µM), Indometacina (Ind, 10 µg/ml), de la síntesis de esteroides, relacionándolos con los niveles de GSH, importante metabolito protector del efecto de los radicales libres en las células. La medición de esteroides fueron por RIA específicos y la de GSH por el método de Tietze (Anal Biochem 27, 502-522, 1969). Los niveles basales de P en CL Int fueron de 54,3 ng/10^6 cél/24 h, aumentando en 2,5 veces con hCG y disminuyendo al 50% con E_2. En CL Tar, los valores basales de P fueron de 48,2 ng/10^6 cél/24 h e Ind no los modificó. Resultados preliminares de determinación de GSH indicarían que hCG los estimula moderadamente en CL Int y mayormente en CL Tar (1,2 vs 2,0 veces). Con Ind la producción de GSH disminuyó en un 70%. Estos resultados premilimares, nos sugerirían que las PG no afectarían la síntesis de P en CL Tar y que hCG tendría aparentemente, un efecto protector de la síntesis de esteroides al envejecer este tejido. (Proyecto FONDECYT 1272).

185

ACCION MODULADORA DE LOS ESTEROIDES OVARICOS SOBRE LA RESPUESTA A GnRH DE CELULAS ADENOHIPOFISARIAS DE RATA EN CULTIVO PRIMARIO. G.I. Pérez y M.E. Apfelbaum, Cat. de Fisiología, Depto. de Farmacología, Fac. de Ciencias Químicas, UNC. Córdoba, Argentina. El propósito del estudio fue evaluar los efectos agudos y crónicos de estradiol (E2), progesterona (P) y dihidrotestosterona (DHT), solos y en combinación, sobre la liberación y síntesis de LH inducida por GnRH. Células, de ratas ovariectomizadas, fueron cultivadas por 72 h en medio libre de esteroides y preincubadas por 24 h en medio con o sin 1 nM E2, 100 nM P ó 10 nM DHT. Los cultivos se incubarón luego por 5h en ausencia (basal) o presencia de 1 nM GnRH o en medio con o sin esteroides y/o GNRH. LH se medió en el medio y extracto celular por RIA. Los resultados muestran que los esteroide ejercen efectos opuestos sobre liberación de LH inducida por GnRH dependiendo del tiempo de tratamiento. En efecto, 5 h de tratamiento con E2 resultó en una parcial inhibición (64% del valor control) de la liberación de LH en respuesta a GnRH, mientras que la exposición de 24h aumentó (158%) la liberación de LH inducida por GnRH. DHTprovocó un efecto similar aunque de menor magnitud. Inversamente, el tratamiento por 5 h con P aumentó (118%) mientras que el tratamiento por 24 h levemente disminuyó la respuesta a GnRH. La síntesis de LH estimulada por GnRH también fue influenciada por esteroides. Se obsevó también un aumento en los niveles de LH en células tratadas con E2 y DHT. El tratamiento combinado de E2 (24 h) seguido por P (5 h) resultó en un marcado incremento en liberación y contenido total de LH inducidos por GnRH. Contrariamente, DHT (5 h) revirtió el efecto estumulador del pretratamiento con E2 (24 h). En consecuencia se demuestra que la acción secuencial de E2, P Y DHT jugaría un importante rol en la modulación de la secreción ciclica de gonadotrofinas en la hembra.

186

EFECTOS DE RU486 SOBRE EL CRECIMIENTO OVARICO INDUCIDO POR DIETILESTILBESTROL (DES) Y GONADOTROFINA SERICA (PMSG) EN RATA INMADURA. (Effect of RU486 on ovarian growth induced by DES and PMSG in inmature rats). Forcelledo, M.L. Instituto Chileno de Medicina Reproductiva (ICMER) y Unidad de Reproducción y Desarrollo, Facultad Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

RU486 (RU) es una antiprogestina que se une al receptor de progesterona (P) bloqueando su acción biológica. En la mujer inhibe el desarrollo folicular por mecanismos aún no establecidos. Se investigó, el efecto de RU sobre el crecimiento ovárico estimulado por DES y sobre la ovulación inducida por PMSG en ratas inmaduras intactas o 24 h después de hipofisectomizadas (HPX). Ratas de 26 días de edad recibieron 10 UI de PMSG ip o 2 mg de DES sc con o sin 0.8 mg RU durante 3 días. La autopsia se realizó 72 h después de iniciados los tratamientos. Se registró el número de ovocitos ovulados, el peso ovárico, número y estado de los folículos. En ratas intactas, el aumento del peso ovárico y la incidencia de folículos atrésicos producido por DES, fue mayor en presencia de RU. En ratas tratadas con PMSG, RU aumentó el número de ovocitos ovulados y el peso ovárico. Estos efectos de RU no se observaron en ratas HPX. Los datos sugieren que: 1. El desarrollo folicular estimulado por DES o PMSG es frenado por acciones de P. 2. El efecto de RU sobre el crecimiento ovárico inducido por DES o PMSG, es cualitativamente diferente en presencia o en ausencia de la hipófisis.
FONDECYT 0818/90 y RF 88077.

187

EFECTO ANTIFOLICULOGENICO DE LA ANTIPROGESTINA RU-486 EN LA MUJER. (Antifolliculogenic effect of the antiprogestin RU-486 in women). Croxatto, H.B., Salvatierra, A.M., Fuentealba, B.
Instituto Chileno de Medicina Reproductiva y Unidad de Reproducción y Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

RU-486 es un esteroide sintético que bloquea la acción de progesterona. Administrado en la fase folicular del ciclo (10-100 mg/día p.o.) interfiere con el crecimiento del folículo dominante lo que sugiere un rol de progesterona en este proceso. Se estudió el efecto de RU-486, 1 y 5 mg/día por 30 días, a partir del día 1 del ciclo, sobre crecimiento folicular y parámetros endocrinológicos y el efecto de 5 mg de RU-486 en dosis única administrada cuando el diámetro folicular era de 10 $\pm$ 2 mm, sobre crecimiento folicular y pulsatilidad plasmática de LH medida 12-17 h post tratamiento. La dosis de 5 mg/día, pero no 1 mg/día por 30 días, inhibió el crecimiento folicular durante el tratamiento y alargó el ciclo (25 $\pm$ 2 días, control vs 56 $\pm$ 3 días, tratado, X $\pm$ SD, n=5) a expensas de la fase folicular. La dosis única de 5 mg (n=4) detuvo transitoriamente el crecimiento folicular entre 12 y 36 h después del tratamiento con tendencia a una caída de LH inmunoreactivo (4.5 $\pm$ 1.6 vs 3.5 $\pm$ 1.3 mUI/ml) y menor amplitud de pulsos (1.05 $\pm$ 0.5 vs 0.78 $\pm$ 0.4 mUI/ml) sin cambios en su frecuencia (1.2 $\pm$ 0.5 vs 1 $\pm$ 0.3/h). Se concluye que la dosis mínima efectiva para inhibir el desarrollo folicular en la mujer está entre 1 y 5 mg/día, que este efecto aparece pocas horas después de una dosis única, es reversible y podría estar mediado por una alteración en la secreción de gonadotrofinas.
FONDECYT 818/90, HRP 87113 y RF 88077.

188

EFECTO DE PROPRANOLOL SOBRE LA FERTILIDAD EN LA RATA. (Effect of Propranolol on fertility in the rat). Llados, C., Prieto, C.R.
Unidad de Reproducción y Desarrollo, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
(Patrocinio: H.B. Croxatto).

El bloqueador B-adrenérgico Propranolol (PRO), inhibe la motilidad de espermatozoides por mecanismos aún no establecidos. Se evaluó el efecto de tratamientos pre o postcoitales con PRO sobre la fertilización en la rata. Ratas apareadas entre 8 y 9 AM del estro, se inyectaron sc a las 9 AM con 20, 40 u 80 mg de PRO o 0.2 ml de propilenglicol. Otro grupo de ratas, se inyectó en la tarde del proestro con 1 o 4 mg PRO en un cuerno uterino, dejando el contralateral como control. En día 1 o 2 de preñez (P1 o P2) se registró % de huevos penetrados, estado de desarrollo y número de espermatozoides en el ámpula. La administración pre o postcoital de PRO, disminuyó el % de huevos penetrados en P1 de un modo dosis dependiente, sin alterar significativamente el número de espermatozoides recuperados del ámpula. El número de huevos penetrados después de la administración postcoital de PRO fue mayor en P2 que en P1 pero el % de huevos desarrollados en P2 fue semejante al de huevos penetrados en P1.

Se concluye que PRO inhibe la fecundación de algunos huevos y retrasa la de otros, afectando su ulterior desarrollo, por una acción local dentro del tracto genital que no involucra déficit de espermatozoides en el sitio de fecundación.
RF 88077.

189

FUNCION DE LA α-MSH EN LOS PROCESOS REPRODUCTIVOS. María E. Cobe, P.Durando y T.Scemonelli. Cat. de Fisiología, Depto. de Farmacología,Fac. de Cs.Químicas, UNC, Córdoba,Argentina. La función desempeñada por la α-MSH en la regulación de los procesos reproductivos de la rata ha sido demostrada por nosotros. Así, se ha observado la existencia de una correlación temporal entre la descarga la α-MSH y la (LH) en el día del proestro, además se ha demostrado que el péptido ejerce un efecto sobre la receptividad sexual en la rata adulta. La administración aguda de α-MSH a ratas prepúberes pretratadas con benzoato de estradiol adelanta el tiempo de apertura vaginal (AV) y modifica el perfil de secreción de determinadas hormonas involucradas en este evento. Asi mismo se determinó que el tratamiento aumento los niveles déricos tanto de LH como de progesterona, en el día previo al AV. Si bien se observarón incrementos en los niveles de la hormona de crecimiento y PRL en determinadas horas, estos no alcanzaron significación estadística. Estos resultados indicarían que el péptido modularía la liberación de LH y P, modificando por intermedio de estas hormonas el tiempo de apertura vaginal. En ratas adultas, la infusión continua de α-MSM en eminencia media (EM) desde la tarde del diestro2 y durante todo el proestro (PE) inhibe el pico característico de liberación de LH y PRL dde la tarda del PE y consecuentemente la ovulación. Un efecto similar se observa en ratas cronicamente ovariectomizadas, en las cuales una inyección única de αMSH en EM disminuye significativamente los niveles plásmáticos de LH y PRL. Este efecto estaría mediado por el sistema tubero-infundibular dopaminérgico, ya que el tratamiento previo con un bloqueante dopaminérgico (haloperidol) impide el efecto inhibitorio de α-MSH. Estos resultados sugieren que el α-MSH hipotalámico participa en la regulación de la liberación de PRL y LH afectando al sistema dopaminérgico. Los resultados expuestos muestran que α-MSH participa, tanto a nivel central periférico, en los procesos reproductivos modulando la liberación de hormona fundamentales en dichos procesos.

190

ESTUDIOS SOBRE EL ORIGEN DE LA SEROTONINA EN EL UTERO. (Studies on the origin of serotonin in the uterus)
C.Oviedo, M.I.Rudolph. Departamento de Farmacologia, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

La serotonina ha demostrado poseer una gran potencia uterotónica, tanto en mamiferos inferiores como en humanos, efecto que se intensifica a medida que progresa la gestación. La localización precisa de este neurotransmisor en el útero no se conoce aún. Aunque es probable que en ratón esté colocalizada con histamina dentro de las células cebadas, tampoco se descarta la posibilidad que este tejido posea una inervación serotoninérgica.

Se llevaron a cabo estudios neuroquimicos en los cuales se analizó tanto la captación como la liberación de 3H-5HT en cuernos uterinos de ratón en los estadios estro y diestro del ciclo estral para determinar además una posible regulación de parte de las hormonas sexuales sobre la actividad de este sistema.

La captación fué dependiente de la temperatura, a 37°C presentó una Km aparente de 15,45 μM. Además fué dependiente de la presencia de sodio en el medio de incubación. La liberación evocada por K alto (100 mM) fue dependiente de calcio extracelular y significativamente menor que aquella evocada por estímulo eléctrico y veratridina (10 μM).

Los resultados permiten concluir que en el útero de ratón la serotonina estaria almacenada tanto en células cebadas como en terminales nerviosos.

Proyectos FONDECYT 91-0365 y D.I. U. de C.20.33.56.

191

FUNCION DE LA α-MELANOTROFINA (α-MSH) EN LOS PROCESOS REPRODUCTIVOS. (Physiological role of α-Melanotrophin hormone in reproduction). Celis, M.E., Durando,P., Scimonelli,T. Dpto. Farmacología, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
(P. E. Rodríguez)

Hemos observado en nuestro laboratorio la existencia de una correlación temporal entre la descarga de α-MSH y de hormona luteinizante (LH) en el día del proestro; además se ha demostrado que este péptido ejerce un efecto liberador de LH y prolactina (PRL) y estimulador de la receptividad sexual en la rata adulta. La administración aguda de α-MSH a ratas prepúberes pretratadas con benzoato de estradiol adelanta el tiempo de apertura vaginal (AV) y modifica el perfil de secreción de determinadas hormonas involucradas en este evento. Se determinó que este tratamiento incrementa significativamente los niveles séricos de LH en el día previo a la AV. Mientras la concentración de progesterona (P) presenta variaciones significativas en este período, estrógeno y testosterona, no modifican su perfil de secreción por el tratamiento con el péptido. Estos resultados indicarían que el péptido modularia la liberación de LH y P, modificando por intermedio de estas hormonas el tiempo de apertura vaginal. En ratas adultas, la infusión continua de α-MSH en eminencia media (EM) desde la tarde del diestro, y durante todo el proestro (PE) inhibe el pico característico de liberación de LH y PRL de la tarde del PE y consecuentemente la ovulación. Este efecto estaría mediado por el sistema tubero-infundibular dopaminérgico, ya que el tratamiento previo con un bloqueante dopaminérgico (haloperidol) impide el efecto inhibitorio de α-MSH. Estos resultados sugieren que el α-MSH hipotalámico participa en la regulación de la liberación de PRL y LH afectando al sistema dopaminérgico. Los resultados expuestos muestran que α-MSH participa, tanto a nivel central como periférico, en los procesos reproductivos.

192

DESAPARICION DEL TONO OPIOIDE MODULADOR DE LA SECRECION DE HORMONA LUTEINIZANTE EN OVEJAS PREPUBERES EN AYUNO (Disappearance of modulatory opioidergic tone on luteinizing hormone secretion in fasting ewe lambs).
Recabarren,S.E.; Lobos,A.;Gómez,J.;Orellana,P.; Parilo,J.; Lab. de Fisiología y Endocrinología Animal, Universidad de Concepción, Chillán.

Estudios anteriores demuestran que borregas subalimentadas no presentan tono opioide inhibidor de la secreción de LH. Por el contrario experimentos en ratas sugieren que el ayuno suprime la secreción de LH mediante la activación de vías opioidérgicas. Se desconoce si el comportamiento de ovejas prepúberes es similar a la situación presentada en las ratas o a la de borregas subalimentadas. Por lo tanto, se sometieron ovejas prepúberes (n=8) a un ayuno total por 192 h. A las 24, 48, 96 y 192 h. del ayuno se les administró un pulso de naloxona (NAL, 1.5 mg/kg) vía endovenosa para reconocer el efecto de corto y largo plazo del ayuno, y se midió la concentración de LH en muestras de sangre obtenidas antes y cada 20 min después de la NAL por una hora. Se midieron además, los niveles plasmáticos de glucosa y el peso corporal. Los niveles plasmáticos de glucosa descendieron desde 0.84+/-0.07 a 0.51 +/- 0.07 y el peso corporal desde 20.5+/-0.5 a 17.4+/-0.6 kg ($P < 0.05$). La administración de NAL provocó aumento en la LH plasmática en ovejas controles y en aquellas con ayuno de 24 h. A las 48, 96 y 192 h de ayuno no hubo respuesta a la NAL. Estos resultados sugieren que el ayuno interrumpe el tono opioide inhibidor de la secreción de LH.
Financiado por proyecto DIUC 20.24.11

193

ODONTOGENESIS IN VITRO. ("in vitro odontogenesis). Lemus,D. y Fuenzalida, M. Departamento Morfol. Exper., Facultad de Medicina, Univ. de Chile.

En un trabajo anterior demostramos el potencial inductor de la papila dentaria de embriones de conejo con 15 días de gestación (J. Exp. Zool., 256:264-272.1990. Interesados en conocer el periodo de desarrollo en que áquellas pierden esta capacidad se han realizado asociaciones heteroespecíficas entre estos tejidos y epitelio de embriones de ave. Las papilas se aislaron quirúrgicamente y recombinaron con ectoderma de embriones de codorniz (50-60 hrs.). Los asociados se cultivaron en alantocorion de pollo, asociados a millipore. Después de 6 días de cultivo los recombinados heterólogos no mostraron diferenciación de estructuras dentarias. Abundantes figuras "mielínicas", cartílago, vesículas, atrofia regresión de injertos y otras fueron registradas. Estos resultados preliminares estarían indicando que la papila dentaria del embrión de conejo con 18 y 17,5 días de gestación ha perdido su potencial inductor. Papilas sometidas a las mismas condiciones experimentales, pero provenientes de embriones más jóvenes (15 días) presentan potencial inductor. Probablemente entre ambos periodos de desarrollo, la papila experimenta cambios que modifican las interacciones epitelio-mesénquima que se producen durante la odontogénesis. Necesitamos conocer respuestas de tejidos más jóvenes para establecer el periodo crítico en que el tejido competente (inductor) se hace incompetente (no inductor), y establecer análisis comparado diferencias cuantitativas entre aquellas (electroforesis uni-bidimensional).

Proyecto DTI B. 3191-9014.

194

ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA Y HORMONA LUTEINIZANTE EN LA ESPECIE PUDU PUDA (MOLINA)(MAMMALIA,CERVIDAE).(Seasonal Reproductive Cycle and Luteinizing hormone in the Species Pudu puda (Molina(Mammalia,Cervidae)). Reyes E., Muñoz P., Recabarren S.E., Torres P. Depto. de Biología Molecular; Depto. Fisiopatología; Depto. Medicina Veterinaria. Universidad de Concepción.

Muchos organismos responden a cambios ambientales, los cuales modifican el comportamiento sexual entre otros.

Con respecto al factor ambiental luz, se sabe que los ciervos se hacen activos sexualmente cuando se inicia el régimen de días cortos (otoño). Por otro lado,el estudio histológico de la gónada masculina de Pudu puda realizado anteriormente, reveló que este órgano mostraba una marcada estacionalidad en la actividad espermatogénica donde los túbulos seminíferos presentan una regresión en cuanto a la actividad durante los periodos de días cortos (invierno)y una activa espermatogénesis con todos los estados maduratívos durante los meses de marzo y abril, periodo que también coincide con la actividad sexual de la especie.

La presente investigación permite que existe una estrecha relación entre la concentración plasmática de la LH y la actividad espermatogénica en los machos. El estudio se llevó a cabo en tres machos adultos a los cuales se les tomó muestra de sangre desde la vena safena;la determinación de la concentración plasmática de LH se hizo por radioinmunoensayo.

Los resultados indican una baja concentración plasmática de LH durante los meses de julio y noviembre,un aumento de concentración durante los meses de diciembre y enero y una alta concentración de la hormona LH con un peak en el mes de febrero;mayo y junio fueron similares a diciembre y enero.Se concluye que desde el punto de vista histológico como también del hormonal la especie presenta una marcada estacionalidad reproductiva.

Proyecto DIC 20.31.38 Universidad de Concepción
Proyecto DIC 10.30.09 Forestal Río Vergara, VIII Región

195

LA INGESTA DE ARSENICO VIA ORAL, TIENE EFECTO TERATOGENICO?
(Does the oral ingestion of arsenic, have a teratogenic effect?)
Silva, T.G., Acuña, H. O. y Muñoz, T. M., Departamento Biomédico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta.

Una extensa literatura ha descrito que el arsénico, procedente de la contaminación ambiental, que se encuentra en el agua de bebida es la causa de diferentes patologías como cáncer a la piel, pulmón, alteraciones broncopulmonares, cardiovasculares, daño hepático, hematopoyético, etc.
Por otra parte, se han descrito efectos teratogénicos y embriotóxicos cuando se someten animales de laboratorio a una exposición prenatal de arsénico, en ratón (Hood y cols.72,77), hamster (Ferm y cols. 68, 86; Willhite, 81) y ratas (Beaudoin, 74). Los fetos cuyas madres fueron inyectadas con una sóla dosis de arsénico vía intraperitoneal o intravenosa, presentaron anormalidades especialmente a nivel del tubo neural, aumento de la reabsorción fetal, pérdida de peso fetal, defectos en el esqueleto, en el sistema genitourinario y otros. Sin embargo, para los efectos de salud pública, las vías de mayor significado son la oral y respiratoria, a través de la ingesta de agua y alimentos, o secundariamente por inhalación.
El propósito de este trabajo es determinar el efecto que la administración de arsénico vía oral en periódos pregestacionales y gestacional, tiene en la fertilidad de las hembras y en la inducción de malformaciones en su progenie.
Se seleccionaron ratas hembras Sprague-Dowley, adultas jóvenes las que recibieron una ingesta crónica de arsénico de 10 ppm, ad libitum por 150 días. Los animales se separaron en grupos recibiendo; Grupo 1: Arsenito, Grupo 2: Arseniato y Grupo 3: Agua potable como control. Simultáneamente se arsenicaron machos con los cuáles se aparearon las hembras. Al término de la preñez, éstas fueron sacrificadas realizándose el recuento de fetos y su observación macroscópica, recuperación de placentas, la obtención de sangre materna y fetal. Los resultados muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) de los niveles de arsénico en sangre materna entre los grupos 1 y 3. Situación similar se observa en la sangre fetal. Los valores de arsénico determinados en placenta, no muestran diferencias. El número de fetos entre los grupos experimentales y el control son similares, y a la observación macroscópica, éstos no presentaron malformaciones gruesas.
Se infiere, que las hembras que recibieron arsénico en dosis de 10 ppm en periodos pregestacionales y gestacional, a través de una ingesta crónica vía oral, presentan valores elevados de arsénico solamente en el grupo tratado con arsenito, el cuál se transfiere vía placentaria a la progenie, no afectando el número de fetos por camada, ni observándose un efecto teratogénico.
Financiamiento: Dirección General de Investigación (P.E.L.)

196

RELACION GONADA-MESONEFROS DURANTE LA FASE PREMEIOTICA EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO HUMANO.(Mesonephros-gonadal relationship during the premeiotic phase in the development of the human embryo).Pereda,J.,Pozo,J.,Corral,E., Soto,M.Laboratorio de Embriología y Microscopía Electrónica.Facultad de Medicina.Universidad de Chile.
La contribución del mesonefros en el desarrollo gonadal es bastante discutida. Aunque éste juega un rol importante en mamíferos inferiores, en la morfogénesis de la gonada humana esto no aparece tan claro.El propósito de este trabajo fue describir por medio de microscopía óptica y electrónica,la evolución que experimenta el epitelio celómico y el mesonefros durante la formación de la gónada humana en la fase premeiótica.
Se estudiaron 8 embriones humanos cuyas edades fluctuaban entre la semana 4 y 7 de gestación, provenientes de embarazos tubarios obtenidos postsalpingectomías.
En embriones de fines de la semana 4, la cresta genital estaba constituída por un epitelio simple, sin membrana basal y un mesenquima laxo. El mesonefros presentaba un glomérulo (G) en etapa inicial del desarrollo y un conducto de Wolff (CW) sin lumen. A inicios de la semana 5, células germinales primordiales (CGPs) colonizaron la cresta interactuando con el epitelio celómico (EC), el cual se transformó por mitosis activas en un epitelio pluriestraficado. Crecimiento y desarrollo del esbozo gonádico se observó a fines de la semana 5, debido al engrosamiento del EC y a la formación de cordones sexuales primarios a inicios de la semana 6. Numerosas CGPs se observaron incorporadas entre el EC. Una membrana basal se observó entre la futura corteza y la medula. Hacia fines de la semana 7, la gonáda se mostraba como un órgano independiente, vinculado al mesonefros por un pedículo ancho. No se observaron cambios degenerativos en el mesonefros, mostrando el G, túbulos mesonéfricos y CW aspecto normal.
Nuestros resultados indicarían que la gónada es de origen epitelio celómico, apoyando la tesis que señala que los elementos mesonéfricos no contribuirían a la morfogénesis de este órgano.Proyecto DTI N3189 90.13.