

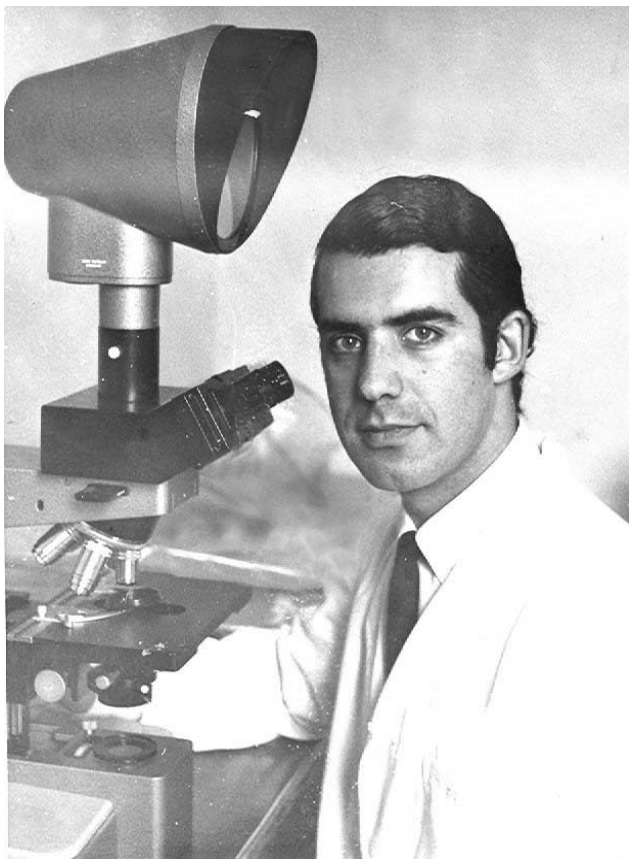
VII CONGRESO INTERNACIONAL SOCIEDAD DE ANDROLOGÍA Y GAMETOLOGÍA DE CHILE

IX JORNADAS INTERNACIONALES DE VERANO EN MEDICINA REPRODUCTIVA Y BIOTECNOLOGIA

Dedicadas al Prof. Dr. Pedro Esponda en su cumpleaños número 65

Organiza: Sociedad de Andrología y Gametología de Chile y Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

17-18 enero 2008. Independencia N° 1027 Santiago de Chile



Directiva Sociedad de Andrología y Gametología de Chile

Presidente: Dra. Pilar Vigil

Vice-Presidente: Dr. Ricardo Moreno

Secretario: Dr. Alberto Pabón

Tesorero: Dr. Patricio Contreras

Comisión organizadora:

Presidente: Prof. Dr. Eduardo Bustos

Comité Organizador:

Prof. Dr. Héctor Rodríguez

Prof. Luis Sarabia

Prof. Carlos Ponce

Prof. Ricardo Hartley

Prof. Roberto Catriao

ACCIÓN PROTECTORA DE TUBAS UTERINAS Y SUS SECRECIONES SOBRE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS. (Protective action of uterine tubes and their secretions on DNA fragmentation of human sperm). Navarrete, P; Espinoza, J; Parodi, J; Sánchez, R. Centro de Biotecnología de Reproducción (CEBIOR), Doctorado en Ciencias Mención Biología Celular y Molecular Aplicada, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. patricia.bq@gmail.com

Existe evidencia que la integridad del ADN puede ser un indicador del potencial fecundativo masculino. Uno de los factores que más produce daño en el ADN son las especies reactivas de oxígeno (EROs), producidas tanto por el mismo espermatozoide como por leucocitos activados (LA) presentes en el plasma seminal. El espermatozoide está protegido de estos factores mientras esté en contacto con el plasma seminal, que contiene factores que neutralizan la acción de EROs. Posterior a la entrada al tracto genital femenino, los factores protectores deberían ser entregados por secreciones procedentes del endometrio o las tubas uterinas (TU). Pese a todo lo anteriormente descrito, no hay evidencia concluyente si las TF actúan protegiendo al espermatozoide para evitar la fragmentación de su ADN inducido por EROs. Por tanto esta investigación determinará la acción de explantes de TU y sus secreciones (CM) sobre la fragmentación del ADN de espermatozoides humanos mediante el ensayo de TUNEL, en presencia o ausencia de EROs generadas por LA. En ausencia de incubación previa con LA, la incubación por 12 horas con explantes de TU produce un efecto protector sobre la fragmentación basal del ADN de espermatozoides humanos, mientras que en presencia de incubación previa con LA, la incubación por 12 horas con CM produce un efecto protector sobre la fragmentación inducida del ADN de espermatozoides humanos. En conclusión, las TU y sus secreciones median un efecto protector sobre la fragmentación del ADN de espermatozoides humanos inducido por EROs, específicamente preservando la integridad del genoma espermático.

Palabras clave: Espermatozoide, ADN, EROs, fragmentación, tuba uterina.

ALTERACIONES DEL ESPERMIOGRAMA DE PACIENTES DE LA REGIÓN METROPOLITANA ASISTIDOS EN LA UNIDAD DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCTIVA DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE ENTRE LOS AÑOS 2002 Y 2007. (Spermogram alterations on patients from Region Metropolitana assisted on the Reproductive Biology Unit of University of Chile among 2002 - 2007). Molina, C; Maurer, I; Bustos-Obregón, E; Sarabia, L. Unidad de Biología de la reproducción. Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile. c_molina@med.uchile.cl

En Chile y en el mundo, las parejas infértiles alcanzan un 10 al 15%, siendo el factor masculino responsable de hasta el 50% de los casos. Para el diagnóstico inicial de la pareja infértil es esencial el estudio del espermiograma. Objetivo: Determinar cambios en los cuatro parámetros del espermiograma de mayor valor diagnóstico (recuento, movilidad, morfología y viabilidad) según la edad, estableciendo el parámetro alterado de mayor frecuencia. Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo de una muestra de 100 pacientes atendidos entre los años 2002 y 2007, clasificándolos en cuatro grupos etarios (17-26, 27-36, 37-46 y 47-56 años). Al evaluar la concentración espermática, el 37 % de la población estudiada presentó una

concentración anormal, no estableciéndose diferencias significativas entre grupos etarios. Con respecto a la astenozoospermia, el 85 % de los pacientes la presentó, observándose un mayor porcentaje de ésta, en los grupos etarios extremos. En cuanto a la morfología espermática, el 59 % de los pacientes presentó esta anomalía. La viabilidad espermática fue anormal en el 8 % de los pacientes, siendo significativamente más alto el porcentaje de anomalía en el grupo etario de mayor edad (14,3%) en comparación al resto de los grupos. Los parámetros estudiados muestran un alto porcentaje de anomalía en la población en estudio, confirmando el valor diagnóstico de éstos. Al comparar entre grupos, el de mayor edad presenta el mayor porcentaje de parámetros alterados (movilidad y viabilidad), estableciéndose la edad como un factor negativo en la calidad espermática. Se establece, además, que la movilidad, corresponde al parámetro más frecuentemente alterado lo que coincide como un buen factor pronóstico, mostrando una distribución anormal mayor en las edades extremas. Al analizar concentración y morfología, vemos que el factor edad no alteró estos parámetros en la población estudiada.

Palabras clave: Espermiograma, morfología, motilidad, concentración, infertilidad.

ALTERACIONES REPRODUCTIVAS POR LA EXPOSICIÓN INTERMITENTE A HIPOXIA HIPOBARICA Y EL ROL PROTECTOR DE LA MELATONINA, EN TESTICULOS DE RATAS. (Reproductive alterations due to intermittent hypobaric hypoxia and the protective role of melatonin in rat testis). Castro, R¹; Bustos-Obregón, E¹; Cikutovic, M² ¹Fac. de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile. ²Fac. Cs. de la Salud, Universidad de Antofagasta. Antofagasta, Chile. rocavet@gmail.com

La fertilidad masculina es disminuida por exposición a hipoxia hipobárica intermitente (HHI). Su estudio es relevante dada la creciente actividad laboral humana en altura. Para aclarar el mecanismo de acción, se evalúan variables espermáticas (conteo en cauda epididimaria, compactación de cromatina, estabilidad del DNA, prueba del cometa), e inmunohistoquímicas y morfométricas del tejido testicular de ratas experimentando ciclos de HHI en cámara hipobárica. Paralelamente se estudió el rol protector de la Melatonina. HSP-70 (expresada en shock térmico) y HIF-1a (expresada en condiciones de hipoxia) fueron usadas como indicadores para estimar daño testicular. Cuarenta ratas Sprague Dowley, adultas, consumiendo melatonina en agua de bebida (10mg/kg) separadas en 5 grupos, se sometieron a HHI (ciclos 7 días hipoxia / 7 días normoxia). Se consideran controles en normoxia al inicio y final de 70 días experimentales). Se compara con igual modelo sin melatonina. Estudio estadístico: análisis de varianzas y comparaciones múltiples de Bonferroni (α5%). Daños generados por HHI aumentan progresivamente: Disminución de conteo espermático, descompactación de cromatina, inestabilidad del DNA, cometa (+), mayor expresión de HIF-1a, aumento del diámetro tubular y luminal con disminución en la altura del epitelio seminífero y vacuolización de este. Melatonina contrarresta dichos daños. El rol protector ejercido por Melatonina y sus características antioxidantes hacen suponer que las EROS participan activamente en dichos daños.

Palabras clave: Hipoxia hipobárica, melatonina, testículo, HSP-70, HIF-1a

Parcialmente financiado por Fundación Científica y Tecnológica (ACHS).

ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE MASTOCITOS EN LA GLÁNDULA PROSTÁTICA EN RATONES. (Analysis of the presence of mast cells in mice prostate gland). Venegas, G; Rodríguez, H; Inostroza, J; Milla, E. Laboratorio de Biología de la Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile. hrodrigu@med.uchile.cl

La próstata es una glándula accesoria del sistema reproductor masculino. Esta se desarrolla a partir del seno urogenital y es la encargada de aportar una fracción importante del fluido seminal. Los mastocitos son conocidos por su función desarrollada en los cuadros de inflamación, hipersensibilidad, desordenes fibróticos y angiogénesis; además, algunos estudios han reportado la presencia de mastocitos y su rol en el crecimiento de tumores malignos. Es por lo anterior que la presencia de estas células es una variable importante dentro del estudio realizado. Objetivo: Establecer la presencia de mastocitos en la glándula prostática de *Mus musculus* cepa CF1. Se utilizaron Próstatas de ratones de 1; 8,6; 17,2; 25,8; 34,4 y 64 días, impregnadas en parafina y con la obtención de secciones de 5 mm montadas en portaobjetos. Se realizó tinción con azul de tionina a pH 3,8. Se realizó conteo mediante microscopio óptico a objetivo 100x. La presencia de mastocitos aumentó conforme progresa la edad de los animales. Este alcanza un promedio máximo de 0,68 mastocitos por área (0,17 mm²) a los 64 días post natal. Se observa un aumento significativo entre los días 34,4 y 64; además se puede destacar una disminución entre los promedios del día 8,6 y el 17,2 post natal. Las desviaciones estándares son de un gran valor durante todas las edades analizadas. Se demuestra un aumento significativo en el número de mastocitos en la glándula prostática del ratón conforme alcanza su edad adulta, esto se puede deber a procesos inflamatorios subclínicos en la glándula. La totalidad de los Mastocitos se observan a nivel de estroma distribuidos ampliamente y de forma aislada o grupal dependiendo la edad del animal, lo que explica los grandes valores de las desviaciones estándares..

Palabras clave: Mastocitos, próstata, histología, *Mus musculus*, cancer

APLICACIÓN DE MitoSOX Red A LA EVALUACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN MITOCONDRIAS DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS. (MitoSOX Red application on superoxide anion assessment in human sperm mitochondria). Espinoza, J¹; Sagredo, A¹; Villegas, J^{1,2}. ¹Centro de Biotecnología en Reproducción, ²Depto. Medicina Interna, Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile. sagredo1986@gmail.com

En el varón se asocia frecuentemente la alteración morfológica y funcional del espermatozoide con niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ERO). Para la evaluación de ERO a nivel celular se han utilizado varios métodos, la mayoría de los cuales adolecen de falta de sensibilidad y especificidad. Recientemente se ha descrito el desarrollo de un compuesto fluorescente MitoSOX Red para la evaluación de la generación de anión superóxido a nivel mitocondrial. MitoSOX Red es capaz de ingresar a la mitocondria en función de la diferencia de potencial de membrana y así unirse al DNA mitocondrial tras su oxidación específica por anión superóxido. A nivel del espermatozoide es de alto interés disponer de una herramienta que permita estudiar el componente oxidativo mitocondrial tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. El objetivo de

este trabajo fue aplicar el compuesto fluorescente MitoSOX Red a la evaluación de la producción de anión superóxido mitocondrial en espermatozoides humanos. Los espermatozoides fueron cargados con MitoSOX Red y luego fueron incubados con el bloqueador de la cadena mitocondrial de transporte electrónico, Antimicina A. Los resultados demuestran que MitoSOX Red permitió detectar el aumento significativo de anión superóxido en los espermatozoides tras la incubación con Antimicina A. Se concluye que MitoSOX Red es útil para el estudio del componente oxidativo del gameto masculino.

Palabras clave: MitoSOX Red, mitocondria, espermatozoides, anión superóxido, antimicina A

Financiado parcialmente por Convenio de Desempeño I, DIUFRO (JV) y FDI, Línea Emprendimiento Estudiantil 2006, Ministerio de Educación (JE).

BIOENSAYOS DE VITRIFICACIÓN ESPERMÁTICA CON SEMEN DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*): USO DE CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES Y PLASMA SEMINAL. (Sperm vitrification bioassays in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen: non penetrating cryoprotectants and seminal plasma use). Merino, O¹; Figueroa, E¹; Risopatron, J^{1,2}; Valdebenito, I³. ¹Centro de Biotecnología en Reproducción, ²Depto. Cs. Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, ³Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco. Temuco, Chile. osvalmerino@gmail.com

El almacenamiento prolongado de semen de peces muestra muchas deficiencias para lograr óptimas tasas de fecundidad. El método más utilizado en piscicultura es criopreservación. En este contexto, la vitrificación como técnica ultrarrápida de congelación, donde el semen diluido en un crioprotector está en contacto directo con el nitrógeno líquido (N₂L), podría mantener la capacidad fecundante de los espermatozoides de trucha arcoiris. Existen antecedentes que la vitrificación permite la criopreservación de células espermáticas de humanos y caninos en peces no hay antecedentes. El objetivo de este trabajo es analizar el efecto de la vitrificación sobre parámetros de funcionalidad espermática y fecundidad en espermatozoides de trucha arcoiris, utilizando diferentes crioprotectores no penetrantes y plasma seminal. Se utilizó plasma seminal (50%) y sucrosa (0,25M). Alícuotas de 20µL de espermatozoides fueron vitrificadas dejándolas caer rápida y directamente en N₂L. La desvitrificación se realizó en medio Cortland a 35°C. Se evaluó integridad de membrana (SYBR-14/PI) y potencial de membrana mitocondrial (JC-1) por citometría (FACSCalibur, Becton Dickinson). Los resultados preliminares post-vitrificación, utilizando sucrosa a concentración 0,25M y 50% de plasma seminal, se observó; potencial de membrana mitocondrial no alterado (57,52%) e integridad de membrana de los espermatozoides (28,73%), sin diferencias significativas con el control (53,54% - 38,25%) respectivamente. Los resultados sugieren que el efecto que produce la criopreservación (vitrificación) de espermatozoides de trucha arcoiris, puede ser disminuida utilizando sucrosa y plasma seminal. Se espera entregar resultados de fecundación al momento de exponer este trabajo.

Palabras clave: vitrificación, *Oncorhynchus mykiss*, espermatozoide, funcionalidad espermática

Proyecto FONDEF IDO6i1020

BIOENSAYOS DE VITRIFICACIÓN ESPERMÁTICA DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*): DETERMINACIÓN DEL DILUYENTE Y CRIOPROTECTOR MÁS EFECTIVO PARA LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA. (Sperm vitrification bioassays in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): determination of the most efficient diluent and cryoprotectant for sperm functionality). Figueroa, E¹; Merino, O¹; Risopatrón, J^{1,2}; Valdebenito, F³. ¹Centro de Biotecnología en Reproducción, ²Depto. Cs. Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, ³Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco. Temuco, Chile. eliasfigueroav@hotmail.com

La criopreservación del semen de trucha arcoiris involucra una serie de cambios intracelulares que disminuyen la funcionalidad espermática. Los diluyentes y crioprotectores cumplen la función de proteger al espermatozoide de salmónidos de acciones tóxicas de productos metabólicos celulares y cambios bruscos de temperatura que experimenta en la criopreservación. El objetivo del trabajo es evaluar el diluyente espermático y la dilución de crioprotector que mantenga la funcionalidad espermática de trucha arcoiris pre-vitrificación. Se utilizó 4 diluyentes espermáticos (Tris Buffer, Diluyente UCT, Cortland y SFMM) y 4 crioprotectores (Metanol, DMSO, Sucrosa y Trealosa) a diferentes niveles de dilución (1:1, 1:2, 1:3) a temperatura de 10 °C, se evaluó nivel de movilidad utilizando escala de Sánchez-Rodríguez y Billard, tiempo de activación (activador UCT) por microscopía óptica y viabilidad espermática (PI) por citometría. Resultados preliminares indicaron un mayor nivel (5 ± 0) y tiempo de movilidad ($76,4 \pm 4,9s.$) en diluyente "Cortland" y sin diferencias estadísticamente significativas con el control en viabilidad espermática ($94,8 \pm 1,3\%$ v/s $92,6 \pm 1,5\%$). Además se observó un mayor nivel y tiempo de movilidad espermática con Sucrosa ($5 \pm 0,4$; $65,4 \pm 4,5s.$) y DMSO ($4 \pm 0,5$; $34,2 \pm 5,4s.$) a dilución 1:1 y 1:2 y no se observó diferencia estadísticamente significativas con el control en viabilidad espermática ($87,7 \pm 4,2\%$; $84,4 \pm 4,5\%$ y $93,9 \pm 2,1\%$, respectivamente). Los resultados preliminares sugieren vitrificar espermatozoides de trucha arcoiris en diluyente "Cortland" incorporando crioprotector DMSO y Sucrosa a diluciones 1:1 ó 1:2.

Palabras clave: Vitrificación, *Oncorhynchus mykiss*, espermatozoide, funcionalidad espermática

Proyecto FONDEF IDO6i1020

¿CUÁNTO CONOCEMOS SOBRE EL DESARROLLO NORMAL Y PATOLÓGICO DEL APARATO REPRODUCTOR? AUTOINSTRUCTIVO AUTOEVALUATIVO?. (How far do we know about the normal and pathological development of the reproductive system? Self-instructive for self-evaluation). Buscaglia, F; Merino, P; Castro, R; Rojas, M. Laboratorio de Embriología Comparada, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile. mrojas@med.uchile.cl

En la línea de aportar innovaciones motivadoras en la docencia de postgrado, hemos diseñado un modelo de aplicación que permite el estudio y actualización del desarrollo embrionario del aparato reproductor de las especie humana y de animales de importancia veterinaria, a partir de diferentes malformaciones de este sistema. Los objetivos de este trabajo son los de desarrollar activida-

des innovadoras y la elaboración de los recursos didácticos que permitan la fácil comprensión de los continuos cambios morfológicos, moleculares y de expresión génica durante el desarrollo y los eventos en los cuales pueden ocurrir los distintos defectos del desarrollo. La utilización de nuevas tecnologías de la comunicación, permite generar una nueva modalidad de enseñanza basada en el alumno, para esto hemos generado una base de datos utilizado elementos de la enseñanza tradicional (imágenes histológicas e inmunohistoquímicas) como también efectos multimediales que fue introducida en el programa "Gestor de Guías de Estudio de Rivas *et al.* 2007". El programa se encargará de generar preguntas y revisar respuestas, entregándole la opción al alumno de comparar sus respuestas con las correctas. Este modelo de aplicación educativa en los programas de postgrado esta en proceso de validación por alumnos de Programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Palabras clave: Aparato reproductor, desarrollo normal, desarrollo patológico.

EFEECTO DE UN ANTIINFLAMATORIO NO ESTEROIDAL EN LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS EPIDIDIMARIOS DE RATONES EXPUESTOS A HIPOXIA HIPOBÁRICA CRÓNICA. (Effects of a non-steroidal anti-inflammatory drug in spermatid epididymal parameters in mice submitted to hypobaric hypoxia). Aguirre, P; Arredondo, MA; Caster, G; Hartley, R; Bustos-Obregón, E. Laboratorio de Biología de la Reproducción, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile. rhartle@gmail.com

El efecto de la Hipoxia Hipobárica Crónica (HHC) en la espermatogénesis se ha comprobado en ratas y ratones, existiendo un notable deterioro en testículo y epidídimo. La HH también afecta al riego sanguíneo, aumentando la vascularización y temperatura intratesticular, lo que daña la espermatogénesis. Un tratamiento con Ibuprofeno, fármaco antiinflamatorio, disminuye la respuesta angiogénica en crecimientos tumorales y metástasis. En este estudio se analizó el efecto del Ibuprofeno en parámetros espermáticos epididimarios en ratones expuestos a HHC. Metodología: Se utilizaron 40 ratones CF-1 machos de aproximadamente 3 meses de edad y peso corporal semejante. Éstos se dividieron en 5 grupos de 8 animales, siendo el grupo C1 el control (normoxia), el grupo C2 se expuso a HHC por 33 días y los grupos I1, I2 e I3 fueron expuestos a HHC con inyecciones diarias de Ibuprofeno (10, 20 y 40mg/kg respectivamente) durante 33 días. Luego se realizó pesaje del epidídimo, conteo y morfología espermáticos de cola epididimaria y determinación de porcentaje de espermatozoides DNA simple hebra (ssDNA) de los grupos (Anarajando de Acridina y Epifluorescencia). Resultados: El peso epididimario no presento diferencias significativas. El recuento espermático de cola de epidídimo disminuye en hipoxia y es significativamente mayor con bajas dosis de Ibuprofeno. En hipoxia, el porcentaje de ssDNA es significativamente mayor pero sin diferencias entre las diferentes dosis de Ibuprofeno. Conclusiones: El Ibuprofeno, al disminuir la angiogénesis, permite mantener constante la espermatogénesis, pero la calidad de los espermatozoides se ve afectada, presumiblemente comprometiendo la capacidad fecundante del semen.

Palabras clave: Hipoxia Hipobárica, ibuprofeno, espermatogénesis, epidídimo, espermatozoides.

EFFECTO DEL IBUPROFENO SOBRE LA MORFOMETRÍA, ANGIOGÉNESIS E HISTOPATOLOGÍA DEL TESTÍCULO DE RATÓN EN CONDICIONES DE HIPOXIA HIPOBÁRICA CRÓNICA. (Effects of Ibuprofen on testicular morphometry, angiogenesis and histopathology of mouse submitted to chronic hypobaric hypoxia). Baldan C; Berasain, D; Gajardo, C; Hartley, R; Bustos-Obregón, E. Laboratorio de Biología de la Reproducción, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile. rhartle@gmail.com

La hipoxia hipobárica crónica (HHC) induce a angiogénesis en el testículo de ratón y cambios histopatológicos que pueden reducir la fertilidad. El tratamiento con drogas antiinflamatorias no esteroidales (Ibuprofeno) reduce la expresión de factores de transcripción inductores de la hipoxia en células tumorales. En este estudio se analizó el efecto del Ibuprofeno sobre el hematocrito, reticulocitosis y morfología del testículo. Se utilizaron 40 ratones CF-1 machos de aproximadamente 3 meses de edad y peso corporal semejante. Éstos se dividieron en 5 grupos de 8 animales, expuestos por 33 días a: Grupo C1, control normoxia; grupo C2, control HHC a 4200 msnm y los grupos I1, I2 e I3: experimentales HHC a 4200 msnm, con administración diaria de una dosis de Ibuprofeno de 10, 20 y 40 mg/kg, respectivamente. Se realizó microhematocrito, frotis hematológico y análisis digitalizado de cortes de testículo para estudios de morfometría. La altura del epitelio seminífero aumenta significativamente con respecto a HHC con Ibuprofeno, mientras el diámetro luminal sólo con las dosis de 20 y 40 mg/kg. No hay variaciones significativas en el área tubular, mientras el área intersticial disminuye significativamente con dosis de 40mg/kg. El hematocrito aumenta significativamente en HHC y con dosis de 20mg/kg no presenta diferencias significativas con el control normoxia. Los reticulocitos aumentan significativamente en HHC y con Ibuprofeno disminuyen de manera significativa. Conclusiones: El Ibuprofeno induce cambios en el epitelio seminífero, hematocrito y reticulocitos que reducen los efectos de la HHC, aunque sin normalizar completamente dichos cambios.

Palabras clave: Hipoxia Hipobárica, ibuprofeno, espermatogénesis, testículo, espermatozoides.

EFFECTO IN VIVO DEL ÁCIDO MULIN-11,13-DIEN-20-OICO SOBRE LA ESPERMATOGÉNESIS DE RATÓN: UN ESTUDIO PRELIMINAR. In vivo effects of mulin-11,13-dien-20-oic acid on mouse spermatogenesis: a preliminary study). Ponce, C¹; Loyola, L²; Bustos-Obregón, E¹. ¹Laboratorio de Biología de la Reproducción, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile. ²Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Antofagasta. Antofagasta, Chile. carponce@med.uchile.cl

El ácido mulin-11,13-dien-20-oico (AM) es uno de los diterpenoides de alta bioactividad presentes en las especies del género *Azorella* (Umbeliferaceae), plantas altoandinas conocidas como "llareta" y cuyas decocciones son tradicionalmente empleadas como antiinflamatorios y analgésicos. Ensayos in vitro demuestran que, además de propiedades antiparasitarias e hipoglicemiantes, AM inhibe la motilidad espermática sin afectar su viabilidad (Loyola et al., 2001). Para determinar el efecto in vivo de AM sobre la espermatogénesis, ratones CF-1 machos adultos (n=4/dosis) recibieron tratamiento crónico con 0 (grupo control), 5 ó 10 x 10⁻⁵ nmol/kg de AM (purificado

por extracción con éter de petróleo y cromatografía en gel Si) durante 8 días por vía oral (0,25 mL) con sonda orogástrica. Tras 1 ó 2 semanas de reposo post-tratamiento (para caracterizar el daño ejercido sobre espermátides en diferenciación o sobre espermatoцитos en meiosis, respectivamente) se evaluaron variables biométricas, recuento y morfología espermática epididimaria, y genotoxicidad sobre el epitelio germinal mediante SCGE (ensayo Cometa). El tratamiento empleado no causó toxicidad aguda ni efectos colaterales en los individuos en estudio. Ninguna de las variables evaluadas resultó modificada significativamente por los tratamientos con AM, si bien se observó una tendencia a la disminución del recuento espermático dependiente de la dosis en la semana 2 post-tratamiento. Estudios complementarios están actualmente en desarrollo. Las investigaciones sobre el ácido mulin-11,13-dien-20-oico y otros diterpenoides de origen vegetal deberán continuar para validar sus propiedades etnobotánicas y descubrir nuevas moléculas bioactivas con potencial farmacológico y medicinal.

Palabras clave: Espermatogénesis, Diterpenoides, Azorella yareta, Genotoxicidad, Ensayo Cometa.

EFFECTO PROTECTOR DE DICLOFENACO SÓDICO Y MELATONINA EN TESTÍCULO DE RATÓN EXPUESTO A HIPOXIA HIPOBÁRICA CONTINUA O INTERMITENTE (Protective effect of diclofenac sodium and melatonin in mouse testis submitted to continuous or intermittent hypobaric hypoxia) Vargas, A; Bustos-Obregón, E. Laboratorio de Biología de la Reproducción, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile. aavargas@med.uchile.cl

Debido al aumento de la población de trabajadores en la altura, el estudio de los efectos de hipoxia hipobárica en la espermatogénesis ha adquirido gran interés. Diversos estudios demuestran que hipoxia hipobárica altera la función reproductiva masculina. El mecanismo de acción, en relación con la fertilidad, no se ha establecido, por lo que el problema necesita ser revisado en profundidad. Se evaluó cambios reproductivos en testículos de ratones sometidos a hipoxia hipobárica continua (HH) e intermitente (HI) de 4 días en normoxia y 4 días en hipoxia, simulando los turnos laborales de la faena minera del norte de Chile, a 4200 msnm. (en cámara hipobárica) por 33,2 días en relación a un grupo control (500 msnm., Santiago). Considerando además que los anti inflamatorios no esteroidales poseen propiedades antiangiogénicas (la angiogénesis consecuente a hipoxia provoca daño testicular) y que melatonina es un potente antioxidante depurador de radicales libres, se determinó el posible efecto protector de diclofenaco sódico y de melatonina en testículos de ratones expuestos a HH e HI. Se analizó morfología espermática, recuento espermático epididimario, fragmentación de DNA (cometa), estabilidad del DNA (naranja de acridina) y compactación de la cromatina. En HH y HI aumentan la teratozoospermia, células germinales cometa positivo, espermatozoides metacromáticos y descompactación de la cromatina, en tanto que disminuye el recuento espermático. Melatonina minimiza estos cambios y diclofenaco lo hace sólo para la estabilidad de la cromatina. En conclusión, tanto HH como HI provocan daño espermatogénico, afectando parámetros importantes para la funcionalidad del espermatozoide, probablemente debido a que la hipoxia paradójicamente genera un exceso de especies reactivas del oxígeno, las cuales son neutralizadas por melatonina.

Palabras clave: Hipoxia hipobarica, espermatogénesis, infertilidad, melatonina, fragmentación ADN.

ESTUDIO HISTOMORFOLÓGICO COMPARATIVO DEL ENDOMETRIO DE OVEJAS PREPÚBERES DE RAZAS DE DISTINTA PROLIFICIDAD. (Comparative histomorphological study of endometria of prepuberal ewes with different prolificity) Vasconcellos, A; Carrasco, J; Valdés, F. CEBIOR (Centro Biotecnológico de la Reproducción), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. avascon@ufro.cl

El objetivo del presente estudio fue sentar bases morfológicas para la realización de análisis inmunocitoquímicos e hibridación in situ de la presencia y distribución de receptores de estrógeno y progesterona en ovejas de distinta prolificidad y en distintos planos de nutrición, centrando nuestro interés en el endometrio por su relevancia en los mecanismos reproductivos. Se utilizaron ovejas prepúberes Romney Mash de alta prolificidad (n=2) y Araucanas de prolificidad standard (n=2) de las cuales inmediatamente después del sacrificio se tomaron muestras para estudio histológico del útero, oviducto y ovario. Para el análisis histológico los cortes fueron teñidos con Hematoxilina-eosina, Van Giesson, Arteta y Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) Los resultados mostraron en las dos razas adecuado desarrollo endometrial, con áreas carunculares e intercarunculares glandulares bien desarrolladas indispensables estas últimas para una buena implantación y crecimiento del embrión. Las glándulas, numerosas, eran tubulares, tortuosas, algo ramificadas y se extendían hasta el miometrio. No se observaron diferencias histológicas significativas entre ambas razas ni cambios morfológicos durante el transcurso de los días 93 al día 117 post natal, siendo su aspecto similar al del endometrio de la oveja adulta.

Palabras clave: ovejas, histología, endometrio, prolificidad.

Financiado: DIUFRO 107- 0017

EVALUACION DE PARAMETROS ASOCIADOS A APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDES DE CANINO PRESERVADOS A 4°C. (Evaluation of apoptosis-related parameters on 4°C cryopreserved canine sperm). Barrera, M¹; Villegas, J^{1,2}; Sánchez, R^{1,3}; Risopatrón, J^{1,4} ¹Centro de Biotecnología en Reproducción; ²Depto. Medicina Interna; ³Depto. Ciencias Preclínicas; ⁴Depto. Ciencias Básicas; Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. Temuco, Chile
. monicabarrera66@hotmail.com

La Inseminación Artificial con semen refrigerado abre importantes perspectivas de una eficiente reproducción en perros, optimizando el uso de los reproductores. Los procedimientos de criopreservación comúnmente usados exponen al espermatozoide a fenómenos asociados a apoptosis; induciendo una prematura pérdida de vitalidad y alterando consecuentemente su capacidad fecundante. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la refrigeración sobre parámetros asociados a apoptosis en espermatozoides caninos. Se evaluó movilidad, viabilidad, potencial de membrana mitocondrial (YMMit), externalización de fosfatidilserina (PS) y caspasa 3, antes y después de refrigerar los espermatozoides a 4°C por 48 y 240 horas, suspendidos en medio Tris-Yema de Huevo. Los resultados expresados como promedio \pm SEM fueron los siguientes:

	Semen Fresco	48 hrs	240 hrs
Movilidad	89.7 \pm 3.9	66.7 \pm 11.9	52.3 \pm 10.8
Viabilidad	79.0 \pm 5.6	77.7 \pm 2.1	76.3 \pm 2.5
_MMit	74.7 \pm 9.5	77.5 \pm 9.0	64.7 \pm 9.8
Anexina +	18.3 \pm 3.2	16.3 \pm 6.0	23.7 \pm 5.0
Anexina +/PI-	7.0 \pm 4.0	7.0 \pm 1.0	8.7 \pm 3.2
Caspasa 3 +	17.5 \pm 5.0	n/e	32.5 \pm 14.4
Caspasa 3 +/PI -	2.0 \pm 1.0	n/e	3.7 \pm 2.9

La viabilidad y YMMit se conservaron durante las 240 horas de refrigeración. El aumento de externalización de PS y de caspasa 3 observada a las 240 horas no fue estadísticamente significativo (p>0.05). Estos resultados permiten sugerir que la refrigeración no desencadena mecanismos de apoptosis en el espermatozoide de canino. No obstante, se observó una disminución significativa de la movilidad que puede estar asociada al metabolismo propio de la célula espermática, como es la generación de especies reactivas de oxígeno o disminución de factores que aportan los requerimientos energéticos de estas células.

Palabras clave: Refrigeración espermática, Semen Canino, Apoptosis, Caspasa 3, Potencial de membrana mitocondrial.

FONDECYT N°1070594

EVIDENCIAS SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA NPC2 EN LA MADURACIÓN EPIDIDIMARIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE RATÓN. (Evidences on NPC2 protein participation on epididymal maturation of mouse spermatozoa). Oñate-Alvarado, MJ¹; Busso, D¹; Morales, MG²; Moreno, RD¹; Zanlungo, S². ¹Facultad de Ciencias Biológicas y ²Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. dbusso@bio.puc.cl

Se ha sugerido que la proteína transportadora de colesterol NPC2, componente mayoritario del fluido epididimario, participa en la regulación del nivel de colesterol en la membrana espermática durante la maduración. Se postula que niveles elevados de colesterol mantendrían al espermatozoide en estado quiescente en el epidídimo, mientras que su remoción en el tracto femenino promovería la capacitación, favoreciendo la reacción acrosomal (RA). En este trabajo evaluamos la relevancia de NPC2 para la fisiología epididimaria analizando el fenotipo animales deficientes para NPC2. Ratones adultos wild-type (WT) fueron comparados con hipomórficos para npc2 (expresando 0-4% de NPC2) (NPC2^{-/-}) de la misma edad. Los animales NPC2^{-/-} presentaron epidídimos de histología normal, y espermatozoides con porcentajes de motilidad y anomalías morfológicas similares a los WT. El contenido de colesterol, determinado por la técnica de Folch, fue significativamente menor en los animales NPC2^{-/-} vs los WT (3,2 \pm 1,2 vs 5,3 \pm 2,1; p<0,05) (n=14). Como parámetro de capacitación, se evaluó la RA espontánea por tinción de los espermatozoides con Coomassie Blue. Congruentemente con un menor contenido de colesterol, los espermatozoides NPC2^{-/-} presentaron una tendencia a sufrir la RA anticipadamente respecto de los WT. Ésta diferencia se vio acentuada en ausencia de BSA,

agente que en el medio capacitante remueve colesterol de las membranas (% de RA a los 60 minutos: NPC2-/- 36,7±2 vs WT 23,3±9; p<0,05) (n=3). Nuestros resultados sugieren que NPC2 podría ser importante para la incorporación de colesterol a la membrana del espermatozoide durante la maduración epididimaria, y de esa forma contribuir a la cinética de la RA en el tracto femenino.

Palabras clave: NPC2, colesterol, epidídimo, espermatozoide, maduración.

FONDECYT 1070622 a S.Z. y FONDECYT 1070360 a R.D.M.

EXPRESIÓN DE HSP-70. SIGNO DE ENVEJECIMIENTO. (HSP-70 expression. Sign of aging.) Díaz, H^{1,2}; Esponda P². ¹Departamento de Biología & Cs. Ambientales. Facultad de Ciencias. Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile. ²Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid, España. hugo.diaz@uv.cl

Después de pocas horas en el oviducto, el oocito pierde la capacidad para ser fecundado. En el caso de las proteínas de choque térmico (HSP), éstas permiten que las células sobrevivan a condiciones adversas, previniendo la denaturalización de otros componentes proteicos. En los oocitos de ratón, la respuesta al choque térmico es máxima durante el período de crecimiento y disminuye cuando el gameto ha adquirido el tamaño maduro. En nuestra investigación, hemos examinado el papel de la proteína de choque térmico HSP-70, principalmente en el proceso de envejecimiento. La característica de esta proteína es que puede ser inducida por aumentos de temperatura. Para la detección de HSP-70, se adicionó un anticuerpo monoclonal contra HSP-70 que se aplicó utilizando las técnicas de inmunocitoquímica de rutina. Mientras que para la expresión del gen que la codifica, se empleó un ensayo de RT-PCR, a partir del ARNm obtenido de los oocitos colectados 10 y 20 horas post ovulación de hembras de 3-4 meses. Mediante un análisis inmunocitoquímico se pudo comprobar que la presencia de HSP-70 no se evidenció en los oocitos normales, pero sí aparecía en el citoplasma después de la exposición a 40 °C durante 4 horas y también se observaba en el citoplasma de oocitos envejecidos (postovulación). Además, se observó que los genes de esta proteína no se expresaban en oocitos extraídos a las 10 horas post ovulación de hembras jóvenes y mantenidos en condiciones normales pero sí en aquellos sometidos a estrés térmico, así como también en aquellos envejecidos. En resumen, se podría establecer que existiría una ventana para la inducción de las HSP, la que estaría regulada por el estado de desarrollo de estos gametos y es probable que estas modificaciones tomen parte en la baja fertilidad, lo que hace suponer que el aumento de temperatura más el envejecimiento estaría provocando una disminución de la expresión del gen.

Palabras clave: HSP-70, envejecimiento, ovocito, inmunocitoquímica, infertilidad.

EXPRESIÓN GÉNICA DE SUB-B2, UNA SUBUNIDAD DE PROTEOSOMA, EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. (Gene expression of SUB-B2, a proteasome subunit, on human

sperm). Rosales, O^{1,2}; Espinoza, J¹; Gutiérrez, A²; Morales, P⁵; Villegas, J^{3,4}. ¹Doctorado en Ciencias mención Biología Celular y Molecular Aplicada, ²Facultad Ciencias Agropecuarias y Forestales, ³Centro de Biotecnología en Reproducción; ⁴Depto. Medicina Interna, Facultad de Medicina; Universidad de La Frontera. Temuco, Chile. ⁵Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta. Antofagasta, Chile. omichelrosales@gmail.com

La presencia de transcriptos en el espermatozoide maduro proveería información acerca de la calidad de eventos de espermatogénesis, constituyendo una aplicación que reduciría las biopsias invasivas que se utilizan habitualmente. El proteosoma, complejo multienzimático ubicado en el núcleo y citoplasma de células eucariotas y algunas bacterias, interviene en procesos de células somáticas como ciclo celular, apoptosis, respuesta inmune y también en espermatozoides asociado a fecundación. La fecundación comprende interacciones entre espermatozoide y oocito, en las cuales participaría proteosoma. El objetivo es demostrar la presencia de transcriptos de proteosoma en espermatozoides humanos. Se utilizaron 23 muestras de semen de 10 donantes con espermiograma normal según OMS. La edad de los donantes fue de 21 ± 2,3 años. Se seleccionaron los espermatozoides móviles y descartaron células somáticas contaminantes mediante gradientes discontinuos de Percoll. Los espermatozoides se sometieron a extracción de RNA (RNeasy). Como control positivo de expresión génica se usaron leucocitos. Se realizó RT-PCR y se sintetizó cDNA con enzima SuperScript II. Se optimizó PCR mediante gradientes de temperatura y magnesio para sub-b2 y b-actina, esta última como control de expresión endógena. En las condiciones de PCR optimizadas se observó la banda correspondiente al transcripto sub-b2 y también b-actina en espermatozoides humanos. La factibilidad de la determinación de transcriptos mRNA en espermatozoides humanos permitiría su aplicación en la evaluación no invasiva del proceso de espermatogénesis.

Palabras clave: proteosoma, espermatozoide, Sub- b 1, expresión génica, PSMB-1

Convenio Desempeño II-DIUFRO-07 (JV), FONDECYT 040295 (PM).

HIPOXIA HIPOBÁRICA CONTINUA (HHC): ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (EROS) Y CONCENTRACIÓN DE ATP EN TESTÍCULO DE RATÓN. (Continuous Hypobaric Hypoxia (CHH): Reactive oxygen species and ATP concentration in mouse testis). Catriao, R; Barrios, O; Bustos-Obregón, E. Laboratorio de Biología de la Reproducción, ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile. robertocatriao@gmail.com

La literatura señala que en el plasma seminal humano la concentración de ATP es un buen predictor de la capacidad fertilizante del semen (Comhaire *et al.*, 1983). Igualmente se sabe que en condiciones de hipoxia aumenta la producción de EROS. Ambos cambios se estudian en testículo de ratón, sometidos a HHC simulada en cámara hipobárica (4200 msnm), por 8,3 y 16,6 días y sus controles (500 msnm). Se determinó EROS por lipoperoxidación de acuerdo a Lissi *et al.* (1995) y concentración de ATP por luminometría (kit luciferina/luciferasa de Sigma, de acuerdo a las instrucciones del fabricante). Los resultados son:

Tiempo de exposición a HHC	Lipoperoxidación (valores promedio)	Luminometría (valores promedio)
	Control= 3,3971 nmol EROs	Control= 7018,12 nmol ATP
8,3 días	experimental = 6,8390 nmol EROs	experimental = 1626,61 nmol ATP
16,6 días	experimental = 10,3055 nmol EROs	experimental = 71,34 nmol ATP

Se encuentra relación inversa entre la generación de EROs y la disminución de concentración de ATP a medida que transcurre el tiempo bajo HHC. De acuerdo a Smith et al. (1996), el semen de individuos fértiles tiene una alta capacidad antioxidante inversamente relacionada con el potencial de lipoperoxidación, por lo cual es posible suponer que el aumento de EROs sumado a la disminución de ATP detectada en el sobrenadante del homogenizado testicular compromete la fertilidad de los animales expuestos a HHC en forma tiempo-dependiente.

Palabras clave: hipoxia hipobárica, EROS, ATP, plasma seminal, testículo.

IMPLICANCIAS REPRODUCTIVAS DE LA HIPOXIA INTERMITENTE EN RATAS EXPUESTAS A AMBIENTE DE ALTURA. (Reproductive implications of intermittent hypoxia on rats exposed to a high altitude environment) Cikutovic, MA¹; Fuentes, N¹; Cikutovic, P²; Rivera, M²; Bustos-Obregón, E³. ¹Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta, Chile. ²Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Antofagasta, Chile. ³Laboratorio de Biología de la Reproducción, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile. decanofacsa@uantof.cl

Se ha informado que el trabajo en turnos condiciona tensión biológica, mental y social que podría comprometer la salud, bienestar y rendimiento del trabajador lo cual, en aquellos que realizan faenas en altitud, podría tener un efecto todavía mas severo, requiriéndose mayor información. Se estudió el efecto intermitente del ambiente altitudinal (HI), propio de las actividades mineras de la II región de Chile (aproximadamente 3.400 msnm.), sobre la actividad reproductiva de ratas, sometidas a los turnos aplicados por las faenas mineras (ciclos de 4x4 o 7x7 días de hipoxia/normoxia). Con este objeto, en las localidades de Caspana (3.260 msnm) y Antofagasta (nivel del mar), ambas en la II región, se midió hematocrito (Ht), hemoglobina (Hb), recuento espermático cada 7 días y crías nacidas en la mitad y al final de los experimentos (6 ciclos). Ht y Hb incrementan en 36% y 14,7% respectivamente, mientras el recuento espermático en epidídimo baja en 78% a los 7 días y se mantiene en ese nivel aún a los 84 días de exposición (Control 32x106 spz/ml; Hipoxia 7x106 spz/ml). El número de crías obtenidas del cruzamiento de machos y hembras, expuestos a HI disminuye (6 crías/rata), respecto al control (11 crías/rata). En el cruzamiento entre machos no expuestos y hembras expuestas el número de crías disminuye a 8. En conclusión, la hipoxia de altura afecta a la espermatogénesis lo que se refleja en la notable reducción en el número de crías de progenitores expuestos a HI. El

menor número de crías observado al cruzar machos normales con hembras expuestas a HI indica también, un efecto sobre la actividad reproductiva de las hembras, lo que actualmente es objeto de estudio.

Palabras clave: Hipoxia,

MUNC18-1 SE REQUIERE PARA LA REACCIÓN ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

(Munc18-1 is required for acrosome reaction in human spermatozoa). Rodríguez Ayala, JF; Tomes, CN. Lab. de Biología Celular y Molecular. IHEM. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.

frodriguez@fcm.uncu.edu.ar

La reacción acrosomal es un tipo especial de exocitosis regulada dependiente de calcio. La fusión en múltiples sitios entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática produce la liberación del contenido acrosomal, condición para que el espermatozoide penetre la zona pellucida del óvulo. La exocitosis está controlada por una maquinaria proteica muy conservada, entre ellas: GTPasas de la familia Rab, NSF, a-SNAP y SNAREs. Munc18-1 es una proteína hidrofílica con forma de arco que posee un rol controversial en la exocitosis. Un modelo propone que une y secuestra a syntaxina-1 en su conformación "cerrada", lo cual inhibiría la exocitosis. Otro modelo propone que Munc18-1 promueve y acelera la formación de complejos SNAREs in vitro, lo cual estimularía la exocitosis. Nuestro objetivo consiste en demostrar la presencia de Munc18-1 en espermatozoides humanos, demostrar que cumple un rol importante en la exocitosis acrosomal y establecer la/s etapa/s modulada/s por Munc18-1 en la misma. Por medio de técnicas de Western blot se demostró la presencia de una proteína con peso molecular entre 66 y 68 kDa, correspondiente a Munc18-1 en extractos de espermatozoides humanos. Por medio de inmunofluorescencia indirecta se demostró su localización acrosomal. Se demostró su rol esencial en la exocitosis acrosomal mediante ensayos funcionales usando un modelo de espermatozoides humanos permeabilizados con estreptolisina O desarrollado por nuestro laboratorio. Se ubicó su requerimiento en una etapa posterior al tethering dependiente de Rab3A y previa a la salida de calcio acrosomal. Por lo tanto concluimos que Munc18-1 está presente en espermatozoides humanos, posee localización acrosomal y es requerida para la exocitosis del acrosoma disparada por calcio y Rab3A en etapas relativamente tardías de la cascada.

Palabras clave: MUNC18-1; Reacción acrosomal; Espermatozoides humanos.

PROCAINA INDUCE HIPERACTIVACION INDEPENDIENTE DE CAPACITACION EN ESPERMATOZOIDES CANINOS

(Procain induces capacitation-independent hyperactivation on canine sperm). Oyarzún, JI¹; Risopatrón, J^{1,2}; Villegas, J^{1,3}; Sánchez, R^{1,4}. ¹Centro de Biotecnología en Reproducción, ²Depto. de Cs. Básicas, ³Depto. Medicina Interna, ⁴Depto. Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

joyarzun@ufro.cl

En los espermatozoides de mamíferos, tras la eyacuación, se producen modificaciones funcionales que le confieren la capacidad fecundante. Dentro de éstas encontramos los procesos de capacitación, reacción acrosómica e hiperactivación. Una de las dificultades que presenta el estudio de la hiperactivación es que ocurre paralelamente con la capacitación, siendo difícil diferenciar los mecanismos moleculares involucrados en ambos procesos. El anestésico local procaína presenta la particularidad de inducir hiperactivación de la motilidad espermática sin inducir aumento de la reacción acrosomal como otros fármacos hiperactivantes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de procaína sobre la hiperactivación y capacitación de espermatozoides caninos. Alícuotas de suspensión espermática (20×10^6 células/mL) fueron incubadas a $38,5^\circ\text{C}$, 5% CO_2 y 95% humedad en medio CCMm (control) y adicionando 5mM procaína. La capacitación fue determinada en forma directa utilizando tinción clortetraciclina-Hoechst 33258 e indirectamente, luego de la inducción de reacción acrosomal (RA) con ionóforo de calcio y progesterona, mediante evaluación de RA con tinción PSA-FITC. La hiperactivación se evaluó por videomicroscopía y software Sperm Track 2.9. Los resultados obtenidos demuestran que procaína induce hiperactivación de la motilidad sin afectar la capacitación, permitiendo su utilización para estudiar hiperactivación en forma independiente de capacitación.

Palabras clave: Procaína, capacitación de espermatozoides, caninos.

Financiamiento: Proyectos FONDECYT 1070594 y CEBIOR

RECEPTORES NEURONALES EN ESPERMATOZOIDEOS: EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO COMO MODELO DE REGULACIÓN DE LA CAPACITACIÓN Y LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA. (Neural receptors in spermatozoa: The dopaminergic system as a model of regulation for capacitation and sperm motility). Alfredo Ramírez¹, Maite Castro¹, Constanza Angulo¹, Laura Ramió², Montserrat Rivera², Teresa Rigau², Joan-Enric Rodríguez-Gil², Ilona I. Concha¹. ¹Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, ²Unitat Reproducció Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, España.

La presencia o expresión de receptores de neurotransmisores o neuromoduladores en espermatozoides ha sido demostrada mediante "binding" e inmunodetección molecular. A la fecha se ha descrito la presencia de los siguientes receptores: GABA-A, GABA-B, Glicina, Acetilcolina, Glutamato, Serotonina, Adrenérgicos, Purinérgicos, Angiotensina, Cannabinoides, Olfatorios, Cocaína y recientemente Dopamina (D2R). En términos generales su funcionalidad (estudios *in vitro*) ha sido asociada, según sea el caso, a la capacitación, viabilidad, potencial de membrana mitocondrial, quimiotaxis, motilidad y/o reacción acrosomal. Sin embargo, debido a dificultades metodológicas, carencia de estudios *in vivo* o de modelos genéticos, sólo algunos de ellos han probado tener relevancia fisiológica. En este trabajo presentamos un modelo de regulación de la capacitación y motilidad, basado en la presencia y funcionalidad de un fenotipo catecolaminérgico complejo. En dicho modelo destaca la participación del receptor de dopamina D2R y el transportador de dopamina (DAT), activan-

do vías de señalización celular dependientes de agonistas D2 e incorporando dopamina (y también de norepinefrina), respectivamente. Las variaciones del contenido de catecolaminas en el oviducto de mamíferos sugieren una importancia fisiológica para D2R y DAT presente en espermatozoides, además los define como blanco molecular de fármacos antipsicóticos, antidepressivos y de drogas de abuso como cocaína y meta-anfetamina.

Palabras clave: Receptor de dopamina (D2R), Transportador de dopamina (DAT), Espermatozoides, Capacitación y Motilidad.

MECESUP§; FONDECYT 1060135; DID-UACH 2004-60; DID-UACH 2005-09; Ministerio de Ciencia y Tecnología, España AGL2001-2568; AGL2004-04756.

REGULACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR DE LA GLÁNDULA PROSTÁTICA DE RATÓN: PÉPTIDOS DE LA FAMILIA NOTCH. (Regulation of cellular population of prostate gland in mice: NOTCH family proteins). Milla, E; Venegas, G; Inostroza, J; Rodríguez, H. Laboratorio de Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile. hrodrigu@med.uchile.cl

El seno urogenital aparece en ratones a contar del día 13 de gestación, esta es idéntica en macho y hembra hasta el día 17,5 de gestación, donde comienza un proceso de diferenciación hacia próstata, dado principalmente por la circulación de andrógenos. Las señales Notch participan en la regulación de la proliferación, diferenciación, apoptosis, y adhesión intercelulares. Tradicionalmente las células que expresan Notch son indispensables para el crecimiento, diferenciación y desarrollo prostático. Notch-3 regula la diferenciación y maduración de la musculatura lisa vascular; y Notch-4 está restringida a células endoteliales de embriones y adultos, promoviendo la transición epitelio-mesénquima cardíaco. **Objetivos:** Caracterizar inmunohistoquímicamente la glándula prostática normal en relación a la expresión de las señales Notch-3 y Notch-4 en ratones Mus musculus cepa CF1. **Material y Método:** Se utilizaron glándulas prostáticas de ratones normales de 1, 8, 17, 24, 32 y 64 días de edad, impregnadas en parafina y con la obtención de secciones de 5 mm montadas en portaobjetos silanizados. Se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales para Notch-3 y Notch-4. Se realizó conteo de células positivas mediante microscopio óptico (1000x). **Resultados:** El número de células positivas tanto en parénquima como en estroma a Notch-3 y Notch-4 se encuentran relativamente altas en el día 1 de edad, Notch-3 experimentan una disminución el día 8 y luego presenta un leve aumento en el número de células positivas desde el día 17, mientras que en Notch-4 ocurre una disminución los días 8 y 17 de edad, ambas Notch presenta altos niveles de expresión a los días 24 y 32, luego disminuyen bruscamente el día 64. **Conclusión:** Se confirma la presencia de proteínas, Notch-3 y Notch-4, tanto en parénquima como en el estroma prostático probablemente participando en las etapas de diferenciación y maduración de la glándula prostática normal en ratón.

Palabras clave: Glándula prostática, Péptidos, Población celular, ratón.

REGUL.
GLÁND.
LA FAM

VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN LÍQUIDO SEMINAL DE HOM- BRES INFÉRTILES CON INFECCIÓN GENITAL POR *Chlamydia trachomatis* Y *Mycoplasma spp* Y SU CORRELA- CIÓN CON EL DAÑO EN EL ADN Y LA APOPTOSIS.

(Lipoperoxidation level in seminal fluid from infertile men with *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma spp* genital infection and its correlation with DNA damage and apoptosis). Álvarez-Cuevas, S; Ramos-González, B; Ancer, J; Gallegos, MG. Laboratorio de Andrología, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. benito.ramos@gmail.com

Se sabe que un incremento en el número de espermatozoides que entran en proceso apoptótico durante la inflamación del tracto genital masculino puede estar asociado con los niveles elevados de especies reactivas de oxígeno. El daño en el DNA espermático se ha asociado a la presencia de agentes infecciosos; la estructura de la cromatina espermática y la integridad del DNA tienen una influencia crucial en el proceso de fertilización. Los gérmenes más comunes en infecciones genitales son *Chlamydia trachomatis* (Ct) y los Micoplasmas genitales (My). Estudiamos 37 pacientes con prueba de Inmunofluorescencia Directa positiva para Ct y/o My, se agruparon de acuerdo a los resultados microbiológicos; se estudiaron 11 individuos sanos normozoospermicos con microbiología negativa; se les realizó seminograma (OMS), apoptosis espermática y fragmentación del DNA espermático. El promedio de células con DNA fragmentado en el grupo My+ fue de $14,5 \pm 6,36\%$, para Ct+ fue de $23,15 \pm 10,46\%$, mientras que el grupo Ct+ y My+ fue de $27,40 \pm 11,19\%$, presentando estos últimos valor de $p < 0,05$ respecto al control ($18,364 \pm 7,55$), los valores de MDA producto de la lipoperoxidación no presentaron diferencia significativa en ninguno de los grupos. El promedio de células apoptóticas para el grupo My+: $25,00 \pm 2,83\%$, grupo de Ct+: $20,09 \pm 3,59\%$, y en el grupo Ct+ y My+ fue de $22,50 \pm 5,61\%$, con valor de $p < 0,05$ respecto al control ($13,36 \pm 3,93\%$). Los niveles altos de rupturas en el ADN se asociaron a la presencia de Ct y My que en combinación tuvieron un efecto sinérgico como inductores de daño en la estructura del ADN. La composición molecular bacteriana podría ser inductora directa de la apoptosis espermática. Comprobamos que estos microorganismos aumentan el grado de apoptosis en los pacientes estudiados.

Palabras clave: Lipoperoxidación, líquido seminal, hombres infértiles, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma spp*.