

REPRODUCCION Y DESARROLLO

171

LOS AXONES PERIFERICOS DISMINUYEN LOCALMENTE SU CONTENIDO MICROTUBULAR AL ASOCIARSE CON UNA RAIZ TRANSPLANTADA. (Peripheral axons decrease locally their microtubular content when they associate with a transplanted root) Carolina Hernández, Graciela Rivero y Jaime Alvarez Unidad de Neurobiología Molecular, P. Universidad Católica de Chile.

Los axones radiculares tienen 2 a 3 veces menos microtúbulos que los axones periféricos de igual calibre. Proponemos que el tejido de sostén participa en la especificación del contenido microtubular del axón. En el trayecto de un nervio periférico se removió un segmento y se reemplazó por una raíz.

En ratas, se transplantó 5-8 mm de raíz lumbar al nervio sural del lado opuesto. Como control se usó el autotransplante de nervio. El contenido microtubular de los axones amielínicos se estudió 1-2 meses más tarde con el microscopio electrónico.

Cuando se transplantó nervio, el contenido microtubular de los axones era normal en toda su longitud. Cuando se transplantó raíz, el contenido microtubular era normal por encima y por debajo del injerto, pero los valores eran la mitad a nivel del injerto.

Nuestras observaciones indican (i) que el citoesqueleto del axón depende del tejido de sostén, y (ii) que la raíz tiene una propiedad de tipo inductor que no la pierde al ser transplantada. Concluimos que el fenotipo del axón está regulado por claves locales.

173

FUNCION DE ACROSINA EN LA REACCION ACROSOMICA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS. (Role of acrosin in the human sperm acrosome reaction). Morales, P., Vigil, P. y Llanos, M. 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). Se ha sugerido que una serina proteasa acrosomal, denominada acrosina, podría estar involucrada en alguno de estos procesos. En el presente trabajo investigamos el efecto de varios inhibidores de acrosina (de bajo peso molecular y diferente mecanismo de acción), sobre la capacidad de los espermatozoides humanos de unirse y penetrar la ZP y 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 % CO₂/95 % aire, a una concentración de 1 x 10⁷ células/ml. Después de incubar por 5 h, los espermatozoides fueron tratados con 1 mM del inhibidor competitivo p-aminobenzamida (pAB) o con PBS (control) por 30 min. Luego, los espermatozoides se co-incubaron con 2-3 ZP (obtenidas de oocitos humanos no viables) por 3 h y se cuantificó el número de espermatozoides penetrados y unidos a la superficie de la ZP. Los resultados indican que la pAB inhibe la penetración a la ZP (56±8 % control vs 0 % en el tratado, x±sem), sin afectar significativamente el proceso de unión. Resultados preliminares indican que la pAB inhibe la RA inducida por la ZP en un 85 % (39±5 control vs 6±2 tratado). Experimentos adicionales, en los cuales espermatozoides fueron tratados con TLCK, NPGB (inhibidores por modificación covalente) o pAB demuestran una marcada inhibición de la RA (75-80 %) inducida por fluido folicular humano. Estos resultados sugieren que la acrosina podría participar en el proceso de RA en el espermatozoide humano. Financiado por FONDECYT 0823/90 y RF 89033/42.

172

INMUNOLocalización DE ACROSINA EN ESPERMATOZOIDES DE HAMSTER y COBAYO DURANTE LA REACCION ACROSOMICA (Immunolocalization of acrosin in hamster and guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction).

Crosby, J. y Barros, C.

Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Trabajos previos en hamster dorado indicarian la existencia de una relación entre la pérdida de la capacidad de penetración de la zona pelúcida y una pérdida de acrosina desde el acrosoma en espermatozoides preincubados por largos periodos de tiempo. Sin embargo, espermatozoides de cobayo mantienen la capacidad de penetración hasta por tres horas después de ocurrida la reacción. La detección de acrosina a MCF y MEB en espermatozoides de cobayo se realizó mediante anticuerpos monoclonales antiacrosina revelados con técnicas de oro coloidal y amplificación con plata. Estos indicaron la existencia de patrones de marcación para acrosina semejantes en ambas especies. La detección de acrosina a nivel ultraestructural a MET en espermatozoides de hamster, cobayo se realizó mediante un anticuerpo policlonal antiacrosina revelado con un segundo anticuerpo conjugado a oro coloidal. En espermatozoides de hamster después de ocurrida la reacción, acrosina está asociada fundamentalmente al capuchón acrosómico y muy poca asociada a la superficie de la membrana acrosómica interna (MAI). Por otra parte, en el cobayo, acrosina permanece asociada a la MAI lo que explicaría la capacidad de penetración de la zona pelúcida por estos espermatozoides.

FONDECYT 495/89 y 577/89.

174

INTERACCIONES GAMÉTICAS EN HUMANOS: ESTUDIO MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-ACROSINA. (Gamete interactions in human: study by anti-acrosin monoclonal antibodies). Cadote, C. & Sepúlveda, M.S.* Laboratorios de Embriología e Inmunología, Fac. Cs. Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Acrosina, una serina proteasa acrosomal, interviene en etapas previas a la fusión espermatozoide-huevo. Su actividad proteolítica se ha relacionado con la penetración de la zona pelúcida (ZP), y actualmente se postula su participación en la unión a la ZP, mediante su sitio de unión a fucosa.

El papel de acrosina en ambos eventos, se estudió mediante un panel de anticuerpos policlonales y monoclonales (AMC) anti-acrosina, realizando ensayos de inmunodetección por microscopía de luz y electrónica, ensayos de ELISA y ensayos biológicos con gametos humanos (espermatozoides y zonas pelúcidas).

Mediante estudios al microscopio de luz fue posible reconocer diversos patrones de marcación para acrosina. Estos patrones se corresponderían con el estado de reacción acrosómica de los espermatozoides. Estudios con microscopía electrónica de transmisión mostraron la presencia de acrosina en espermatozoides reaccionados. Esta acrosina podría estar involucrada en la unión secundaria con la ZP.

Bioensayos realizados en presencia de AMC, cuya unión a la enzima es afectada por fucosa, muestran que es posible bloquear la unión espermatozoide-ZP.

Financiado por FONDECYT 495/89 y 577/89 a C. Barros y A. De Ionannes respectivamente.

(*): Becaria P. Universidad Católica de Chile.

175

VARIACIONES DE LA MOTILIDAD Y R.A. EN ESPERMATOZOIDES INCUBADOS EN PRESENCIA DE ZINC. (Changes of motility and RA of zinc incubated spermatozoa).

Leiva, S.; Riffe, M.; Astudillo, J. y Vial, María J. Departamento Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La motilidad, capacitación y reacción acrosómica son fenómenos imprescindibles para que el espermatozoide fecunde al ovocito, los cuales dependen de variados factores entre los cuales estaría el Zn^{++} .

El objetivo de este estudio es analizar la [] de Zn^{++} intra y extracelular y la influencia del Zn^{++} extracelular en el fenómeno de motilidad y la reacción acrosómica (RA) de una población seleccionada con alta motilidad.

En fracciones de cada muestra de semen se cuantificó la [] de zinc espermático y del plasma seminal por método colorimétrico. Espermatozoides que fueron lavados y separados por columna de perlas de vidrio, ajustada la concentración a 10×10^6 cél./ml, se incubaron en un medio de capacitación "in vitro" por diversos tiempos y con diferentes [] de Zn^{++} . Se incubó a $37^\circ C$ en una atmósfera humificada y luego de 2, 4 y 6 h. se evaluó motilidad, vitalidad y RA (triple tinción). Las células incubadas en presencia de Zn^{++} mostraron inhibición de la motilidad y de la RA en relación al control (adición de PBS). Las [] de zinc intra-celular y del plasma seminal mostraron gran variación individual; se relacionó estos valores con los de motilidad y RA.

Los datos indican que el Zn^{++} ejercería un efecto inhibitorio de la motilidad, ya sea por bloqueo a nivel mitocondrial o eventos asociados a componentes (deslizamiento) del flagelo. La RA se inhibe de manera dosis dependiente donde el Zn^{++} estaría bloqueado algún evento propio de la capacitación y/o RA, como sería la inactivación de algunas enzimas directa o indirectamente comprometidas en estos procesos, que requiere ser más estudiado. (Proyecto B-2687-8823 D.T.I., U. de Chile).

177

DIETAS RICAS EN COLESTEROL Y ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS Y LA CINÉTICA DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES DE CONEJO. (Cholesterol and polyunsaturated enriched diet and acrosomic reaction of rabbit sperm). Diaz, Fontdevila M.F. y Bustos Obregón E. Dpto. Biología Celular y Genética, Fac. de Medicina, U. de Chile.

Conejos alimentados con dietas ricas en Colesterol (0,5 %) y Col. más aceite de pescado, durante 5 meses mostraron hipercolesterolemia luego de 15 días de dieta. Sin embargo estos niveles séricos no influyeron en el contenido de Col del plasma seminal. Cabe destacar que solo 2 conejos alimentados con la dieta rica en Col y 1 de la dieta rica en Col más aceite, emitieron muestras de semen durante el período en estudio. No disponemos aún una respuesta adecuada para explicar este fenómeno observado solo en animales alimentados con sobrecarga de Col.

Respecto a la cinética de la reacción acrosómica en los mismos, se observó en los espermatozoides de ambos grupos, que a las 4 y 6 Hs de capacitación el porcentaje de espermatozoides que sufren la RA respecto a los controles es menor. Este efecto no es revertido por la incubación ("in-vitro") de los espermatozoides con el medio depletante de Col de Shinitsky. Estos resultados coinciden con datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, que indican que la relación Col:Fosfolípidos de espermatozoides tratados respecto a los controles es la misma. Por ende podemos sugerir que en este caso el nivel de Col de los espermatozoides no es causante de la disminución del Porcentaje de la RA observada.

Financiado por : Proyecto Rockefeller y Proyecto PLACIRH.

176

Efecto de la albúmina sérica en la fecundación de mamíferos (Effect of seric albumin on mammalian fertilization). Moreno, R. D. Meléndez, J. Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Católica de Chile

En mamíferos, la albúmina sérica estaría involucrada en la sobrevida, capacitación, reacción del acrosoma de los espermatozoides así como en la fecundación. En este trabajo se evaluó el efecto de albúmina sérica humana (HSA) y bovina (BSA) en la capacidad fecundante de espermatozoides humanos y de hamster. Para el primer caso espermatozoides se capacitaron en medio de cultivo con concentraciones de 0,3; 1,5 y 3,5% de HSA y BSA evaluándose su capacidad fértil mediante el test de fusión de membranas gaméticas. En espermatozoides de hamster se evaluó el efecto de BSA sobre la hipermotilidad, sobrevida, reacción acrosómica y capacidad fecundante. Se utilizaron las concentraciones experimentales de 0,05 y 0,005% en TAPL-10K suplementado con PVP-40, 0,5%. En los experimentos controles se utilizó 1,5% de BSA. Los resultados mostraron que la tasa de fecundación de espermatozoides humanos no depende ni del tipo ni de la concentración de albúmina $p < 0.01$. En espermatozoides de hamster, en ambas concentraciones de BSA, la sobrevida, hipermotilidad y reacción acrosómica no se diferencian significativamente entre ellas ni con los controles. Sin embargo, la tasa de fecundación fue significativamente mayor en los controles (>70%). En los experimentos realizados con 0,05% de BSA, los espermatozoides en la superficie de la zona pelúcida tenían el acrosoma intacto, lo que explicaría la baja tasa de fecundación en los huevos de hamster con zona. Financiado por Grant FONDECYT 495/89 al Dr. C. Barros.

178

EVALUACION DEL POTENCIAL DE FERTILIDAD DE UN INDIVIDUO A TRAVES DEL ENSAYO DE PENETRACION A LA ZONA PELUCIDA DE OOCITOS HUMANOS CADAVERICOS (ZPHOC). (Evaluation of male fertility potential by the penetration to the human zona pellucida of non-viable oocytes assay. Vantman, D., Madariaga, M., Saavedra, M., Gutiérrez, G. Instituto Investigaciones Materno Infantil. Dept. Obst. y Ginecología, Fac. Medicina, U. de Chile, Hosp. Paula Jaraquemada. (Patrocinio: R. Smith).

El espermograma tradicional ha sido ampliamente usado en la evaluación del potencial de fertilidad de un individuo. Sin embargo su correlación con fertilidad es discutida. Diferentes laboratorios han orientado su trabajo a la búsqueda de ensayos que evalúen distintos aspectos funcionales del espermatozoide humano que participan en la fertilización. El objetivo del presente trabajo es evaluar el potencial de fertilidad de un individuo a través del ensayo de penetración a la zona pelúcida humana de oocitos cadavéricos (ZPHOC). 19 parejas ingresaron al programa de fertilización in vitro. El día de la aspiración folicular a cada paciente y a un donante con fertilidad probada se les solicitó una muestra de semen, los gametos móviles se recuperaron a través de swim-up. Post swim-up, la muestra se alícuotó en dos fracciones. Con la primera se inseminó los oocitos viables y con la segunda los oocitos cadavéricos. Se inseminaron 50.000 células móviles por oocito viable y 5.000 por oocito cadavérico. 18 hrs. post inseminación, se evaluó la presencia de pronúcleos como marcador de fertilización y simultáneamente la presencia de espermatozoides en el espacio perivitelino como indicador de penetración a ZPHOC. En cada experimento se utilizó un donante que penetró al menos un oocito cadavérico; 16 pacientes fertilizaron los oocitos viables y al mismo tiempo penetraron la ZPHOC. En 2 pacientes no hubo signos de fertilización ni de penetración a la ZPHOC. Solo un paciente fertilizó los oocitos viables y no penetró la ZPHOC. Estos datos sugieren que la penetración a la ZPHOC podría ser un buen ensayo de la evaluación del potencial de fertilidad de un individuo.

179

INFLUENCIA DEL HUEVO SOBRE EL TRANSPORTE OVULAR.
Ortiz, M.E., Gajardo, G., Mosso, L., Rojas, P.
Laboratorio Endocrinología, Facultad de Ciencias
Biológicas, Pontificia Universidad Católica de
Chile. Casilla 114-D. Santiago-Chile.

En el hamster, pero no en la rata, el paso de los huevos por el oviducto es más rápido cuando están fecundados (HF) que cuando no lo están (HNF). (Biol. Reprod. 26:337-341, 1982; 34:777-781, 1986). Debido a que tanto los huevos como el perfil hormonal difieren en animales apareados y no apareados, se comparó el transporte de HF y HNF en hembras pseudopreñadas (SP) o en ciclo estral (CE), que fueron inseminadas artificialmente con espermatozoides fértiles o infértiles. En la rata la inseminación se hizo en la noche del proestro y en el hamster en la madrugada del estro después de inducir SP con macho vasectomizado. También se transfirió HF o HNF de hamster o embriones de rata de 1 ó 4 células al oviducto de ratas en día 1 de preñez. Se determinó la ubicación de HF, HNF, huevos nativos y transferidos a tiempos apropiados para discriminar cuales pasan antes al útero.

Se estableció que el oviducto de la rata no discrimina entre HF y HNF de rata pero si discrimina entre HF y HNF de hamster y entre embriones de rata en distintos estados de desarrollo. El oviducto de hamster discrimina entre HF y HNF de hamster tanto en CE como en SP. Se postula que HF de hamster y embriones avanzados de rata producen una señal que adelanta el paso de los huevos desde el oviducto al útero.

Financiado por Rockefeller 88077 y FONDECYT 0652/90.

180

RELOJ DEL DESARROLLO
ANTES DE LA IMPLANTACION

(Developmental clock prior to implantation) Naves, R. y Pey, R.* Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En una población de embriones de ratón que tienen la misma edad en relación con la inyección de hCG que provocó la ovulación, se observa asincronía en las divisiones celulares, la compactación de la mórula y la blastulación. Como dicha asincronía podría atribuirse a que la fecundación no fue simultánea, aunque lo haya sido la ovulación, separamos los embriones al tiempo de la segunda división celular en dos poblaciones: los primeros en dividirse (avanzados) y los últimos en hacerlo (atrasados). Luego comparamos las dos poblaciones respecto de las cinéticas de la compactación y blastulación. Se observó que la diferencia temporal entre los dos grupos no aumentaba sino que disminuía, lo cual sugiere que los embriones avanzados no tienen un reloj del desarrollo más veloz y los atrasados uno más lento. Sugiere, en cambio, que los relojes del desarrollo durante esta etapa de dos días no tienen un funcionamiento regular. A la misma conclusión se llega analizando la compactación que sólo dura algunas horas: el tiempo que tarda la compactación de diferentes embriones es distinto y también son distintos los tiempos que tardan los diferentes estados de semi-compactación que pueden distinguirse con exactitud.

Financiado por FONDECYT y Universidad de Chile

* becario FUNDACION ROCKEFELLER

181

INHIBICION DE LA IMPLANTACION IN VITRO
Y SINTESIS PROTEICA

(Inhibition of in vitro implantation and protein synthesis) Baiza, L.A.*, Mayor, R., Izquierdo, L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Hemos comparado blastocistos de ratón implantados *in vitro* (I) con blastocistos inhibidos de implantar (II) por interferencia de una capa de agarosa. La síntesis proteica fue estudiada por incubación del material en metionina-³⁵S y electroforesis en geles uni- y bi-dimensionales. Se analizó el patrón de síntesis proteica del embrión total, de las fracciones solubles e insolubles en Tritón X-100 (0,5%) y de esta última la fracción soluble en sulfato de amonio (250 mM). Comparando los geles de I con los de II no se reconocen diferencias cualitativas en ninguna de dichas condiciones. Pero comparando las proteínas secretadas al medio se reconoció un patrón de síntesis diferente: en II se observa una banda de peso molecular 84 kd que no se observa en I, además de otras diferencias menos notables. También se realizaron controles cuantitativos de incorporación y síntesis; y controles morfológicos.

* Becario de FUNDACION ROCKEFELLER

Financiado por FONDECYT y Universidad de Chile

182

EFFECTO ANTIIMPLANTACIONAL DEL DL-PROPRANOLOL A NIVEL ENDOMETRIAL (Antiimplantation effect of DL-propranolol at endometrial level). Bruzzone M.E., Daille C. y Chávez M. Depto. Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

Anteriormente demostramos que la administración endouterina del bloqueador β adrenérgico DL-propranolol inhibe la implantación en la rata. Para dilucidar si este efecto se realiza a nivel del endometrio o blastocisto se utilizaron 2 modelos de trasplante de embriones en ratas de la cepa Sprague Dawley:

- 1) entre un grupo de ratas preñadas, instiladas el día 1 en ambos cuernos uterinos con concentraciones crecientes de DL-propranolol (37.5 a 150 mM), y uno de ratas pseudo-preñadas (previo al cruzamiento se practicó salpingoligadura del lado derecho).
- 2) entre un grupo de ratas preñadas y uno de ratas pseudo-preñadas instiladas el día 1 con el fármaco en las mismas concentraciones anteriores, en el cuerno uterino derecho (el cuerno izquierdo se usó como control).

Entre las 7:00 y 8:30 AM del día 5 se realizó un flushing de los cuernos uterinos de las ratas preñadas. Los blastocistos obtenidos fueron transplantados al cuerno salpingoligado de las ratas pseudo-preñadas. Al día 9 estas ratas fueron laparotomizadas para cuantificar el Nº de implantaciones presentes en ambos cuernos.

Se encontró que en el modelo 1 se produjo implantación mientras que en el 2 no. Estos resultados indican que el efecto antiimplantacional del DL-propranolol se ejerce a nivel del endometrio uterino y no afecta al blastocisto.

183

DESARROLLO DE UN ELISA PARA CUANTIFICAR HCG POR INHIBICION DE LA REACCION IDIOTIPO-ANTI-IDIOTIPO. (Development of an ELISA for hCG quantitation by idiotypic-anti-idiotypic reaction).J.E. Aguayo, A. Jamett, M.L. Becker.

Unidad de Inmunología, Bios Chile I.G.S.A.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es secretada tempranamente por el trofoblasto, en cantidades detectables alrededor de los 10 días después de la fecundación del oocito. La presencia de hCG en un momento diferente del embarazo está asociada con la presencia de numerosos tumores.

En este trabajo se describe la aplicación de la reacción entre un idiotype anti-hCG (anticuerpo de captura) y su anti-idiotype (anticuerpo indicador) para cuantificar hCG por ELISA. Esta reacción es ideal para antígenos que por su tamaño no se pueden cuantificar por un ELISA de captura convencional y ha demostrado ser específica y sensible para determinar insulina, antígenos virales, tumorales y de parásitos.

Los anticuerpos monoclonales anti-idiotype se obtuvieron inmunizando ratones con el anticuerpo anti-hCG-6C3-2 y posteriormente se realizó una fusión somática de acuerdo a procedimientos estándares. La selección de anti-idiotypes se hizo mediante un ensayo de aglutinación de partículas de látex cubiertas con el idiotype. La especificidad de los anticuerpos se determinó mediante inhibición con hCG en solución.

Los resultados obtenidos indican que es posible utilizar esta metodología para medir hCG en rangos fisiológicos.

Financiado por proyecto CORFO 08028.

184

POSIBLE PAPEL DE LA PROGESTERONA EN EL DESARROLLO FOLICULAR. (Possible role of progesterone in follicular development). Croxatto, H.B., Salvatierra, A.M. y Forcalleto, M.L. Instituto Chileno de Medicina Reproductiva. Santiago, Chile.

La concentración de progesterona durante la fase folicular del ciclo menstrual humano oscila entre 0.4 y 1.5 ng/ml en el plasma periférico, y entre 100 y 2000 ng/ml en el líquido folicular y es cuatro veces mayor en el efluente venoso del ovario que va a ovular que en el contralateral. El papel de la progesterona intrafolicular y de la progesterona circulante durante la fase folicular se desconoce. La antiprogesterina RU486 es un esteroide sintético que se une al receptor de la progesterona sin activarlo e impidiendo que la hormona natural actúe en la célula blanco. Se estudió el efecto de RU486 sobre el desarrollo folicular en la mujer, postulando que si progesterona interviene en su regulación, este debería alterarse. Se administró 10, 25, 50 o 100 mg/día de RU486 o Placebo por 3 a 7 días en distintos segmentos de la fase folicular y se midió diámetro folicular, estradiol, progesterona y gonadotropinas plasmáticas y duración de la fase folicular y lútea.

Durante el tratamiento con RU486 el desarrollo folicular se hizo más lento y cesó el aumento del estradiol plasmático sin que se observara una reducción significativa de las gonadotropinas circulantes. Aproximadamente 13 días después de suspendido el tratamiento, la retroalimentación positiva de estradiol sobre secreción de LH se hizo evidente por un pico de LH, el que fue seguido por una fase lútea de caracteres normales.

Estos resultados son compatibles con un posible rol de progesterona en el desarrollo folicular normal.

Financiado por FONDECYT 818/90 y The Population Council, N.Y.

185

INTERACCION ENTRE TOCOLITICOS Y PGF2a EN UTERO PRENADO DE RATON (Interaction between tocolytic agents and PGF2a in pregnant rat uterus). Neumann, V., Cruz, M.A., González, C., Gallardo, V. y Rudolph, I. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad Ciencias Biológicas, U. de Concepción.

En humanos hay claras evidencias que las prostaglandinas ejercerían un rol importante en la progresión del parto. Se estudia el efecto in vitro de los tocolíticos Ritodrine, Fenoterol, Sulfato de Magnesio, Nifedipina y Verapamil sobre la actividad evocada por PGF2a en cuernos uterinos de ratones de 15 días gestación. El tejido se montó en un baño de órgano aislado, registrándose los cambios de contractilidad en un polígrafo Grass a través transductores de tensión isométrica. La amplitud promedio de las contracciones espontáneas fue 3.5 ± 1.2 g con una frecuencia de 15 contracciones/minuto. La PGF2a produjo un aumento dosis-dependiente de la contractilidad uterina. Ritodrine 10-8M inhibió en un 50% las contracciones máximas evocadas por PGF2a. Fenoterol a la misma dosis demostró tener una potencia levemente superior a Ritodrine. Nifedipina 10-7M inhibió completamente las contracciones espontáneas y en un 50% las contracciones máximas inducidas por PGF2a, en cambio dichos parámetros no fueron significativamente modificados por Verapamil(10-7M). Sulfato de Magnesio (6 mEq/l) sólo inhibió las contracciones espontáneas. Este diferente patrón de respuesta permite sugerir que la contractilidad espontánea se debe a la participación de otros mediadores endógenos diferentes a las prostaglandinas.

Proyectos D.I. 20.33.39, 20.33.37, 20.33.54, FONDECYT 89-0706

186

EFECCIO DE FLUTAMIDE SISTEMICO E INTRATESTICULAR EN LA RATA (Effect of Intratesticular and systemic Flutamide in the rat). Vilches, V. y Ostermann, P. Depto. de Morfología Experimental, Fac. de Medicina, Univ. de Chile (Patrocinio: B.A. Morales).

La funcionalidad testicular (espermatogénesis) y de las glándulas sexuales accesorias depende en gran medida de los andrógenos. Nuestro objetivo principal fue ver el efecto de la administración de un Antiandrogéno (Flutamide) sobre la actividad testicular de la rata y además -comparar los efectos del fármaco según vía de administración. A Ratas Donjou machos se les administró Flutamide a) 25 mg/Kg/día o su solvente (grupo control) S.C. desde los 5 a 30 días de edad y b) 12.5 a 25 mg subcapsular -testicular (I.T.) en el testículo derecho, sirviendo el contralateral de control, durante 30 días. Al sacrificio se disecaron y pesaron los testículos, epidídimos y V. -Seminales. En los cortes transversales de testículo teñidos con H-E se midió: diámetro tubular, altura del epitelio seminífero, estado de la espermatogénesis, N° de células de Leydig (C.L.) y su diámetro citoplasmático y nuclear.

Los machos que recibieron Flutamide S:C presentan menor peso testicular, epididimario y de V. Seminales. La espermatogénesis está detenida en espermatocito I y muestra un aumento significativo del N° y tamaño de las C.L. -comparado con los controles. Los testículos que recibieron el fármaco subcapsular son de menor tamaño y la espermatogénesis está detenida en espermatocito I (e incluso en algunos túbulos existen sólo gonias; presentan un aumento en el N° y tamaño de las C.L. (y de los macrófagos) comparado con el que recibió sólo solvente.

El Flutamide sistémico bloquea los receptores androgénicos a nivel periférico (disminución del peso del tracto reproductivo) y central (aumenta la liberación de LH hipofisaria, con aumento de las C.L.). La estimulación de las C.L. en los inyectados intratesticularmente en ausencia de efecto del contralateral, podría atribuirse a un factor paracrino liberado por el túbulo seminífero en involución.

187

EFFECTO DE FSH, TESTOSTERONA Y LH EN EL INTERSTICIO TESTICULAR DE RATAS INYECTADAS CON CITRATO DE CLOMIFENO DESDE EL NACIMIENTO (FSH, Testosterone and LH effect on testis of clomifen treated rats from birth). Morales, B.A.; Zamora, C.; Pineda, P. y Heyn, R. Depto. Morfología Exp., Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La administración de altas dosis de citrato de clomifeno (C.C.) produce una atrofia testicular, quedando los túbulos seminíferos con células de Sertoli y Gonia y el intersticio con escasa celularidad (fibroblastos y mastocitos, sin células de Leydig). Como una manera de apreciar el efecto hormonal sobre el Intersticio del testículo - atrofico, se administró FSH, Testosterona o LH.

Machos tratados durante 45 días con C.C. fueron distribuidos en 5 grupos: Control (C.C.); C.C.+FSH; C.C.+T; C.C.+FSH+T; C.C.+L.H. A los 21 días de tratamiento se sacrificaron diseccionando el tracto reproductivo; éste fue pesado y fijado para M. Óptica. En el Intersticio de cortes transversales del testículo se determinó el N° de células por campo, tipificando cada una de ellas por sus características citológicas.

Los grupos C.C. y C.C. + FSH presentan menor peso y tamaño del tracto reproductivo respecto de los otros grupos. Los animales tratados con C.C. tienen menor celularidad, fundamentalmente fibroblastos y mastocitos; con FSH se produce un aumento celular, pero éstas son principalmente macrófagos; con LH, el aumento es debido a la diferenciación de las células de Leydig y con T. hay una disminución acentuada de la celularidad (con disminución de los mastocitos).

El C.C. produce un aumento de los mastocitos testiculares (un efecto similar se ha descrito para el Estradiol). La FSH produce un aumento de los macrófagos; esto podría ser explicado por la presencia de receptores para FSH en estas células y podría implicar factores quimiotácticos testiculares que atraerían a los monocitos al órgano. La LH produce diferenciación de células de Leydig a partir de las fibroblastos existentes. La Testosterona produce una despoblación celular e incluso, disminuye los mastocitos pre-existentes por efecto del C.C.

189

ACCION TERATOGENICA DEL ALCOHOL SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL POLLO (The teratogenic action of the alcohol on the chick embryonic development.)

Coloma S., L.A.; Illanes H., J.L. Depto. Histología y Embriología, Universidad de Concepción. Depto. Morfología Experimental, Universidad de Chile.

La utilización de animales de laboratorio en investigación, proporciona las bases biológicas de nuestro conocimiento, acerca de las acciones teratógenas del alcohol sobre el desarrollo embrionario humano, es por esto, que se planteó el estudio de la acción del alcohol sobre el embrión del pollo, para analizar los probables daños a provocarse en su morfología.

Se usaron huevos fecundados de gallina y se incubaron a 38° C. Se inyectaron en sus cámaras de aire con 0.1 ml de etanol (de 20,40 y 60% de alcohol absoluto), un grupo el día 1 y el otro el día 4, los controles respectivos fueron inyectados de la misma manera con solución fisiológica salina. Se extrajeron a los 11 días de incubación para observación macroscópica e histológica, principalmente de su región craneofacial.

Los embriones tratados manifestaron diversas malformaciones e hipodesarrollo que comprometieron órganos y sistemas tales como: retardo del desarrollo del tejido cerebral, de maxilas, del globo ocular (microftalmia unilateral), disminución de talla corporal, eventración abdominal, etc. Tal vez, debido a que la muestra analizada debe aumentarse en número, o el periodo temprano en que fueron afectados, no se manifestaron diferencias notorias de la respuesta embrionaria al agente teratogénico, respecto de las diferentes gradaciones de etanol utilizadas.

Se concluye que dosis agudas de etanol dadas por una única vez, son capaces de modificar y trastornar notablemente la morfogénesis del embrión de pollo.

PROYECTO N° 203604

Dirección de Investigación
Universidad de Concepción

188

ROL DEL EPITELIO GERMINAL EN LA FOLICULOGENESIS TEMPRANA DE *Liclaemus gravenhorsti*. (Role of germinal epithelium during initial folliculogenesis in *Liclaemus gravenhorsti*). Johnson, E.,¹ y Leyton, V.,²

(1) Depto. de Biología, Fac. de Ciencias Básicas, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.

(2) Lab. Biología de la Reproducción, Depto. Morf. Exp., Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

El ovario adulto de *Liclaemus gravenhorsti*, se caracteriza por presentar folículos en distintos grados de maduración, 2 nidos germinales y una escasa cantidad de estroma ovárico. Dichos nidos germinales constituyen la fuente generadora de ovocitos.

Con el fin de determinar el origen de las células foliculares que envuelven al ovocito, ovarios de hembras adultas fueron procesadas mediante técnicas habituales de M.O. y M.E.T.

El análisis de las muestras revela que al interior de los nidos germinales se encuentran ovocitos que se rodean por células somáticas constituyendo un epitelio plano, simple. Estas células establecen uniones especializadas entre ellas y el ovocito.

Se concluye que son las células del epitelio germinal (celómico) las que al asociarse con ovocitos al estado de dictioteno constituyen la unidad precursora de los primeros folículos al interior del nido germinal.

190

VARIACION GENETICA EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA FISURA PALATINA INDUCIDA POR STRESS. (Genetic variation of susceptibility to stress-induced cleft palate).

Montenegro, M.A., Palomino H. y Zaror V. Dptos. Morfología Exp. y Biol. Cel. y Gen. Fac. Medicina, U. de Chile.

En estudios previos observamos que la incidencia de fisuras faciales aumentó en Santiago durante 1965, lo que postulamos se debía al stress producido por un movimiento sísmico. En un estudio experimental con ratones sometidos a stress mecánico corroboramos esta hipótesis.

Existen diferencias en la susceptibilidad a la fisura entre cepas de ratones (A/Sn y B10) inducida por glucocorticoides y esta diferencia puede ser atribuida principalmente a diferencias en el sistema mayor de histocompatibilidad (H-2) del ratón.

Con el objeto de examinar la respuesta al stress inducido por movimientos mecánicos en ambas cepas de ratones, se sometieron, en 4 grupos experimentales, hembras preñadas de 13,5 días de gestación de las cepas A/Sn y B10 a: 1) movimientos similares al terremoto de 1965 en Santiago. 2) movimientos con la mitad de la intensidad. 3) una inyección intramuscular de Dexametasona (500ug). 4) una inyección de Dexametasona con la mitad de la dosis (250 ug).

Nuestros resultados muestran que: a) se produce fisura palatina en ratones por efecto del movimiento mecánico solo cuando éste es de gran intensidad. b) La cepa A/Sn es más susceptible que la B/10 a las mismas intensidades del efecto. c) Con glucocorticoides, la inducción de fisura tiene similar comportamiento que con el movimiento mecánico, siendo A/Sn más susceptible que B/10 y dependiente de la intensidad de la dosis.

Postulamos que el movimiento sísmico produce un stress siendo la cantidad de glucocorticoides secretada mayor en las cepas A/Sn, lo que origina una mayor incidencia de fisura palatina.

PROYECTOS: FONDECYT 0801-89 y DTI U. Chile 2368.

191

EFFECTO DEL CORTISOL (C) Y DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH) SOBRE LA MORFOLOGIA Y COMPOSICION DEL TEJIDO CONECTIVO DEL PULMON FETAL. (Effects of cortisol and thyrotropin releasing hormone (TRH) on morphology and connective tissue composition of the fetal lung). Campos, G.A., Crovetto, E., y Guerra, F.A. Instituto de Fisiología, Universidad Austral de Chile.

Existe sinergismo entre C y TRH en la aceleración de la madurez pulmonar fetal. Se investigó el efecto de ambas hormonas sobre la morfología y la composición del tejido conectivo pulmonar en fetos ovinos infundidos con C (1 µg/hora) o TRH (25 µg/min en pulsos horarios mas C (1 µg/hora). Se realizó cateterización vascular in útero a los 117 días para comenzar la administración de C (94 hrs) o TRH (7 días) mas C (94 hrs) a los 121 días de gestación. Se obtuvieron muestras de plasma para pH y Gases y para análisis hormonales. Los fetos fueron extraídos por cesárea a los 128 días estudiándose la distensibilidad (V40) y estabilidad (V10) pulmonar. Los análisis morfométricos fueron hechos después de fijar el pulmón en Bouin durante 48 hrs a 20 cm/H2O (pulmón derecho). El pulmón izquierdo se utilizó para análisis de desmosina-isodesmosina e hidroxiprolina por cromatografía de gases. Los resultados obtenidos muestran:

	TRH + C	C	P
n	8	10	
Edad gestacional	128.9	129.7	NS
Distensibilidad (V40 ml/g)	1.6+/-0.14	0.46+/-0.07	0.001
Estabilidad (V10 ml/g)	0.40+/-0.11	0.21+/-0.03	0.01
V ₀	0.70+/-0.04	0.63+/-0.05	0.01
V ₁₀	0.76+/-0.02	0.73+/-0.02	0.011
EPH (µm)	3.53+/-0.34	8.64+/-5.9	0.014
Hidroxiprolina (µg/mg peso seco)	10.1+/-2.7	4.27+/-0.80	0.001
Desmosina (µg/mg peso seco)	128.2+/-35.2	41.02+/-12.7	0.001

Conclusiones: la administración conjunta de TRH y C induce cambios funcionales, estructurales y a nivel de tejido conectivo importantes en el pulmón fetal comparados con la administración sólo de C. (FONDECYT 932/88.)

193

CICLO REPRODUCTIVO DE OSTION DE CHILOE (*Chlamys amandi*). Reproductive cycle of Chiloe scallop (*Chlamys amandi*). ¹Jaramillo, R. ²Winter, J. ³Colcochecha, O. ³Valencia, J. Instituto de Embriología, U.A.C.H. ⁴Instituto de Biología Marina, U.A.C.H. ³IFOP-⁴Antud.

El ostión de Chiloe (*Chlamys amandi*), es una especie gonocórica, endémica de las aguas interiores de Chiloe. Se distribuye batimétricamente entre los 18 mts. a 30 mts. de profundidad (Viviani, 1979). Su longitud máxima alcanza a los 6 cms. y se caracteriza por tener una concha delgada de color rojizo y con muchas estrías.

Con la finalidad de contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de esta especie, se inició el estudio histológico del ciclo reproductivo e índice de condición gonadal (ICG) en el mes de octubre de 1989, a partir de ejemplares capturados en forma natural y mantenidos en cultivo en el Centro de Maricultura Hueihue (IFOP) en la Bahía de Hueihue (41°58'S; 73°30'W) Ancud, Chiloe.

Los resultados obtenidos a partir del ICG nos indican un posible período de vaciamiento gonadal durante noviembre, seguido de una recuperación cuyo máximo valor se alcanza durante enero produciéndose un nuevo vaciamiento en febrero para luego estabilizarse en valores bajos durante los meses siguientes, para reiniciar su recuperación durante agosto de 1990.

Se discute la presencia de un estado de hermafroditismo en una especie que se ha descrito como gonocórica.

Financiado por FONDECYT 158-1987.

192

COMPORTAMIENTO DE TEJIDOS DENTARIOS DE CONEJO ADULTO EN ASOCIACION HETEROESPECIFICA (CONEJO-CODORNIZ). (Behavior of rabbit dental tissues in heterospecific association with embryonic quail ectoderm). Lemus, D., Illanes, J., Grunert, G., Lemus, R. y Fuenzalida, M. Depto. Morf. Experimental, Fac. Medicina, Universidad de Chile.

Se ha demostrado que la papila dentaria es capaz de inducir la odontogénesis, incluso sobre un epitelio heterotópico-heteroespecífico. En un trabajo anterior comunicamos que la porción formativa de la pulpa dentaria de conejo adulto no posee este potencial odontogénico al actuar sobre epitelio del flanco de embriones de codorniz. En este trabajo hemos estudiado el comportamiento de las mismas pulpas dentarias de conejo sobre epitelio del arco mandibular de embriones de codorniz. Mediante técnicas microquirúrgicas=enzimáticas, aislamos epidermis branquial (I arco) de embriones de codorniz, la cual cultivos asociada a región formativa de pulpa dentaria de conejo adulto, en medio semisólido y alantocorion de embrión de pollo. En calidad de controles se cultivaron, en forma aislada, pulpa dentaria y ectoderma. Después de 6 días de incubación, observamos formación de láminas dentarias incipientes y campanas dentarias químéricas, en tanto que los controles involucionaron o se diferenciaron según su propio fenotipo, sin originar estructuras dentarias. Los resultados estarían indicando que la pulpa dentaria estudiada manifestaría potencial odontogénico al cultivarse en presencia de epidermis del I arco, lo cual no ocurre cuando esta región de la pulpa es cultivada, en las mismas condiciones experimentales, con ectoderma no mandibular.

Proyecto B 2681-8822 DTI.

194

MORFOLOGIA CELULAR VAGINAL COMO UN METODO PARA EVALUAR CONCENTRACION DE HORMONAS OVARIICAS. (Vaginal cell morphology as a method to evaluate ovarian hormone concentration). Reyes, F.; Guerra, S.; Del Campo, L.; Klassen, R.; González, U.; Acuña, A. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Depto. de Biología Molecular, Universidad de Concepción.

Desde el nacimiento hasta la edad senil, todos los mamíferos hembras presentan una sucesión de hechos biológicos caracterizados por las fases de: infancia, niñez, pubertad, adulto y senilidad; al respecto se sabe que la secreción de estrógenos, es la principal causa de inducción de los índices fisiológicos que diferencian las fases anteriores.

Las hembras de la especie *Pudu pudu* estudiadas pertenecen al criadero de la Universidad de Concepción, la metodología usada fue obtener muestras mediante un frotis vaginal de 5 hembras adultas con intervalos de 15 días (para las hembras, A, B, C y D) durante los periodos de niñez, puerperio y lactancia y con intervalo de 2 días durante el período sexual activo, (marzo y abril), la técnica empleada fue la de Papanicolaou. Las células observadas se clasificaron en: Basales, Intermedias y Superficiales. Los resultados indican que durante el período de preñez hubo predominio de intermedias con escasa presencia de superficiales; en el período de puerperio y lactancia se observa un aumento de células basales y una disminución de intermedias con respecto al estado anterior, en el período sexual activo además de la presencia de células basales e intermedias se observó un leve aumento de células superficiales con respecto a los estados anteriores; sin embargo, este aumento no es significativo por lo que se concluye que la especie presenta un efecto estrogénico bajo a diferencia de la especie humana.

Proyecto 20.30.09 (CONAF)-20.31.16, Universidad de Concepción.