

XXVI | **SOCIEDAD CHILENA DE**
REUNIÓN ANUAL | **REPRODUCCION Y DESARROLLO**

LIBRO DE RESÚMENES



4 al 7
de Septiembre 2015

Hotel Enjoy
Antofagasta

SOCIEDAD
CHILENA

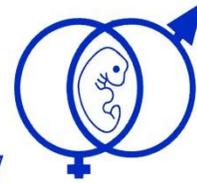
DE REPRODUCCION
Y DESARROLLO



Fundada el 30 de Abril de 1987



DE REPRODUCCION
Y DESARROLLO



Fundada el 30 de Abril de 1987

XXVI REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO 2015

***“De Norte a Sur Aportando al Conocimiento de
la Reproducción y el Desarrollo”***

**Hotel Enjoy, Antofagasta
4 al 7 de Septiembre de 2015**



DE REPRODUCCION
Y DESARROLLO



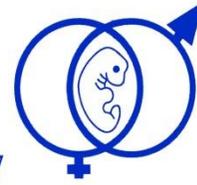
Fundada el 30 de Abril de 1987

Directorio de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo

Presidente	Patricio Morales
Vice-Presidente	Alfonso Paredes
Secretaria	Milene Kong
Tesorera	Emilce Díaz
Past-President	Ilona Concha

SOCIEDAD
CHILENA

DE REPRODUCCION
Y DESARROLLO



Fundada el 30 de Abril de 1987

Comité Organizador

Patricio Morales

Milene Kong

Emilce Díaz

Janetti Signorelli

Jorge Farías

Comité Científico

Ricardo Moreno

Alfonso Paredes

Enrique Castellón

Carmen Romero

Ilna Concha

Comité Editorial Libro de Resúmenes

Janetti Signorelli

Emilce Díaz

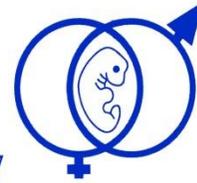
Milene Kong

Encargada Página Web

Milene Kong



DE REPRODUCCION
Y DESARROLLO



Fundada el 30 de Abril de 1987

Auspician

Universidad de Antofagasta

Compañía Minera Barrick Gold-Zaldívar

Merck Group

Patrocinan

Universidad de Tarapacá

Universidad de Valparaíso

Universidad de La Frontera

PROGRAMA DETALLADO

Viernes 4 de Septiembre

- 15:00 – 16:00 Recepción e Inscripciones
- 16:00 – 16:15 **Ceremonia Inaugural**
- 16:30 – 17:00 **Mini conferencia Premio Sociedad año 2014.**
Coordinador: Dr. Pedro Orihuela
- “El ATP Extracelular: un Nuevo Inductor de la Reacción Acrosomal en Roedores”.
Jorge Torres Fuentes. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- 17:00 – 18:00 **Presentaciones Trabajos Libres 1.**
Coordinador: Dr. Alejandro Tapia
- 17:00 – 17:15 **EXPRESIÓN ALTERADA DE 17 α -HIDROXILASA/17,20-LIASA (CYP17A1) Y P450-AROMATASA (CYP19A1) EN CÉLULAS DE LEYDIG AISLADAS DE SUJETOS CON FALLA ESPERMATOGÉNICA PRIMARIA**
Lardone MC, Argandoña F, Flórez M, Muñoz A, Ebensperger M, Palma C, Piottante A, Castro A.
Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Hospital Clínico San Borja Arriarán, Santiago, Chile.
- 17:15 – 17:30 **2-METOXIESTRADIOL (2-ME) AUMENTA LA EXPRESIÓN DE BCL2-L10 EN CELULAS ISHIKAWA PERO NO EN HELA, INDEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO (ER)**
Mena D, Díaz P, Guajardo E, Orihuela PA.
Laboratorio de Inmunología de la Reproducción, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile y Centro para el Desarrollo en Nanociencia y Nanotecnología.
- 17:30 – 17:45 **CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*): EFECTO EN LA FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA.**
Figueroa E, Valdebenito I, Merino O, Ubilla A, Risopatrón J, Farías J.G.
Departamento de Ingeniería, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile School of Aquaculture, Catholic University of Temuco, Temuco, Chile. BIOREN – Center for Biotechnology in Reproduction, La Frontera University, Temuco, Chile.
- 17:45 – 18:00 **PARÁMETROS DE FUNCIÓN ESPERMÁTICA EN SEMEN DE GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*) MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**
Cheuquemán C, Sánchez R, Risopatrón J.
Centro de Biotecnología de la Reproducción (BIOREN-CEBIOR), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

- 18:00 - 18:30 Café
- 18:30 - 19:00 **Número artístico**
Grupo Instrumental Universidad de Antofagasta.
- 19:00 - 20:00 **Conferencia Inagural.**
Coordinador: Dr. Patricio Morales
- “Female Regulation of Sperm Storage and Migration”
Dra. **Susan Suarez**, Cornell University, Ithaca, NY. EEUU.
- 20:30 **Cóctel de Bienvenida**

Sábado 5

- 9:00-10:30 **Simposio 1. Infertilidad Conyugal.**
Coordinador: Dr. Gareth Owen
- “Pérdida Recurrente Reproductiva”.
Dr. **Ricardo Pommer**, Clínica Monte Blanco. Santiago.
- “Andrología: el Varón en el Olvido Después de la Fecundación *in vitro* (ICSI)”.
Dr. **Raúl Sánchez**, Universidad de La Frontera. Temuco.
- “Unidad de Medicina Reproductiva Antofagasta; Experiencia de Instalación de un Centro de Fertilización Asistida en Regiones”.
Dr. **Gregorio Evans**, Clínica Cumbres del Norte. Antofagasta.
- 10:30 - 11:00 **Café**
- 11:00-12:30 **Presentaciones Trabajos Libres 2.**
Coordinador: Dr. Enrique Castellón
- 11:00 - 11:15 **EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE GDF-9 Y BMP-15 EN FOLÍCULOS ANTRALES DE PERRA DURANTE EL ANESTRO UTILIZANDO CITOMETRÍA DE FLUJO**
Fernández T, Palomino J, De Los Reyes M.
Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- 11:15 - 11:30 **LAS TOXINAS BACTERIANAS FORMADORAS DE POROS ALTERAN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y LA MOTILIDAD EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS**
Boquen R, Uribe P, Treulen F, Villegas JV.
Centro de Biotecnología de Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina.
- 11:30 - 11:45 **UTILIDAD DE LA MICRODISECCIÓN CELULAR CON LÁSER PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN ENDOMETRIO DE**

MUJERES FÉRTILES E INFÉRTILES CON ENDOMETRIOSIS DURANTE LA VENTANA DE IMPLANTACIÓN

Barrientos S, Ortiz M, Cortegana W, Argandoña F, Devoto L, Kohen P, Palomino WA.

Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

11:45 – 12:00

ESTIMACIÓN ESTADÍSTICA DE LA INFERTILIDAD IDIOPÁTICA EN POTROS SEGÚN SU IMPRINTING GÉNICO

Hartley R, Salas C, Paradowska-Dogan A, Romero F, Alvarenga M, Ramirez-Reveco A.

Programa Doctorado en Ciencias Mención Biología Celular y Molecular Aplicada, Universidad de la Frontera, Chile. Laboratorio Criobiología y Análisis de Funcionalidad Espermática, Instituto de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

12:00 – 12:15

MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS CANINOS PROVENIENTES DE FOLÍCULOS POLIOVOCÍTICOS

Astudillo I, Aspee K, Palomino J, De Los Reyes M.

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

12:15 – 12:30

LA OBESIDAD MATERNA EN RATAS PRODUCE UN INCREMENTO DE ESTRADIOL ENDÓGENO EN LA DESCENDENCIA LLEVANDO A ALTERACIONES DEL DESARROLLO FOLICULAR EN LA ADULTEZ.

Olguín S, Álvarez D, Reyes A, Ramírez LA, Ambrosetti V, Guerra M, Fernandois D, Sotomayor-Zárate R and **Cruz G.**

Laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas, CNPC, Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

12:30 – 13:30

Conferencia 2.

Coordinador: Dr. Marcos Cikutovic

“Contemporary Issues in Reproductive and Developmental Toxicology”.

Dra. **Wilma De Grava Kempinas**, Universidad Estatal Paulista, Botucatu, SP. Brasil.

13:30 – 15:00

Almuerzo

15:00 – 16:30

Simposio 2. Investigadores Jóvenes.

Coordinadora: Dra. Carmen Romero

“Participación del Receptor de HDL SR-BI Durante el Cierre del Tubo Neural en Ratones”.

Dra. **Dolores Busso.**

P. Universidad Católica de Chile. Santiago.

“Síndrome de Ovario Poliquístico: Buscando un “Link” entre Disfunción Endometrial y Disfunción del Adipocito”.

Dr. **Víctor García**.
Universidad de Antofagasta. Antofagasta.

“Multipotencia y Plasticidad *in vitro* de Células Madre Mesenquimales en un Modelo Fetal Bovino”.

Dr. **Oscar Peralta**.
Universidad de Chile. Santiago.

16:45 – 18:45

Sesión de Pósters I y café.
Coordinadora: Dra. Janetti Signorelli

PÓSTER 1

EFFECTO DE LA TRANSFECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS PARA SU USO EN TRANSGENESIS MEDIADA POR ESPERMATOZOIDES (SMGT)

Arias ME, Delgado A, Sánchez R y Felmer R.
Laboratorio de Reproducción, Centro de Biotecnología de La Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera.

PÓSTER 2

IMPACTO DEL METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) EN EL CONTENIDO DE COLESTEROL OVOCITARIO EN RATONES.

Quiroz A, Molina P, Cautivo K, Rigotti A, **Busso D**.
Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo, Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

PÓSTER 3

METHYL-B-CYCLODEXTRIN IMPROVES SPERM CAPACITATION STATUS ASSESSED BY FLOW CYTOMETRY ANALYSIS AND ZONA PELLUCIDA BINDING ABILITY OF FROZEN/THAWED BOVINE SPERMATOZOA

Aguila L, Arias M.E, Vargas T, Zambrano F, Felmer R.
Laboratory of Reproduction Centre of Reproductive Biotechnology (CEBIOR-BIOREN), Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

PÓSTER 4

KISSPEPTINA REGULA LA EXPRESIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ 2 Y 9 EN OVARIOS DE RATAS EN EL PERIODO DE SUBFERTILIDAD

Las Heras M, Lara H, Paredes A.
Laboratorio de Neurobioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

PÓSTER 5

EFFECTO DEL MODAFINILO (MENTIX) EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA.

Alvarado A, Aguirre P, Gripe S, Hidalgo I, Pérez B, Morales P, Díaz E.S, Signorelli J.
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Antofagasta.

PÓSTER 6

TÉCNICA DE CRIOPRESERVACIÓN IN VITRO DE SEMEN DE ZÁNGANO DE *Apis mellifera*

Cruz-Fernandes L, Díaz MC, Acuña R, Palomino J, Moreno RD.

Unidad de Endocrinología y Reproducción, Dpto. Fisiología, Pontificia Universidad de Católica de Chile.

- PÓSTER 7** **PATRÓN DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN Y SITIO ESPECÍFICO DEL PROMOTOR DEL GEN DE LEPTINA EN HIJOS E HIJAS PERIPUBERALES DE MUJERES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (SOP)**
Echiburú B, Concha F, Pérez-Bravo F, Maliqueo M, Crisosto N, Sandoval D, Vantman N, Recabarren SE y Sir-Petermann T.
Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile.
- PÓSTER 8** **EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CICLO REPRODUCTIVO EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS CANINOS**
Aspee K, Astudillo I, Palomino J, De Los Reyes M.
Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- PÓSTER 9** **INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SDC-1 POR SOBREENPRESIÓN DE ZEB1/ZEB2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA**
Farfán N, Chrzanowsky D, Orellana-Serradell O, Castellón EA, García de Herreros A, **Contreras HR**.
Laboratorio de Andrología Celular y Molecular. Programa disciplinario de Fisiología y Biofísica. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
- PÓSTER 10** **LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA MODIFICA LA CAPACIDAD DE UNIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$**
Lonis M. A, Pozo P, Morales P, Díaz E.S.
Laboratorio Biología de la Reproducción y Desarrollo, Depto. Biomédico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta.
- PÓSTER 11** **EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL DE ESPERMATOZOIDES DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).**
Figueroa E, Valdebenito I, Risopatrón J, Farías J.G.
Departamento de Ingeniería, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. School of Aquaculture, Catholic University of Temuco, Temuco, Chile. BIOREN-Center for Biotechnology in Reproduction, La Frontera University.
- PÓSTER 12** **METFORMIN REDUCES PLATELET-ENHANCED OVARIAN CANCER CELL EMT, SPHERE FORMATION AND MIGRATION**
Erices R, Cubillos S, Ramírez C, Marquez M, González P, Bravo M.L, Kato S, Cuello M.A, **Owen G.I**.
Facultad de Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- PÓSTER 13** **CAMBIOS DINAMICOS DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DURANTE LA CAPACITACION DEL ESPERMATOZOIDE DE RATA**

Maldonado-Michea JR, Poveda PM, Andrade JC, Fábrega F, Morales P y Zúñiga LM.

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Antofagasta. Instituto Antofagasta. Universidad de Antofagasta.

PÓSTER 14

EL PROTEASOMA REGULA LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS SER Y THR DURANTE LA CAPACITACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Zapata HP, Barón L, Díaz ES, Morales P.

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Departamento Biomédico. Facultad Ciencias de la Salud. Universidad de Antofagasta.

PÓSTER 15

EFFECTO DE LOS METABOLITOS DE ESTRADIOL 2-ME2 Y 2-OHE2 SOBRE LA ANGIOGÉNESIS Y SECRECIÓN DE VEGF EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA HUMANA.

Henríquez S, Cárdenas M, Retamales R, Kohen P, Godoy A, Orge F y Devoto L.

Laboratorio de Endocrinología Clínico-Molecular de la Reproducción, Instituto de Investigación Materno Infantil (IDIMI), Universidad de Chile, Santiago, Chile.

PÓSTER 16

EFFECTO DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE SOBRE EL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN EN EL OVARIO

Barón L, Zúñiga L, Morales P, Owen GI, Velásquez EV.

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile.

PÓSTER 17

UNA EXPOSICIÓN CRÓNICA A UNA MEZCLA DE DISRUPTORES ENDOCRINOS (FTALATOS Y ALQUILFENOLES) ALTERA EL CICLO REPRODUCTIVO EN RATÓN HEMBRA

Patiño-García DF y Moreno RD.

Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

PÓSTER 18

EI RECEPTOR DE PROGESTERONA DE MEMBRANA (PRGMC1) CAMBIA SU FUNCIONALIDAD DURANTE LA CAPACITACIÓN EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

Milla K, Pérez B, Pozo P, Morales P, Díaz E.S.

Laboratorio Biología de la Reproducción, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta.

PÓSTER 19

EFFECTO DE TNF- α SOBRE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA POR CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES HUMANAS EXPUESTAS A UN AMBIENTE HIPERANDROGÉNICO E HIPERINSULÍNICO

Oróstica L, Carvajal R, García V, Gabler F, Romero C, Vega M.

Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción, Universidad de Chile.

- PÓSTER 20** **SINDECAN-4 PRESENTE EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS, PARTICIPA EN LA REACCIÓN ACROSÓMICA (RA) INDUCIDA CON FIBRONECTINA (FN).**
 Barón L, Zapata HP, Mondaca N, Díaz ES, Morales P, Kong M.
 Laboratorio de Biología de la Reproducción. Departamento Biomédico. Facultad Ciencias de la Salud. Universidad de Antofagasta.
- PÓSTER 21** **ESPERMATOLOGÍA DEL RÓBALO PATAGÓNICO (*Eleginops maclovinus*) (PERCIFORMES: ELEGINOPIDAE) CRIADO EN FORMA EXPERIMENTAL.**
Valdebenito I, Ubilla A, Figueroa E, Sánchez J.C, Risopatrón J y Farías J.G.
 Escuela de Acuicultura. Universidad Católica de Temuco, Chile.
- PÓSTER 22** **NIVELES DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL RUNX2 EN CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL**
García P, Oróstica L, Vera C, Galindo M, Vega M, Romero C.
 Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva, Universidad de Chile.
- PÓSTER 23** **EXPRESIÓN DE CATEPSINAS D Y L EN RELACIÓN AL GRADO DE FLOTABILIDAD EN HUEVOS Y EMBRIONES DEL PEZ DORADO *Seriola lalandi***
Rodríguez J, Hernández E, De los Reyes M, Palomino J.
 Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- PÓSTER 24** **LOS TÓXICOS AMBIENTALES ENDOTHALL Y NONILFENOL INDUCEN LA REACCIÓN ACROSÓMICA (RA) VÍA LA PROTEÍNA CINASA A (PKA), EN ESPERMATOZOIDES DE RATÓN.**
Gallardo LM, Puga Molina LA, Buffone MG, Moreno RD.
 Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- PÓSTER 25** **PRODUCTOS DE SECRECIÓN DE CÉLULAS DE ESTROMA ENDOMETRIAL HUMANO (ESC) INHIBEN LA ANGIOGÉNESIS *IN VITRO* ESTIMULADA POR GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA (hCG) DISMINUYENDO LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES**
Valencia C, Nazir I, Molina I, Sánchez C, Solari G, Tapia-Pizarro A.
 Laboratorio Endocrinología Molecular Reproductiva, Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Universidad de Chile.
- PÓSTER 26** **INMUNODETECCIÓN DE TNF α , SU RECEPTOR 2 Y DEL MARCADOR DE MACRÓFAGOS CD68 EN ENDOMETRIOS DE MUJERES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (PCOS) EN FASE SECRETORA MEDIA.**
Plaza-Parrochia F, Carvajal R, Gabler F, Romero C, Vega M.

Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva,
Universidad de Chile.

- PÓSTER 27** **DERMATAN SULFATO INCREMENTA EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS DE RATA**
Poveda PM, Maldonado-Michea JR, Andrade JC, Fábrega F, Morales P y Zúñiga LM.
Laboratorio de Biología de la Reproducción. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Antofagasta.
- PÓSTER 28** **RESPUESTA DEL PÁNCREAS Y DE LA INSULINA FETAL A UNA EXPOSICIÓN MATERNA CON TESTOSTERONA**
Carrasco A, Recabarren M, Sandoval D, Assman D, Sir-Petermann T, Recabarren SE.
Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal, Departamento Ciencias Pecuarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.
- PÓSTER 29** **MEDICINA DE PRECISIÓN EN REPRODUCCIÓN: ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE CALIDAD ESPERMÁTICA.**
Córdova C, Palacios C, Concha V, Scarella A, Chamy V, Olivero P.
Laboratorio de Estructura y Función Celular, Universidad de Valparaíso.
- PÓSTER 30** **EXPRESIÓN DE GENES DE PLURIPOTENCIA Y MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN TEMPRANA EN BLASTOCISTOS BOVINOS PRE-TRATADOS CON SIN-1**
Loren P, Cheuquemán C, Risopatrón J, Arias ME, Felmer R, Sánchez R.
Centro de Biotecnología de la Reproducción (BIOREN-CEBIOR), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.
- PÓSTER 31** **EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A TESTOSTERONA EN EL TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO E ISLOTES PANCREÁTICOS EN OVINOS FETALES**
Sandoval D, Recabarren M, Carrasco A, Montalban A, Rojas D, Assman D, Sir-Petermann T, Recabarren SE.
Departamento de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.
- PÓSTER 32** **EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE RECEPTORES DE ANHIDRASA CARBÓNICA (AC) Y ÁCIDO RETINOICO (AR) EN BIOPSIAS TESTICULARES DE PACIENTES CON SÍNDROME DE KLINEFELTER**
Espinoza-Navarro O, Rodríguez H.
Departamento de Biología, Universidad de Tarapacá.
- PÓSTER 33** **EL ESTRÉS SIMPÁTICO APLICADO DURANTE LA GESTACIÓN EN RATAS MODIFICA EL TRANSPORTADOR PLACENTARIO DE NORADRENALINA. CAMBIOS DEPENDIENTE DE GÉNERO.**
Piquer B, Fonseca J.L, Lara H.E.

Laboratorio de Neurobioquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

PÓSTER 34

LOS GENES SOX2, KLF4 Y MYC DE LAS CÉLULAS TRONCALES TUMORALES REAGULAN LA RESISTENCIA A DROGAS Y LA METÁSTASIS EN CÁNCER PROSTÁTICO

Valenzuela R., Cifuentes F, Miyaoka F, Castillo V, Contreras HR, y Castellón EA.

Laboratorio de Andrología Celular y Molecular. Programa de Fisiología y Biofísica. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

19:00 – 20:00

Conferencia 3:

Coordinador : Dr. Héctor Contreras.

“Transporte de Glucosa y Metabolismo de Glucosa y Glucógeno en el Túbulo Seminífero”.

Dra. **Ilona Concha**, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Domingo 6

9:00 – 10:30

Simposio 3. Fisiología y Fisiopatología Ovárica.

Coordinador: Dr. Alfonso Paredes

“Función Ovárica en Distintas Etapas Reproductivas de Mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico”.

Dra. **Teresa Sir-Petermann**, Universidad de Chile. Santiago.

“Cambios en el Tono Autonómico del Ovario Regulan la Función Ovárica en Mamíferos”.

Dr. **Hernán Lara**.

Universidad de Chile. Santiago.

“El Factor de Crecimiento Nervioso está Involucrado en Desarrollo Folicular, Ovulación y Angiogénesis del Cáncer Ovárico Epitelial”.

Dra. **Carmen Romero**.

Universidad de Chile. Santiago.

10:30 - 11:00

Café.

11:15 – 12:45

Presentaciones Trabajos Libres 3.

Coordinadora: Dra. Margarita Vega

11:15 – 11:30

KISSPETINA PARTICIPA EN EL DESARROLLO DE FOLÍCULOS ANTRALES Y AUMENTA LA OVULACIÓN DURANTE EL ENVEJECIMIENTO OVÁRICO

Fernandois D., Na A, Cuevas F, Lara HE, Paredes AH.

Laboratorio de Neurobioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

- 11:30 – 11:45 **ESTUDIO DE NIVELES DE RECEPTORES DE LIPOPROTEÍNAS EN EL SACO VITELINO Y SU ASOCIACIÓN CON DEFECTOS DEL CIERRE DEL TUBO NEURAL EN UN MODELO DE HIPERGLICEMIA MATERNA EN RATONES**
Schneider A, Santander N, Salas F, Berkowitz L, **Busso D.**
Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 11:45 – 12:00 **4-METOXIESTRADIOL NO AFECTA LA EXPRESIÓN DE BCL2-L10 Y SPON-1 NI LA VIABILIDAD DE CÉLULAS ISHIKAWA**
Guajardo E, Mena D, Díaz P, Orihuela PA.
Laboratorio de Inmunología de la Reproducción, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile y Centro para el Desarrollo en Nanociencia y Nanotecnología.
- 12:00 – 12:15 **EL SISTEMA PROTEINA G- α_s ($G\alpha_s$)/ADENILIL CICLASA DE MEMBRANA (ACm)/AMPc/PKA MODULA EL INFLUJO DE CALCIO Y LA REACCIÓN ACROSÓMICA (RA) INDUCIDA POR FIBRONECTINA (Fn) EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS**
Pérez B, Signorelli J, Morales P y Díaz E.S.
Laboratorio Biología de la Reproducción y Desarrollo, Depto. Biomédico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta.
- 12:15 – 12:30 **EXPRESION ANORMAL DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN ENDOMETRIO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS DURANTE EL PERIODO DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**
Argandoña F, Barrientos S, Ortiz M, Devoto L, Kohen P, Palomino WA.
Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 12:30 – 12:45 **GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (HCG) MODULA LA SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE B ($TGF-\beta$) EN CELULAS DE ESTROMA ENDOMETRIAL HUMANO (ESC).**
Zavaleta K, Gonzalez R, Johnson M.C, Tapia-Pizarro A.
Laboratorio Endocrinología Molecular Reproductiva, Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 13:30 – 15:00 Almuerzo
- 15:00 – 16:00 **Conferencia 4.**
Coordinador: Dr. Ricardo Moreno

"Ubiquitin-Proteasome System in Spermatogenesis, Fertilization and Early Embryo Development: Killing Three Birds with One Stone".
Dr. **Peter Sutovsky,** University of Missouri, Columbia, MO. EEUU.
- 16:00 – 16:30 Café

16:45 – 18:15

Simposio 4. Reproducción Animal.

Coordinador: Dr. Jorge Farías

“Selección Genómica para Incrementar la Tasa Ovulatoria y Prolificidad de los Ovinos”.

Dr. **Néstor Sepúlveda**

Universidad de La Frontera. Temuco.

“Manejo *in vitro* de Gametos en Peces: Problemáticas y Desafíos”.

Dr. **Iván Valdebenito**

Universidad Católica de Temuco. Temuco.

“Fecundación *in vitro* en Alpacas (*Vicugna pacos*): Avances y Limitantes”.

Dr. **Wilfredo Huanca**

Universidad de San Marcos, Lima. Perú.

18:30 – 19:30

Conferencia 5

Coordinador: Dr. Patricio Morales

“Chile y el Universo”.

Dr. **Eduardo Unda-Sanzana**, Unidad de Astronomía.

Universidad de Antofagasta. Antofagasta.

21:00

Ceremonia y Cena de Clausura

Lunes 7

9:00-10:30

Reunión de socios

12:00-13:00

Homenaje al Dr. Eduardo Bustos-Obregón.

Auditorio Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Antofagasta.

**MINI CONFERENCIA
PREMIO SCHRÖD**

EL ATP EXTRACELULAR: UN NUEVO INDUCTOR DE LA REACCIÓN ACROSOMAL EN ROEDORES

(Extracellular ATP: a new acrosome reaction inductor in rodents)

Torres-Fuentes JL¹, Tomes CN², Darszon A³, Treviño CL³, Moreno RD¹.

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. ² Instituto de Histología y Embriología, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. ³ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

Previo a la interacción entre gametos y luego de la exposición con factores presentes en el medio o de forma espontánea, los espermatozoides experimentan activación de un mecanismo que provoca la fusión entre la membrana acrosomal y la membrana plasmática. Este fenómeno se conoce como la reacción del acrosoma, y lleva a la liberación de las enzimas acrosomales y la exposición de las moléculas necesarias para la interacción del ovocito con el espermatozoide. A pesar de que este fenómeno se conoce desde hace muchos años y que es un prerrequisito esencial para la fecundación, el momento y lugar de ocurrencia aún está en controversia para la comunidad científica. Trabajos recientes muestran que los espermatozoides pueden experimentar la reacción del acrosoma antes de tomar contacto con la zona pelúcida, cubierta glicoproteica del ovocito, durante el tránsito oviductal. Es en este momento en contacto con los cilios, que los espermatozoides están en un microambiente de señales derivadas del epitelio que podrían regular diferentes procesos relacionados con la fertilidad.

El ATP extracelular ha sido estudiado como una molécula de señalización importante en la regulación de diferentes procesos fisiológicos como la neurotransmisión o la regulación de epitelios ciliados, sin embargo el rol de esta molécula en la reacción acrosomal en modelos murinos no ha sido caracterizado previamente. Este trabajo caracteriza por primera vez al ATP extracelular, que está presente en epitelios oviductales, como un inductor fisiológico de la reacción acrosomal en espermatozoides de ratón y rata, caracterizando su mecanismo de acción por medio de farmacología, imágenes y descifrando la contribución de la movilización de iones del acrosoma en este fenómeno. Además caracteriza, por primera vez, a un tipo de canales no selectivos conocidos como "Pannexinas" como agentes importantes en la señalización en la reacción acrosomal. Con este conocimiento se espera contribuir al entendimiento de la fecundación en mamíferos para la generación de nuevas estrategias biotecnológicas para el control de la fertilidad en animales.

Financiamiento: Parcialmente por FONDECYT 1110778 Y 1150352

CONFERENCIAS

FEMALE REGULATION OF SPERM STORAGE AND MIGRATION

Suarez S.

Cornell University, Ithaca, NY. EEUU.

The mammalian female reproductive tract interacts with sperm in various ways in order to (1) facilitate sperm migration to the egg while impeding migration of pathogens, (2) store sperm until ovulation, and (3) select the fittest sperm for fertilization. Interactions may be physical or molecular or both. Physical interactions include the swimming responses of sperm to surfaces that line the female tract, to fluid flows in the lumen of the tract, and to fluid viscoelasticity. When sperm encounter surfaces, they tend to remain swimming along them. When sperm encounter gentle fluid flows, they tend to orient their swimming into the flows. The female tract seems to use these physical properties to guide sperm and to select vigorously motile sperm for fertilization. Molecular interactions include interactions of molecules on the surfaces of epithelia that line the female tract with molecules on sperm surfaces. For example, there is evidence that specific sperm surface molecules are required for sperm to pass through the uterotubal junction into the oviduct. After passing into the oviduct, most sperm bind to its epithelial lining. This interaction holds sperm in a storage reservoir until ovulation and serves to maintain the fertility of sperm during storage. When sperm are released from the reservoir, they detach from and re-attach to the epithelium repeatedly while ascending to the site of fertilization. These interactions of the female tract with sperm indicate that the female regulates sperm movement through the tract and that female and male reproductive tracts co-evolve to ensure successful reproduction.

CONTEMPORARY ISSUES IN REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICOLOGY

De Grava Kempinas W.

Laboratory of Reproductive and Developmental Biology and Toxicology - ReproTox
Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, Brazil
kempinas@ibb.unesp.br

Reproductive and Developmental Toxicology is one the most complex and rapid growing areas of Toxicology. Reported increases in the incidence of phenotypes such as cryptorchism, testicular cancer, hypospadias and reduced sperm quality in certain populations of men has spurred a significant research effort in toxicology. It is speculated that these events may be manifestations of changes in environmental influences that have presented over the past 50 years. Special attention has been given to chemical substances called endocrine disruptors, which have the potential to interfere with the endogenous hormones. The increased risk of diseases and reproductive disorders later in life due to developmental exposure to toxicants, before or soon after birth, will also be addressed in this talk which main aim is to approach contemporary issues in this important field of reproduction and toxicology.

TRANSPORTE DE GLUCOSA Y METABOLISMO DE GLUCOSA Y GLUCÓGENO EN EL TÚBULO SEMINÍFERO (Glucose transport and glucose and glycogen metabolism in the seminiferous tubule)

Concha I¹, Villarroel-Espíndola F¹, Maldonado R^{1,3}, Mancilla H¹, Covarrubias A¹, López C¹, Vander Stelt K¹, Cereceda K¹, Castro M¹, Angulo C² y Slebe JC.¹

¹Instituto de Bioquímica y Microbiología, ²Instituto de Ciencias Químicas, Universidad Austral de Chile. ³Biochemistry III, University of Regensburg, Germany.

La espermatogénesis es un proceso fisiológico complejo que implica la proliferación celular, la división meiótica y la diferenciación celular final de las células post-meióticas en espermatozoides. Durante este proceso las células germinales masculinas se someten también a un proceso de diferenciación metabólico, en el que las células post-meióticas (espermátidas) responden diferencialmente de las células no meióticas (e.g. espermatoцитos) en la expresión y función de transportadores de glucosa (GLUTs) y en el metabolismo de glucosa y glucógeno. En espermatoцитos la captación de glucosa se realiza a través de GLUT1, en cambio en espermátidas y espermatozoides la captación de glucosa se lleva a cabo a través de GLUT1 y GLUT3 principalmente. Glucógeno se considera como fuente principal de glucosa, sin embargo en las células germinales masculinas este polímero puede jugar otro papel, que no ha sido dilucidado totalmente. En todos estos procesos la vinculación con las células de Sertoli y la función de éstas es de gran relevancia. Las células de Sertoli expresan los transportadores GLUTs1-4 funcionales y la isoforma muscular de la enzima glucógeno sintasa (MGS) que se encuentra fosforilada e inactiva. La regulación positiva de MGS puede ser a través de una mayor disponibilidad de glucosa-6P o por la vía de señalización de Wnt/b-catenina, además de otros factores.

Las diferencias encontradas en células germinales en conjunto con las células de Sertoli podrían explicarse por la necesidad de un proceso metabólico específico para apoyar la diferenciación de células o, en algunos casos, la viabilidad celular.

FONDECYT 1110508 (IC) y 1141033 (JCS)

UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM IN SPERMATOGENESIS, FERTILIZATION AND EARLY EMBRYO DEVELOPMENT: KILLING THREE BIRDS WITH ONE STONE

Sutovsky P.

University of Missouri, Columbia, MO. EEUU.

The long term goal of my research is to improve human infertility treatment and reproduction in livestock species by optimizing semen analysis, *in vitro* fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and embryo culture to blastocyst. This goal is being accomplished by improving existing technologies for gamete collection, evaluation, and preservation, mitigation of the embryo-lethal polyspermic fertilization, and optimization of embryo culture by applying discoveries from research on gametic and embryonic ubiquitin-proteasome system (UPS).

Protein ubiquitination is a stable, reversible posttranslational modification of substrate proteins by covalent ligation of the small chaperone protein ubiquitin. Most commonly, ubiquitination targets proteins for the degradation/recycling by the 26S proteasome, a multi-subunit, ubiquitin-specific proteolytic holoenzyme. The ubiquitin-substrate conjugation and substrate recycling requires the participation of ubiquitin activating (E1/UBA1), ubiquitin conjugating (E2/UBE2), ligating (E3/UBE3) and deubiquitinating enzymes (DUBs) with well-defined substrate specificities and sensitivity to specific pharmacological inhibitors *in vitro*. While UPS discovery occurred in the mid-seventies and was recognized by a Nobel Prize in 2004, it remains unclear how UPS regulates spermatogenesis, sperm physiology, fertilization and early development.

Recent work from my laboratory reveals a new role for UPS in the regulation of the fertilization process, including sperm-egg coat/zona pellucida (ZP) interactions and the early event of sperm capacitation, responsible for the remodeling of sperm plasma membrane and acrosome, required for sperm fertilizing ability. My research established multiple new paradigms in human/animal reproduction, including the role of gametic/zygotic UPS in: 1) mitochondrial inheritance/sperm mitophagy after fertilization, 2) ubiquitin-dependent mechanism for quality control of epididymal spermatozoa and secretory proteins, 3) testicular spermatid differentiation, 4) sperm-ZP penetration (sperm proteasome as the egg coat lysine), and 5) pronuclear development after fertilization and donor cell nuclear remodeling after somatic cell nuclear transfer (SCNT). Recently, my team identified a number of acrosomal proteins that interact with the resident sperm proteasomes or are degraded by them during sperm capacitation using proteomic analysis of spermatozoa from our new transgenic boar model carrying green fluorescent proteasomes (GFPR boar). At the same time, oocytes fertilized with transgenic GFPR spermatozoa developed into embryos that showed discrete localization of green-fluorescent proteasomes in the embryonic blastomere nuclei from four-cell stage to blastocyst. These new data indicate that UPS components participate in crucial developmental events closely following fertilization such as pronuclear development, resetting of epigenetics marks on the zygotic genome and major zygotic genome activation (MZGA).

Altogether, our studies established the importance of UPS for the reproductive process and introduced the novel concept of extracellular UPS in cell biology, which has now been extended to both plant and animal reproduction, and beyond the reproductive system. Significant to both human reproductive health and food animal agriculture, this knowledge base led to the development of new methods for flow cytometric, biomarker based semen analysis and male infertility diagnostics, new additives for semen extenders, new methods for limiting polyspermy during IVF, a method for the improvement of embryo development after porcine SCNT resulting in higher development of transgenic cloned pig embryos to term, and a nanotechnology for semen purification.

CHILE Y EL UNIVERSO

Unda-Sanzana E.

Director, Unidad de Astronomía, Universidad de Antofagasta

En nuestro país se concentra alrededor del 40% de la capacidad de observación astronómica del planeta completo, mientras que dentro de los siguientes diez años esta cifra aumentará aproximadamente a 70%. Esta circunstancia hace que necesariamente la siguiente generación de descubrimientos sobre el Universo se originará en gran medida en estudios desarrollados en nuestro país, y particularmente en las regiones del norte, en las que se encuentran condiciones naturales ideales para esta actividad científica.

En esta charla revisamos las razones que llevan a los grandes consorcios astronómicos a instalar sus telescopios en un lugar que para ellos es lejano geográficamente y culturalmente, y la manera en que la comunidad astronómica chilena ha reaccionado para aprovechar las oportunidades que ofrece la presencia de los grandes observatorios dentro de nuestras fronteras. Hacemos además un recuento general de lo que sabemos sobre la estructura del Universo y de algunos de los descubrimientos más recientes en astronomía. Finalmente, revisamos la manera en que muchos de estos hallazgos, entre los que se cuentan algunos de los que dependen de la respuesta a preguntas fundamentales de la Humanidad, se vinculan a las capacidades existentes o por existir en los observatorios astronómicos instalados en Chile.

SIMPOSIOS

Simposio 1

Infertilidad Conyugal

ANDROLOGIA: EL VARON EN EL OLVIDO DESPUES DE LA FECUNDACIÓN IN VITRO (ICSI)

(Andrology: Male in obscurity after IVF (ICSI))

Sánchez R.¹

¹Centro de Biotecnología de la Reproducción (BIOREN_CEBIOR), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

La no fertilidad en la especie humana afecta en el 8 al 15% de las parejas en edad reproductiva. Las causas cuya etiología es el factor femenino están bastante bien establecidas, no así los factores asociados al varón, que contribuye con el 40 a 50% en las fallas de fertilidad. En el varón no fértil, las etiologías son muy variadas que incluyen defectos primarios testiculares en la producción de espermatozoides (quimioterapia, radiación pélvica, orquiectomía, criptorquidia, cáncer testicular, mutaciones genéticas), endocrinas (disfunción de la tiroides, suprarrenal), infecciosas, defectos en el transporte de espermatozoides y disfunción eyaculatoria. El avance de la medicina reproductiva no dio respuesta adecuada a los pacientes varones que a pesar de la múltiples terapias, la mayoría empíricas, no lograban el embarazo de sus parejas, ya que los ciclos de fecundación in vitro, donde el factor era masculino, especialmente bajo recuento espermático o falla de la motilidad, generaba no más de un 10% de ciclos de fecundación in vitro exitosos en comparación del 30% que en ese entonces se obtenía cuando el factor predominante era el femenino. Esto hacía sospechar que muchas de las causas que generaban una falla reproductiva del varón estaba asociada a una no adecuada función del espermatozoide, lo que se soluciona parcialmente desde el año 1996, donde se incorpora la inyección intracitoplasmática de gametos o ICSI, logrando equiparar el porcentaje de embarazos por ciclo a los obtenidos en Fecundación in vitro por factor femenino. Posteriormente, al ser la ICSI tan exitosa, hubo una disminución en los esfuerzos para encontrar los factores etiológicos a gran número de pacientes, aprox. un 30% que continua sin una patología responsable de la disminución del número y de la motilidad de los espermatozoides. Esta situación sería menos compleja, si no fuese por el alto costo del procedimiento (aprox. 10 mil dólares por ciclo) que excluye a un importante número de pacientes que no tiene los medios económicos para realizar esta terapia o acceder a bancos de semen, especialmente en América latina, incluido nuestro país. No obstante, algunas nuevas alternativas terapéuticas han permitido entregar alguna solución, la más reciente liderada por nuestro grupo de investigación, permite la recolección y almacenamiento de espermatozoides por vitrificación espermática, reportando los primeros nacidos vivos en el mundo por esta técnica, aunque no se determina la causa que origina el bajo recuento o pérdida de la función espermática. De ahí, que es necesario continuar la investigación sobre las causas que pueden originar esta importante falla reproductiva en el varón, es así que en forma similar a lo que ocurre en la mujer, ciertos trastornos metabólicos tales como la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, parecen ejercer un efecto inhibitorio sobre la cantidad y función de los espermatozoides. En este sentido, los cambios en el metabolismo de los hidratos de carbono pueden correlacionar negativamente con la fertilidad masculina. Pero, estos cambios no serían directamente originados por ellos, ya que la obesidad se ha asociado con bajos niveles séricos de vitamina D, especialmente en los países europeos y los Estados Unidos de América, asimismo datos de población de Brasil muestran, que incluso en un país con una alta irradiación solar, presenta preocupantes índices de hipovitaminosis D. Recientes revisiones bibliográficas sobre el efecto del déficit de vitamina D y falla reproductiva han posibilitado considerar esta alternativa en la falla reproductiva del varón.

UNIDAD DE MEDICINA REPRODUCTIVA ANTOFAGASTA; EXPERIENCIA DE INSTALACIÓN DE UN CENTRO DE FERTILIZACIÓN ASISTIDA EN REGIONES

Evans G, Balmaceda J.

Unidad de Medicina Reproductiva Antofagasta, Clínica Cumbres del Norte Antofagasta,
Unidad de Medicina Reproductiva Clínica Monteblanco, Santiago.

La fertilidad afecta un 15% de las parejas que desean concebir a un hijo, y un porcentaje de ellas requiere de tratamiento de alta complejidad para lograr ese anhelo. Por la Distribución geográfica de nuestro país existe una gran concentración de centros para este cometido en las cercanías de la ciudad de Santiago. Este inconveniente agrega un factor de stress más al tratamiento por cuanto la paciente debe trasladarse a una ciudad diferente, alejado de su familia y entorno familiar que le permitiría enfrentar este tratamiento con mayor tranquilidad. Esto asociado a los costos que esta demanda.

Expondremos los éxitos y fracasos, aciertos y dificultades de la instalación del primer centro de fertilización asistida en el norte de nuestro país, desde un punto más bien humano.

Simposio 2

Investigadores jóvenes

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE HDL SR-BI DURANTE EL CIERRE DEL TUBO NEURAL EN RATONES

(Involvement of the HDL receptor SR-BI during mouse neural tube closure)

Santander N, Rigotti A, **Busso D.**

Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo, Escuela de Medicina. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Las lipoproteínas son estructuras esféricas especializadas que permiten el transporte en el torrente sanguíneo de moléculas hidrofóbicas tales como colesterol, triglicéridos y vitaminas liposolubles. Durante la gestación, las membranas extraembrionarias y la placenta expresan receptores para lipoproteínas. Tanto alteraciones en el metabolismo materno de lipoproteínas como defectos en el transporte materno-fetal de lípidos mediado por lipoproteínas afectan el desarrollo embrionario. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) median el transporte de colesterol y vitamina E entre tejidos. Su principal receptor es el *scavenger* clase B tipo I (SR-BI), expresado principalmente en hígado y tejidos esteroideogénicos. Hace ya varios años, durante la generación del ratón deficiente en SR-BI (SR-BI KO) por cruce de ratones SR-BI +/-, se observó que se obtenían la mitad de los SR-BI -/- que los esperados por la distribución mendeliana, sugiriendo un fenotipo letal embrionario en los SR-BI KO. Recientemente, reportamos que SR-BI se expresa en el saco vitelino durante el desarrollo temprano y que un 50% de los embriones SR-BI KO presentan cierre del tubo neural defectuoso y posterior desarrollo anormal del cerebro, incompatibles con la vida postnatal. Tal como en humano y en algunos modelos murinos, esta condición conocida como exencefalia (o anencefalia) es más prevalente en las hembras SR-BI KO, y es prevenible parcialmente por la suplementación con folato. Durante los últimos años nos hemos abocado a estudiar los mecanismos implicados en el defecto en el cierre del tubo neural en embriones SR-BI KO así como posibles intervenciones preventivas, con el objetivo de encontrar potenciales nuevos tratamientos para la condición homóloga en seres humanos.

FONDECYT 1141236 (D.B.) Beca Doctoral CONICYT 21130444 (N.S.)

SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO: BUSCANDO UN "LINK" ENTRE DISFUNCIÓN ENDOMETRIAL Y DISFUNCIÓN DEL ADIPOCITO

García V.

Ginecología – Medicina Reproductiva
Centro de Estudios en Medicina Reproductiva (CEMER)
Universidad de Antofagasta

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es una compleja condición que afecta a mujeres en edad reproductiva relacionada con infertilidad y aborto recurrente. Presenta, además, una asociación con obesidad e insulino-resistencia cercana al 70%. Varios reportes señalan que el endometrio de estas pacientes presenta alteraciones a nivel de la homeostasis energética, procesos de apoptóticos/proliferación y alteraciones a nivel de ventana de implantación. Del mismo modo, la obesidad en pacientes con SOP evaluada más allá del IMC, presenta alteraciones de distribución corporal, alteración en la producción de citoquinas inflamatorias y alterada producción de adipokinas. Nuestro laboratorio ha centrado sus estudios en evaluar los nexos que pudieran existir entre las alteraciones del tejido graso y las posibles alteraciones a nivel endometrial en pacientes con SOP. Adiponectina, una importante adipokina insulino-sensibilizante, y su vía de señalización, ha sido evaluada a nivel endometrial, encontrándose en pacientes con SOP, una alterada expresión de esta adipokina, sus receptores (AdipoR1 y AdipoR2) y APPL1. Del mismo modo, se han iniciado estudios básico clínicos en mujeres en edad reproductiva con SOP para evaluar el estatus de tejido graso medido por parámetros clásicos y Bio-impedanciometría y su relación con la vía de señalización de AMH, adiponectina e hiperandrogenemia durante la ventana de implatación a nivel endometrial. Del mismo modo, se quiere evaluar si la intervención del cambio de estilo de vida (determinado por una intervención nutricional y de ejercicio de al menos 3 meses) modifica los parámetros de AMH, adiponectina y androgenemia, tanto a nivel sistémico, como a nivel endometrial; mejorando de esta forma, la receptividad endometrial en beneficio de la fertilidad de estas pacientes.

MULTIPOTENCIA Y PLASTICIDAD *IN VITRO* DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN UN MODELO FETAL BOVINO

(Multipotency and plasticity of mesenchymal stem cells (MSC) in a bovine fetal model)

Peralta OA^{1,2}, Cortes Y¹, Araya D¹, Becerra V¹, Diaz P¹, Cuevas F¹ y Okamura L³

¹Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ²Department of Biomedical Sciences and Pathobiology, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA. ³Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, São Paulo, Brasil

Las células madre mesenquimales (MSC) son reconocidas como una potencial herramienta para medicina regenerativa y terapia celular debido a su alta capacidad proliferativa y amplio potencial de diferenciación. Mediante citometría de flujo hemos determinado que la población de MSC adherente al plástico en medula ósea fetal bovina, es mayoritariamente positiva a los marcadores de MSC CD29 (76,3%) y CD73 (96,8%), de pluripotencia OCT4 (94,6%) y NANOG (88,4%) y negativa a marcadores hematopoyéticos CD34 (93,4%) y CD45 (95,6%). Utilizando un modelo *in vitro* de diferenciación, hemos demostrado que estas células adquieren una morfología y un perfil de expresión de marcadores mesodérmicos que caracterizan a los linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico. Esta capacidad de diferenciación está asociada a cambios en el patrón de expresión de enzimas de regulación epigenética DNMT1, DNMT2, DNMT3b, EZH2 y KDM6a. Sin embargo, la plasticidad de MSC no está limitada al linaje mesodérmico ya que bajo condiciones de cultivo específicas, éstas pueden adquirir un perfil de expresión de marcadores y de producción de metabolitos funcionales de linajes hepatogénico y neurogénico. Dado el potencial uso para terapia celular, también hemos evaluado la capacidad de manipulación genética de las MSC. A pesar de establecer una línea de MSC positivas para GFP, se ha determinado una baja eficiencia de transfección de un vector no viral utilizando Lipofectamina. El modelo *in vitro* de diferenciación de MSC fetales bovinas utilizado ha permitido evaluar algunas propiedades biológicas de las MSC derivadas de medula ósea y ampliar el conocimiento para su potencial uso terapéutico.

Financiamiento: FONDECYT 11100205; ENLACE-VID 2014-69975 (Universidad de Chile); (LO) Becario Capes PDSE 7037/2014-07 (Brasil)

Simposio 3

Fisiología y fisiopatología ovárica

FUNCIÓN OVÁRICA EN DISTINTAS ETAPAS REPRODUCTIVAS DE MUJERES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

Sir-Petermann T.

Profesor Titular de Medicina. Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una disfunción endocrino-metabólica heterogénea de alta prevalencia (5-10%). Su etiología es incierta y se encuentra en estrecha asociación a la resistencia insulínica, la que juega un papel preponderante en su fisiopatología y en las consecuencias metabólicas a largo plazo. La mayor parte de la información disponible, incluyendo nuestros estudios, se ha centrado en la mujer joven y en la ontogenia de este síndrome. No obstante, el periodo perimenopáusico ha sido menos caracterizado. En el contexto de un proyecto Fondecyt hemos estudiado mujeres portadoras de SOP y controles sanas cuidadosamente seleccionadas en distintas etapas de la vida reproductiva, con el fin de establecer la dinámica de los cambios en estas mujeres. Se ha planteado que la persistencia de una mayor secreción de andrógenos en etapas tardías de la vida de estas mujeres preservaría la masa folicular, aumentaría la grasa abdominal y favorecería una exacerbación de las alteraciones metabólicas que se observan comúnmente en estas mujeres. No obstante, al término del estudio hemos podido establecer que la condición SOP podría tener algunos efectos favorables para la mujer, como por ejemplo, el hecho de que a medida de que la mujer progresa en edad, su capacidad reproductiva aumenta y la morbilidad reproductiva disminuye. De especial interés es la etapa reproductiva tardía (35-40 años), en la cual la mujer SOP claramente presenta un perfil hormonal y una reserva ovárica más favorable para la reproducción que la mujer joven con SOP e incluso que la mujer normal. Esto se debe a que las mujeres con SOP tienen una reserva ovárica mayor y al disminuir la secreción de los andrógenos por el ovario se produce un reajuste del control gonadotrópico, con lo cual reanudan su ciclicidad ovárica, ovulación y aumenta la tasa de embarazo. Respecto al componente metabólico del síndrome, se esperaría una agravación de las alteraciones metabólicas comúnmente observadas en estas mujeres con la edad. En la mujer normal durante la transición a la menopausia se produce una disminución de los estrógenos lo que condiciona una redistribución de la grasa corporal hacia el abdomen, adquiriendo un patrón masculino y las consecuencias metabólicas descritas. Este deterioro progresivo de sus parámetros antropométricos y metabólicos, las hace comparables al grupo SOP. Por otro lado, la mujer con SOP mantiene una reserva ovárica alta hasta edades tardías, con una secreción estrogénica mayor, lo que evita la exacerbación de las alteraciones metabólicas observadas en etapas más tempranas. Esto viene a resolver una inquietud que ha surgido en la comunidad científica de por qué la mujer con SOP no presenta más eventos cardiovasculares que la mujer aparentemente sana. Basado en estos conceptos, habría que preguntarse si ¿Es todo tan malo en el SOP?. A lo cual podemos responder que probablemente podría tratarse de un tipo de mujer evolutivamente distinta, que mantiene una fertilidad hasta etapas más tardías, constituyendo una forma de selección positiva para la fertilidad.

Proyecto FONDECYT 1110864

CAMBIOS EN EL TONO AUTONÓMICO DEL OVARIO REGULAN LA FUNCION OVÁRICA EN MAMIFEROS.

(Changes in the autonomic tone regulates mammalian ovarian function).

Lara HE¹, Mayerhofer A², Urra J^{1,3}, Paredes A¹.

¹Laboratorio de Neurobioquímica, Centre for Neurobiochemical Studies in Endocrine Diseases. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 8380492 Independencia, Santiago, Chile. ² BMC, Cell Biology, Anatomy III, Ludwig-Maximilian-University (LMU), Munich, Germany, ³ Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad San Sebastián.

El estrés es parte integral de la vida moderna, afectando principalmente la función reproductiva. Nuestro laboratorio y otros del extranjero han presentado evidencias que el estrés aumenta el tono noradrenérgico, el cual está causalmente relacionado con un aumento en el número de quistes ováricos y en el desarrollo del síndrome de ovario poliquístico. El organismo, sin embargo usa el sistema autonómico para regular las funciones autonómicas del organismo. Esta no es una excepción en el caso del ovario. Hemos encontrado que el ovario de mamíferos incluyendo el humano, presenta un sistema colinérgico completamente asociado a los folículos en desarrollo y maduros del ovario. Las células granulosas del ovario presentan las enzimas de biosíntesis de Acetilcolina (ACh), los transportadores para el neurotransmisor, la Acetilcolinoesterasa (AChase), enzima que degrada el neurotransmisor, y receptores colinérgicos del subtipo M1, sugiriendo la existencia de un sistema colinérgico intrínseco que regula la función ovárica. En relación a ello, nuestros resultados más recientes señalan que un aumento farmacológico intraovárico de ACh por la administración intraovárica in vivo de Huperzina (inhibidor de la AChase) aumentan el desarrollo folicular a diferencia de la activación del sistema simpático que frena la ovulación e induce la formación de quistes ováricos. En resumen se sugiere que el ovario – al igual que todos los órganos regulados por el sistema autonómico – presenta un control neurogénico dual de la función endocrina en la cual existe un sistema colinérgico intrínseco y un sistema noradrenérgico extrínseco asociados al desarrollo folicular. Estos nuevos hallazgos refuerzan el concepto de control neuroendocrino de los órganos de la reproducción.

Financiamiento: Conicyt- PIA-DFG10(HL); Fondecyt 1130049(HL).

EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO ESTÁ INVOLUCRADO EN DESARROLLO FOLICULAR, OVULACIÓN Y ANGIOGÉNESIS DEL OVARIO NORMAL Y EN PROLIFERACIÓN Y ANGIOGÉNESIS DEL CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL.

(Nerve growth factor is involved in follicular development, ovulation and angiogenesis in normal ovary and in proliferation and angiogenesis of epithelial ovarian cancer).

Romero C.

Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción, Hospital Clínico Universidad de Chile.

Advanced Center for Chronic Diseases (ACCDIS)

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una neurotrofina importante en diversos procesos en el sistema nervioso central y periférico. Adicionalmente, hace varias décadas, su expresión se encontró en diversos tejidos incluyendo al ovario humano y de roedores, al igual que sus receptores de alta afinidad TRKA y de baja afinidad P75. En modelo de ratones transgénicos observamos que NGF y TRKA están involucrados en el crecimiento folicular y la adquisición de receptores a FSH. A su vez, en modelos de ovarios de rata encontramos que NGF y su receptor TRKA están involucrados en la expresión de COX-2, adquisición de receptores a FSH y en la ovulación. Por otro lado, en ovario de monas se demostró que el factor de endotelio vascular (VEGF) es fundamental en la angiogénesis ovárica, proceso finamente controlado, crucial para el desarrollo folicular y ovulación. Además, nuestro grupo encontró que NGF y TRKA se expresan en las células de granulosa del ovario humano y que la activación de TRKA por NGF aumenta la expresión de VEGF, implicando a NGF en la angiogénesis ovárica. Junto a estos hallazgos, hemos encontrado una sobre-expresión de NGF, TRKA y VEGF en cáncer ovárico epitelial (COE). En efecto, NGF aumenta la proliferación celular y la activación de TRKA, aumentando la expresión de VEGF en explantes de COE, en líneas celulares de COE, así como también en células endoteliales. El conjunto de estos antecedentes señalan claramente que NGF es un factor angiogénico directo e indirecto en COE.

Proyectos Fondecyt N° 1030661, 1071036, 1110732 and Fondecyt-Fondap 15130011

Simposio 4

Reproducción animal

SELECCIÓN GENÓMICA PARA INCREMENTAR LA TASA OVULATORIA Y PROLIFICIDAD DE LOS OVINOS

(Increased ovulation rate and prolificacy in sheep trough genomic selection)

Sepúlveda N, Paz E, Bravo S.

Laboratorio de Producción Animal, Centro de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR), Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera.

El uso de la información genómica en forma de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) ha sido propuesta como un aporte para mejorar la selección en los programas de mejoramiento genético en animales domésticos. Actualmente, ha sido posible identificar los genes BMPR1B, BMP15 y GDF9 asociados a la prolificidad en diferentes razas ovinas. El gen BMPR1B (Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B), se ubica en el cromosoma 6, ha sido asociado con el genotipo hiperprolífico en ovejas, conocido como *FecB* o gen Booroola. En el gen BMP15 se conocen los sitios polimórficos (*FecX^L*, *FecX^H*, *FecX^B*, *FecX^G*, *FecX^L*, *FecX^R*) que causan incrementos en la prolificidad. El gen GDF9 se encuentra en el cromosoma 5, identificándose en ovejas ocho SNP, denominados G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 y G8. El objetivo del presente trabajo fue identificar mediante PCR-RFLP y secuenciación directa los principales polimorfismos ubicado en los genes BMPR1B, BMP15 y GDF9 en diferentes razas existentes en Chile. Los resultados obtenidos muestran una gran diversidad en la presentación de estos polimorfismos entre las diferentes razas estudiadas, siendo posible establecer la presencia de SNPs solo en el gen GDF9 y su asociación con la tasa de ovulación y prolificidad en animales que presentaron los polimorfismos G1, G5 y G6 en el mismo gen. Esta información puede ser muy útil para comprender mejor el control genético de la tasa de ovulación en ovinos y también para su aplicación en programas de selección animal para mejorar el potencial reproductivo en los ovinos.

FONDECYT 1120474; DIUFRO DI12-0101; EP: Becario Doctorado CONICYT

MANEJO *IN VITRO* DE GAMETOS EN PECES: PROBLEMÁTICAS Y DESAFÍOS.

(*In vitro* management of fish gametes: problematic and challenges)

Valdebenito I.

Escuela de Acuicultura. Universidad Católica de Temuco, Chile

ivisler@uct.cl

Chile es un país de más de 4.000km de costa cuyo desarrollo se ha vinculado fuertemente a los recursos marinos. Sin embargo, su preocupación y conocimiento de la fauna íctica es muy escaso.

Los peces, presentan oocitos telolecíticos, con fecundación y desarrollo embrionario externos. Condiciones que facilitaron la realización de los primeros procesos de fecundación *in vitro* según los primeros manuales de producción de peces publicados en China el año 465 a.C.

El espermatozoide carece de acrosoma y sólo posee algunas mitocondrias. Mientras se encuentra en el fluido seminal, permanece inmóvil hasta que toma contacto con el medio acuoso. En peces de agua dulce la actividad flagelar se activa con el medio hiposmótico. En peces marinos, ocurrirá con el medio hiperosmótico. En salmónidos, en el fluido seminal es inmovilizado por altos niveles de potasio. En contacto con el agua, los iones de potasio son reemplazados por calcio, activando la motilidad. Debido al bajo número de mitocondrias, regularmente el tiempo de actividad flagelar se prolonga sólo por algunos minutos. Esto, facilita su manejo *in vitro* existiendo numerosas opciones de almacenamiento (en frío a 4°C) utilizando numerosos medios artificiales, o bien, criopreservarlo a -196°C.

Los oocitos, son de gran tamaño debido a la abundancia de vitelo con un micrópilo por donde debe ingresar el espermatozoide fecundante. Hoy, el manejo *in vitro* factible de realizar en oocitos es bastante limitado. Se conocen medios de almacenamiento para salmónidos (Cortland, TAM) sólo para algunos días y su criopreservación se ha logrado sólo en bacalao experimentalmente.

FECUNDACIÓN IN VITRO EN ALPACAS (*Vicugna pacos*): AVANCES Y LIMITANTES

Huanca W.

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Las Biotecnologías Reproductivas en camélidos domésticos, como la Inseminación Artificial, Transferencia de embriones y Fecundación *In vitro*, han logrado importantes avances en los últimos años pero sin alcanzar el desarrollo obtenido en otras especies. En Fecundación *In vitro*, se han reportado avances en el desarrollo de esta tecnología, como la técnica de colección de ovocitos, con una mejor tasa de recuperación de ovocitos mediante disección respecto a aspiración folicular; factibilidad de recuperación de ovocitos de animales vivos mediante la técnica de OPU; tiempo de maduración requerido de 38 a 42 horas de cultivo para obtener hasta 75 % de maduración nuclear, con el estudio de algunos factores relacionados con la maduración de los ovocitos, como la adición de hormonas o intervalo de tiempos hasta la colección de ovocitos; sin embargo, se requiere mejorar las tasas de maduración y que pueda ser el principal factor para la baja tasa de división, que no supera el 45 % y una consiguiente tasa de blastocitos a los 7 u 8 días de cultivo, menor al 20 %. Igualmente, el uso de espermatozoides epididimarios para la Fecundación es un factor limitante para la mejora genética, por no disponer de técnicas que permitan una eficiente congelación de semen. Actualmente, nuestro laboratorio viene realizando estudios sobre la composición bioquímica del contenido folicular, oviducto y la incorporación de células de oviducto en el medio de maduración con el propósito de mejorar las tasas de maduración y desarrollo embrionario temprano.

Agradecimiento: Proyecto 405 – PNICP – PIAP – FINCyT - UNMSM

TRABAJOS LIBRES 1

EXPRESIÓN ALTERADA DE 17 α -HIDROXILASA/17,20-LIASA (CYP17A1) Y P450-AROMATASA (CYP19A1) EN CÉLULAS DE LEYDIG AISLADAS DE SUJETOS CON FALLA ESPERMATOGÉNICA PRIMARIA

(Abnormal expression of 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1) and P450-Aromatase (CYP19A1) in microdissected Leydig cells of subjects with primary spermatogenic failure)

Lardone MC¹, Argandoña F¹, Flórez M¹, Muñoz A¹, Ebensperger M¹, Palma C², Piottante A³, Castro A¹.

¹Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Hospital Clínico San Borja Arriarán, Santiago, Chile. ²Departamentos de Urología, Clínica las Condes y Hospital Clínico José Joaquín Aguirre, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ³Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.

El Síndrome de solo células de Sertoli (SSS) se ha asociado a una disfunción compensada de la célula de Leydig (CL), caracterizada por disminución de la razón testosterona a LH e hiperperplasia de CL (HCL). La expresión de CYP17A1 y CYP19A1 en las CL es clave para la síntesis de testosterona y estradiol, respectivamente, y su transcripción es activada por el Factor Esteroidogénico 1 (SF-1). Investigamos si las CL de sujetos con SSS con T/LH<2 y/o HCL tienen expresión génica y/o proteica alterada de CYP17A1, CYP19A1 y/o SF-1, correspondiente al balance intratesticular de E2/T. Se obtuvo tejido testicular de 16 casos (SSS) y 10 controles con espermatogénesis conservada para el aislamiento de CL por Microdissección Laser (Arcturus-XT). La expresión transcripcional se cuantificó por SYBR Green-qPCR. La expresión proteica de CYP17A1 se cuantificó por inmunofluorescencia en secciones de tejido testicular (software *Image ProPlus*, parámetro *mean-IOD*). Estradiol (E₂) y testosterona (T) se midieron por RIA en homogeneizados testiculares. Los resultados muestran sobre-expresión de *SF-1*, *CYP19A1* y *CYP17A1* (Rq>2) en 6/8, 5/8 y 9/13 casos respecto al *pool* de controles y se correlacionó inversamente con la razón T/LH (*r Spearman*=-0,614, *r*=-0,611 y *r*=-0,653 respectivamente). La razón E₂/T intratesticular se correlacionó con la expresión transcripcional de *CYP17A1* y *CYP19A1* (*r*=0,683 y *r*=0,899, *p*<0,05). La intensidad inmunofluorescente para CYP17A1 fue menor en los casos con T/LH<2 respecto a los controles (*p*=0,033, *Mann-Whitney*). En conclusión, sujetos con SSS tienen CL disfuncionales debido a una sobreexpresión de Aromatasa y regulación post-transcripcional negativa de la expresión de *CYP17A1*.

FONDECYT-1120176 (AC).

2-METOXIESTRADIOL (2-ME) AUMENTA LA EXPRESIÓN DE BCL2-L10 EN CELULAS ISHIKAWA PERO NO EN HELA, INDEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO (ER)

(2-Methoxyestradiol (2-ME) increases the expression of BCL2-L10 in Ishikawa cells but not in HeLa, independently of estrogen receptor (ER))

Mena D, Díaz P, Guajardo E, Orihuela PA.

Laboratorio de Inmunología de la Reproducción, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile y Centro para el Desarrollo en Nanociencia y Nanotecnología

2-ME es un metabolito formado mediante una hidroxilación y metilación del 17 β -estradiol, el cual posee propiedades anticancerígenas debido a su actividad antiangiogénica, apoptótica y antiproliferativa. Sin embargo, el mecanismo por el cual 2-ME ejerce su acción anticancerígena es poco conocido. En éste trabajo determinamos el efecto del 2-ME sobre la expresión de los genes de los receptores de estrógenos (ER α y ER β) y del marcador pro-apoptótico Bcl2-L10 en células HeLa e Ishikawa. Células Ishikawa y Hela fueron tratadas con 2ME 5 μ M solo o en presencia del antagonista del ER, ICI 182780 (ICI) por 24 horas y se evaluó la expresión de *bcl2-L10*, *ER α* y *ER β* mediante RT-PCR. En células HeLa, no se observaron variaciones en la expresión genica mediada por 2-ME. Sin embargo, en células Ishikawa 2-ME 5 μ M aumentó la expresión de *bcl2-L10*, efecto que no es bloqueado por ICI 10 μ M (V:0,67 \pm 0,03 U.A; 2-ME 5 μ M:1,33 \pm 0,003 U.A; 2-ME 5 μ M + ICI 10 μ M 1,35 \pm 0,008 U.A; ICI 10 μ M:0,68 \pm 0,04 U.A). Adicionalmente, la expresión de *Era* y *Er β* no se vio afectada por el tratamiento (ER α = V:1,05 \pm 0,03 U.A; 2-ME 5 μ M:1,12 \pm 0,07 U.A; 2-ME 5 μ M + ICI 10 μ M :1,11 \pm 0,1 U.A; ICI 10 μ M:1,1 \pm 0,01 U.A. ER β = V:1,09 \pm 0,05 U.A; 2-ME 5 μ M:1,15 \pm 0,14 U.A; 2-ME 5 μ M + ICI 10 μ M:1,06 \pm 0,14 U.A; ICI 10 μ M:1,01 \pm 0,08 U.A). Estos resultados muestran que 2-ME aumenta la expresión de *bcl2-L10* independiente de ER solo en células Ishikawa y sugieren un efecto célula-específico del 2ME sobre la expresión de genes pro-apoptóticos. DICYT021543OD y

Proyecto Basal FB0807.

CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*): EFECTO EN LA FISIOLOGÍA ESPERMÁTICA

(Cryopreservation of Atlantic salmon sperm (*Salmo salar*): Effects on sperm physiology)

Figueroa E^{1,2,3}, Valdebenito I², Merino O³, Ubilla A², Risopatrón J³, Farias J.G^{1,3}

¹Departamento de Ingeniería, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ²School of Aquaculture, Catholic University of Temuco, Temuco, Chile. ³BIOREN – Center for Biotechnology in Reproduction, La Frontera University, Temuco, Chile.

La criopreservación genera cambios en la fisiología espermática en peces. Afectando la integridad de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial y integridad del ADN, alterando la viabilidad, motilidad, capacidad fecundante y calidad de la descendencia. Sin embargo, pocos estudios han evaluado estos parámetros en espermatozoides de salmón del Atlántico. El objetivo fue determinar el efecto de la congelación en la función espermática de *Salmo salar*. El semen fue congelado en Cortland®+ 1,3MDMSO+ 0,3Mglucosa+ 2%BSA en relación 1:3(semen/crioprotector) tratamiento (T) y semen fresco control (C). Pajuelas (0,5mL) fueron congeladas a 3cm del N2L. La descongelación se realizó en baño termoregulado (35°C). Se evaluó post-descongelación por citometría de flujo: tasa de espermatozoides con ADN fragmentado (TUNEL), integridad de membrana plasmática (SYBR-14/PI), potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ Mit:JC-1) y por microscopia óptica la motilidad (*Exposure, Scope-CASA*). La fecundación semen control y tratamiento se realizó a densidad de 15x10⁶espermatozoides/ovocito. La fecundación se evaluó después de 16h de incubación (10°C), observando los primeros clivajes. En el semen criopreservado (T) la fragmentación del ADN fue 4,8±2,5%, integridad de membrana plasmática de 75±6,3%; potencial de membrana mitocondrial de 51±3,6%; motilidad de 58±5,3% (VCL:61±17,4µms⁻¹; VAP:50±17,7µms⁻¹; VSL:59±18,3µms⁻¹) y fecundación de 81,6±1,9%, presentando diferencias significativas con controles (p<0,05). Se correlacionó el potencial de membrana mitocondrial con motilidad, tasa de fecundación, VCL y VSL (r=0,75; r=0,59; r=0,77 y r=0,79, respectivamente. p<0,05), además la tasa de fecundación se correlacionó con las velocidades VCL y VSL (r=0,59 y r=0,55). Los resultados sugieren que la criopreservación induce alteraciones en la función espermática en salmón del Atlántico.

FONDECYT 1151315 (JG.F), FONDEF D10I1064 (I.V), Becario Doctorado CONICYT (E.F)

PARÁMETROS DE FUNCIÓN ESPERMÁTICA EN SEMEN DE GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*) MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

(Sperm function parameters in semen of domestic cat (*Felis catus*) by flow cytometry)

Cheuquemán C¹, Sánchez R^{1, 2}, Risopatrón J^{1, 3}

¹ Centro de Biotecnología de la Reproducción (BIOREN-CEBIOR), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ² Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ³ Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

El análisis objetivo de los parámetros de funcionalidad espermática es de gran importancia para predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen, diagnosticar problemas de infertilidad en machos o evaluar la eficiencia de las técnicas de criopreservación del semen. Se analizaron los principales parámetros de función espermática en semen fresco de gato mediante citometría de flujo. Las muestras de semen fueron colectadas mediante electro-eyaculación, bajo anestesia profunda, una vez por semana. Inmediatamente fueron analizadas a través de un espermiograma de rutina y posteriormente se aplicaron las distintas tinciones fluorescentes para evaluar viabilidad espermática (SYBR-14/PI), integridad del acrosoma (PNA-FITC/PI), potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (123ROD/PI) y especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular (DHE/SYTOX Green) por citometría de flujo (BD FACs Canto II). Los resultados de los espermiogramas fueron: $57,67 \pm 6,7\%$ de movilidad total; $64,83 \pm 5,5\%$ de viabilidad (eosina); $95,50 \pm 21,6 \mu\text{l}$ de volumen eyaculado; $24,10 \pm 5,5 \times 10^6/\text{ml}$ de concentración espermática y $2,53 \pm 1 \times 10^6$ de espermatozoides totales. Las muestras de espermatozoides analizadas por citometría de flujo presentaron los siguientes parámetros funcionales: $63,3 \pm 8,2 \%$ de viabilidad e integridad de membrana plasmática, $64,1 \pm 3,9 \%$ de vivos con acrosoma intacto, $67,1 \pm 7,9\%$ de vivos con alto $\Delta\Psi_m$ y $6,65 \pm 3 \%$ de ROS intracelular. Se observó una correlación positiva entre viabilidad e integridad de acrosoma ($R= 0,88$), correlación positiva entre viabilidad y alto $\Delta\Psi_m$ ($R=0,68$) y una correlación negativa entre viabilidad y producción de ROS ($R=-0,85$). La evaluación de los parámetros espermáticos mediante citometría de flujo nos entrega información fisiológica estandarizada sobre la calidad del semen en felino doméstico. Estos resultados permitirán optimizar los protocolos de criopreservación para preservar la fertilidad en esta especie y establecer bases científicas para la aplicación de nuevas biotecnologías reproductivas en felinos domésticos y salvajes.

FONDECYT DE POST-DOCTORADO N°3150320 (C. Ch.).

TRABAJOS LIBRES 2

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE GDF-9 Y BMP-15 EN FOLÍCULOS ANTRALES DE PERRA DURANTE EL ANESTRO UTILIZANDO CITOMETRÍA DE FLUJO

(Evaluation of GDF-9 and BMP-15 in anestrus bitch antral follicles using Flow Cytometry).

Fernández T, Palomino J, De Los Reyes M.

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

El factor de crecimiento diferencial 9 (GDF-9) y la proteína Morfogenética ósea 15 (BMP-15) se han señalado como reguladores del crecimiento y maduración del ovocito en diversos mamíferos. Ambas proteínas también han sido descritas en ovocitos de perras durante la maduración in vitro. Considerando que la mayoría de los ovocitos para cultivo provienen de hembras en anestro sin saber su estado folicular, el objetivo de este estudio fue evaluar estas proteínas en folículos antrales en distintos desarrollos mediante citometría de flujo utilizando ovarios de perras en anestro. Se obtuvieron células de la granulosa y del cúmulo a través de aspiración y raspado de folículos antrales chicos (~150–390µm) y medianos (400-590µm) mediante agujas finas, las células se fijaron e incubaron con anticuerpo anti GDF-9 humano y anti BMP-15 de ratón (1:100) y anticuerpos secundario conjugado con FITC y PerCP (1:500), respectivamente. Al análisis por citometría se hizo un gate discriminatorio por tamaño y complejidad en el Dot plot inicial y adicionalmente se discriminó con marcadores de CD45 para leucocitos y yoduro de propidio (IP) para eritrocitos y debris en los histogramas correspondientes. Los resultados se evaluaron por regresión logística. De 148 folículos se vio que GDF-9 disminuyó ($p < 0,05$) desde folículos antrales pequeños a medianos y en cambio BMP-15 no varió significativamente. Estas proteínas por tanto se expresan en las células foliculares de caninos y al igual que en otras especies, GDF-9 podría tener un rol más activo al comienzo del desarrollo antral en comparación a folículos más grandes.

Financiamiento Proyecto FODECYT 1140658

LAS TOXINAS BACTERIANAS FORMADORAS DE POROS ALTERAN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y LA MOTILIDAD EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

(Bacterial pore-forming toxin alter mitochondrial membrane potential and motility on human spermatozoa)

Boguen R¹, Uribe P¹, Treulen F¹, Villegas JV^{1,2}.

¹Centro de Biotecnología de Reproducción (CEBIOR-BIOREN), ²Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina.

Se ha descrito que las toxinas bacterianas son un importante mecanismo de daño en células somáticas. Un grupo de toxinas, denominadas toxinas formadoras de poros (TFPs) se caracterizan por dañar la membrana plasmática y alterar la señalización intracelular. Se ha demostrado que diferentes bacterias alteran la función espermática, sin embargo, no se ha estudiado la acción patógena de las TFPs en espermatozoides humanos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las TFPs en espermatozoides humanos. Para ello, espermatozoides humanos seleccionados fueron incubados por 2 horas a 37 °C con las TFPs hemolisina alfa (HlyA; *Escherichia coli* uropatógena) y toxina alfa (TA; *Staphylococcus aureus*). HlyA fue obtenida precipitando el sobrenadante del cultivo bacteriano con polietilenglicol y la TA fue adquirida comercialmente. Los espermatozoides fueron incubados con distintas diluciones del precipitado de HlyA y con distintas concentraciones de TA. Luego de la incubación se evaluó vitalidad por exclusión de yoduro de propidio y potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) con la tinción JC-1, ambas por citometría de flujo. La motilidad espermática fue evaluada por CASA. Ninguna de las dos TFPs alteró la vitalidad espermática. HlyA, a la concentración mayor estudiada, disminuyó el $\Delta\Psi_m$ y la motilidad espermática. Por su parte, TA disminuyó el $\Delta\Psi_m$ con todas las concentraciones utilizadas, mientras que la motilidad se alteró con la concentración mayor. Estos resultados demuestran que las TFPs tienen un efecto patógeno en espermatozoides humanos y podrían contribuir en la fisiopatología de las infecciones del tracto genital masculino.

Financiado por proyectos DI10-0021, Dirección de Investigación, Universidad de La Frontera (JVV) y por gastos operacionales de la beca de doctorado nacional folio 21110764 (RB).

UTILIDAD DE LA MICRODISECCIÓN CELULAR CON LÁSER PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN ENDOMETRIO DE MUJERES FÉRTILES E INFÉRTILES CON ENDOMETRIOSIS DURANTE LA VENTANA DE IMPLANTACIÓN

(Estrogen and progesterone receptor expression in endometria from women with and without endometriosis during implantation window. An appraisal using laser capture microdissection system)

Barrientos S¹, Ortiz M¹, Cortegana W¹, Argandoña F¹, Devoto L¹, Kohen K¹, Palomino WA¹.

¹Instituto de investigaciones materno infantil, Facultad de medicina, Universidad de Chile.

El embrión para implantarse requiere del endometrio receptivo. Durante la receptividad endometrial los receptores de estradiol (ER) y progesterona (PR) son regulados en los compartimientos endometriales. Se ha postulado resistencia a la acción de progesterona en el endometrio de las mujeres con endometriosis. El objetivo de este trabajo fue comparar la expresión de ER y PR durante la receptividad endometrial. Se determinó la localización y distribución de ER y PR mediante inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF) en biopsias de endometrio obtenidas durante la fase secretora media de mujeres fértiles (n= 16) e infértiles con endometriosis (n=12). Se asignó un valor semicuantitativo a la inmunotinción mediante análisis digital de imágenes (Dscore). Los niveles de mRNA de ER se determinaron en células epiteliales (CE) obtenidas mediante microdissección con láser (LCM) y qRT-PCR. Se utilizó ANOVA para la comparación múltiple de los valores obtenidos. De acuerdo a Dscore; ER y PR fueron menores en CE de mujeres fértiles ($30,01 \pm 1,6$ vs $86,1 \pm 6,4$ $p=0,02$ y $56,04 \pm 9,1$ vs $127,06 \pm 12$ $p=0,012$). Los niveles de mRNA de ER fueron mayores en CE de mujeres con endometriosis $5,3 \pm 0,6$ vs $1,2 \pm 0,15$ $p=0,0068$. ER y PR persisten anormalmente en CE de mujeres con endometriosis. La expresión anormal de ER en el compartimiento epitelial puede explicar los defectos de receptividad endometrial en mujeres con endometriosis.

FONDECYT 1140688

ESTIMACIÓN ESTADÍSTICA DE LA INFERTILIDAD IDIOPÁTICA EN POTROS SEGÚN SU IMPRINTING GÉNICO

(Statistical estimation of idiopathic infertility in horses according to its gamete imprinting)

Hartley R^{1,6}, Salas C², Paradowska-Dogan A³, Romero F⁴, Alvarenga M⁵, Ramirez-Reveco A⁶.

¹Programa Doctorado en Ciencias Mención Biología Celular y Molecular Aplicada, Universidad de la Frontera, Chile. ² Laboratorio de Biometría, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ³ Section Molecular Andrology, Biomedical Research Center Seltersberg, Justus Lie. ⁴ Center of Neurosciences and Peptides Biology (CEBIOR-BIOREN), Faculty of Medicine, University of La Frontera, Temuco, Chile. ⁵ Sao Paulo State University-UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil. ⁶ big University of Giessen, Germany. ⁶ Laboratorio Criobiología y Análisis de Funcionalidad Espermática, Instituto de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile

Conocer la etiología de la subfertilidad idiopática en potros es fundamental para su manejo reproductivo. Hasta ahora, tanto el análisis andrológico como espermático no han permitido predecir las poblaciones sanas de subfértiles, siendo sólo definidas al momento de evaluar la preñez. Recientemente la epigenética ha sido empleada en el campo reproductivo, dando explicación de algunos tipos de infertilidad idiopática en humanos. Sin embargo, en equinos no existen estudios con esta aproximación. En el presente trabajo se seleccionaron espermatozoides criopreservados de potros con fertilidad y subfertilidad probada, y análisis andrológico y seminal normal, extrayendo e inmunoprecipitando su cromatina con anticuerpos contra histonas H3, H4K12 y portamina P1. Luego de la inmunoprecipitación las secuencias obtenidas fueron sujetas a análisis por PCR tiempo real para descifrar si los patrones de unión de las proteínas estaban relacionados con secuencias de genes involucrados en el desarrollo embrionario. Como no existe conocimiento de estos genes en equinos, se usaron las descritas en humanos: PLXNA, BRDT, NSD, MECP2, PHF7. Se ajustaron modelos estadísticos de regresión logística para establecer las histonas o secuencias que contribuyen más significativamente en la predicción de la fertilidad o subfertilidad, destacando las secuencias asociadas a NSD y PHF7. Nuestros resultados indican que la subfertilidad se predice con una buena exactitud, sin embargo, la fertilidad resultó mucho más variable, por lo tanto con mayor incertidumbre en su predicción. Los modelos ajustados en el estudio pueden servir de apoyo para futuros estudios, a mayor escala, sobre infertilidad idiopática.

RH: Becario Doctorado CONICYT

MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS CANINOS PROVENIENTES DE FOLÍCULOS POLIOVOCÍTICOS

(*In vitro* maturation of canine oocytes from of multioocyte follicles)

Astudillo I, Aspee K, Palomino J, De Los Reyes M.

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

La perra tiene un alto porcentaje de folículos poliovocíticos (FPOs) en comparación a otros mamíferos. Sin embargo, se desconoce la influencia de los ovocitos provenientes de este tipo de folículos sobre los porcentajes de maduración *in vitro* (MIV). El objetivo del estudio fue determinar la capacidad de MIV de ovocitos provenientes de FPOs versus los ovocitos provenientes de FMOs, según el estado de desarrollo folicular. Para esto, luego de ovariectomías de perras adultas, los ovocitos se obtuvieron desde los distintos tamaños de desarrollo folicular, considerando folículos uni y poli ovocíticos pre antrales, antrales chicos (~150–390µm), antrales medianos (400-590µm), los que se incubaron para maduración por 72h en medio TCM-199 suplementado bajo condiciones de cultivo. El estado de desarrollo nuclear se evaluó bajo microscopía de epifluorescencia utilizando tinción DAPI. Los resultados de un total de 295 ovocitos de FMOs y 76 de FPOs evaluados mostraron que un 38.5% y 45.7%; 36.2% y 37.8% presentaron reinicio meiótico (GVBD) en folículos antrales chicos y antrales medianos de folículos uni y poli ovocíticos, respectivamente y un 36.8% y 22.8%; 50.8% y 37.8% alcanzaron desarrollo hasta metafase I y II (MI-MII) en folículos antrales chicos y antrales medianos de folículos uni y poliovocíticos respectivamente. Los resultados indican que los ovocitos provenientes de FPOs poseen capacidad de maduración en cultivo, pero que sin embargo tiende a ser menor a lo observado en aquellos provenientes de FMOs. Adicionalmente, los ovocitos obtenidos de folículos antrales medianos presentan las mejores tasas de maduración en FPO y FPOs.

Financiamiento Proyecto FONDECYT 1140658

LA OBESIDAD MATERNA EN RATAS PRODUCE UN INCREMENTO DE ESTRADIOL ENDÓGENO EN LA DESCENDENCIA LLEVANDO A ALTERACIONES DEL DESARROLLO FOLICULAR EN LA ADULTEZ.

Olguín S¹, Álvarez D¹, Reyes A¹, Ramírez LA¹, Ambrosetti V¹, Guerra M¹, Fernandois D², Sotomayor-Zárate R³ and **Cruz G¹**.

¹ Laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas, CNPC, Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile. ² Programa de Doctorado en Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile ³ Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología, CNPC, Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile, gonzalo.cruz@uv.cl).

La obesidad gestacional se relaciona con una mayor predisposición a enfermedades endocrinas y metabólicas en la descendencia. Un mayor IMC en madres embarazadas se asocia con pubertad precoz y cáncer de mama en la descendencia. Ambas alteraciones se relacionan con niveles elevados de estrógenos. Nos propusimos estudiar si una dieta alta en grasa (HFD) previo y durante la gestación y lactancia aumenta los niveles de estradiol en la descendencia y además sus consecuencias en el desarrollo folicular ovárico en la adultez. Veinticuatro ratas Sprague Dawley fueron alimentadas con HFD (60% Kcal/grasa) o con dieta de control (12% Kcal Grasa) un mes previo a la preñez, durante la preñez y durante la lactancia. La descendencia fue estudiada en el día postnatal (PND) 1, PND7, PND14, PND30 y PND60. Encontramos un aumento en todas las edades, y una apertura vaginal temprana en hijas de madres obesas. Al PND60 las hijas de madres obesas tenían menos folículos antrales y un aumento en quistes foliculares en el ovario. Hijas de madres obesas tenían un aumento en los niveles séricos de estradiol en todas las edades. Asimismo, se encontró una disminución en la expresión de CYP3A hepática con claros signos de esteatosis hepática. Concluimos que la obesidad materna altera el metabolismo hepático de estradiol en la descendencia lo que conduce a mayores niveles de estradiol endógeno. Además, el aumento de los niveles de estradiol durante el desarrollo postnatal temprano puede ser responsable de la función reproductiva alterada en los hijos de madres obesas.

Financiamiento: FONDECYT grant N° 11130707, FONDECYT PROGRAM-CONICYT

TRABAJOS LIBRES 3

KISSPETINA PARTICIPA EN EL DESARROLLO DE FOLÍCULOS ANTRALES Y AUMENTA LA OVULACIÓN DURANTE EL ENVEJECIMIENTO OVÁRICO.

(Kisspeptin participates in the antral follicular development and increases the ovulation during ovarian ageing).

Fernandois D, Na A, Cuevas F, Lara HE, Paredes AH.

Laboratorio de Neurobioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El ovario expresa Kisspeptina y se ha postulado que ésta tendría un rol en el desarrollo folicular. Recientemente hemos descrito, por estudios *in-vitro*, que kisspeptina podría estar bajo el control del tono simpático ovárico. Considerando que la actividad nerviosa simpática ovárica aumenta con el envejecimiento, es posible que kisspeptina también aumente durante este período y afecte la dinámica folicular. Ante esto, variaciones de kisspeptina durante el periodo de subfertilidad podrían participar de los cambios del desarrollo folicular de este periodo. Para evaluar esta posibilidad analizamos la expresión de kisspeptina ovárica en ratas, durante el periodo fértil (6 meses) y sub-fértil (8 a 12 meses de edad). Para esto medimos el ARNm por qRT-PCR y los niveles de kisspeptin por Western-blot. Por otro lado, se administró directamente al ovario kisspeptina o su antagonista, a través de una bomba mini-osmótica durante 1 mes, y evaluamos el desarrollo folicular. Nuestros resultados indican un aumento de 1 vez sobre el control de kisspeptina durante la etapa sub-fértil comparado con la fertilidad ($p < 0,05$), y este aumento se correlaciona fuertemente con la actividad simpática (Pearson=0,8). Además, kisspeptina produjo: un aumento en el número de cuerpos lúteos y folículos tipo III (1,5 veces sobre el control, $p < 0,05$), pero una disminución en el número y tamaño de los folículos antrales (1,3 veces sobre el control, $p < 0,05$), efectos revertidos por la administración del antagonista. Estos resultados sugieren que kisspeptina aumenta la ovulación, disminuye el crecimiento folicular antral y que su expresión depende del tono simpático ovárico.

FONDECYT 1120147 y Beca Doctorado Nacional 21120454

ESTUDIO DE NIVELES DE RECEPTORES DE LIPOPROTEÍNAS EN EL SACO VITELINO Y SU ASOCIACIÓN CON DEFECTOS DEL CIERRE DEL TUBO NEURAL EN UN MODELO DE HIPERGLICEMIA MATERNA EN RATONES

(Study of the association between lipoprotein receptors in the yolk sac and NTD in a mouse model of maternal hyperglycaemia)

Schneider A, Santander N, Salas F, Berkowitz L, **Busso D.**

Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La diabetes pre-gestacional se asocia a una alta incidencia de defectos del desarrollo en el embrión en humanos y ratones, incluyendo defectos del cierre del tubo neural (NTD). Elevados niveles de glicemia pueden regular la expresión de receptores de lipoproteínas en diversos tejidos, incluyendo el receptor de HDL *Scavenger Receptor B1* (SR-BI). Por otro parte, la deficiencia de SR-BI en el saco vitelino se asocia a la presencia de NTD en ratones. La hipótesis de este trabajo es que la hiperglicemia en ratonas preñadas modula los niveles de receptores de lipoproteínas en el saco vitelino en etapas tempranas de la gestación, lo que se asocia a la presencia de NTD en los embriones. Para evaluar esta hipótesis, se indujo hiperglicemia transitoria en ratonas preñadas en el día embrionario (E)8,5 y se extrajeron los embriones en el día E9,5, para evaluar la presencia de NTD y determinar los niveles de SR-BI y de otros receptores de lipoproteínas en el saco vitelino. La hiperglicemia fue inducida mediante la inyección de volúmenes crecientes de una solución de glucosa (80% p/v) cada 45 minutos durante 8 horas. El tratamiento incrementó 2 veces la glicemia acumulada en las ratonas preñadas ($p < 0,05$). La hiperglicemia materna se asoció a NTD en un 12,5% de los embriones, mientras que en el grupo control no observó NTD. Los niveles de SR-BI en el saco vitelino no se modificaron por la hiperglicemia, mientras que LDLR aumentó 2,5 veces ($p < 0,05$). En conclusión, la hiperglicemia materna transitoria, durante la etapa del cierre del tubo neural, se asocia a un aumento de LDLR en el saco vitelino, sin cambios en SR-BI.

FONDECYT 1141236 (D.B.), Concurso Inmersión DIDEMUC (A.S.). Beca Doctorado CONICYT 21130444 (N.S.)

4-METOXIESTRADIOL NO AFECTA LA EXPRESIÓN DE BCL2-L10 Y SPON-1 NI LA VIABILIDAD DE CÉLULAS ISHIKAWA

(4-methoxyestradiol does not affect expression of *bcl2-L10* and *spn-1* or viability of Ishikawa cells)

Guajardo E, Mena D, Díaz P, Orihuela PA.

Laboratorio de Inmunología de la Reproducción, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile y Centro para el Desarrollo en Nanociencia y Nanotecnología

4-metoxiestradiol (4ME) y 2-metoxiestradiol (2ME) son metoxiestrógenos producidos mediante una hidroxilación y posterior metilación del 17 β -estradiol. Es sabido que 2ME ejerce una actividad pro-apoptótica en diversas líneas celulares cancerígenas incluyendo cáncer de endometrio. Sin embargo no es bien conocido si 4ME posee características similares. Por tanto se analizó el efecto de 4ME sobre la viabilidad en la línea celular Ishikawa y la expresión de los genes blancos de 2ME *bcl2-Like10* (*bcl2-l10*) y *spondina-1* (*spn-1*). Células Ishikawa fueron tratadas con etanol 0.5% (V) o 4ME 5 μ M durante 6, 12, 24, 48 y 72 horas para evaluar la viabilidad celular usando el ensayo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS). Otros cultivos fueron similarmente tratados y a las 6, 12 o 24 horas se analizó la expresión de *bcl2-L10* y *spn-1* por RT PCR. En cualquiera de los tiempos estudiados 4ME no afectó el porcentaje de células viables (V:104.9 \pm 3.9% vs 4ME:98.49 \pm 2%). Asimismo, la expresión relativa de *bcl2-L10* (V:0.9 \pm 0.15 vs 4ME:0.92 \pm 0,09) y *spn-1* (V:0.92 \pm 0.07 vs 4ME:0.89 \pm 0.1) no fue afectada por 4ME. Se concluye que 4ME no ejerce efecto pro-apoptótico ni cambia la expresión de los genes blancos de 2ME indicando efectos diferenciales de los metoxiestrógenos sobre la actividad biológica de las células Ishikawa.

DICYT 0215430D y Proyecto basal FB0807

EL SISTEMA PROTEINA G-alfa_s (Gα_s)/ADENILIL CICLASA DE MEMBRANA (ACm)/AMPc/PKA MODULA EL INFLUJO DE CALCIO Y LA REACCIÓN ACROSÓMICA (RA) INDUCIDA POR FIBRONECTINA (Fn) EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

(The G alpha_s protein/ACm/cAMP/PKA system modulates calcium influx during acrosome reaction in human sperm fibronectin-induced)

Pérez B¹, Signorelli J, Morales² P y Díaz ES^{1,3}.

¹Laboratorio Biología de la Reproducción y Desarrollo, Depto. Biomédico, Facultad Ciencias de la Salud, ²Instituto Antofagasta. Universidad de Antofagasta, ³CEMER-UA.

Previamente, demostramos la presencia de la proteína Gα_s, que la Fn induce la RA a través de la integrina α5β1 y que su efecto es mediado por el sistema ACm/AMPc/PKA. El objetivo de este trabajo es demostrar la participación de la proteína Gα_s, su efecto sobre: el sistema ACm/AMPc/PKA y el influjo de calcio, durante la RA inducida por Fn. Para ello, espermatozoides móviles, seleccionados por Percoll, fueron capacitados durante 5 hr. Alícuotas, en los últimos 30 min de capacitación, fueron pre-incubados en presencia o ausencia de un inhibidor de proteína Gα_s (NF449/1μM). 15 min después, se agregó Fn (100μg/ml) y se determinó el porcentaje de RA (PSA-FITC/Hoechst 33258), niveles de AMPc, y grado de fosforilación de proteínas sustrato de PKA (Western blot). Para determinar el influjo de calcio, alícuotas fueron pre-incubadas en los últimos 30 min de capacitación con FURA-2A. Luego, fueron pre-incubadas por 15 min en presencia o ausencia de diferentes inhibidores: proteína Gα_s (NF449/1μM), ACm (2,5dda/100μM), PKA (H89/100μM, KT5720/50nM). Finalmente, se agrega Fn (100 μg/ml), y se registra la movilización de calcio con el programa IONPro. Los resultados demuestran que al inhibir al sistema Prot. Gα_s/ACm/AMPc/PKA, se inhibe el efecto inductor de la Fn sobre: 1) la RA (Control=5±0,8%; Fn=13±1,5%; NF449=5±0,8%; Fn+NF449=5,5±0,5%); 2) los niveles totales de AMPc y 3) el grado de fosforilación de proteínas sustrato de PKA (n=6, P<0,001), 4) el influjo de calcio, disminuyendo paulatinamente la fase de Plateau. Estos resultados sugirieron que la interacción Fn-integrina α5β1 induce la RA modulando la activación del sistema Gα_s/ACm/AMPc/PKA y el influjo de calcio.

FONDECYT 1130341 Y 1120056; BECARIO CONICYT

EXPRESION ANORMAL DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN ENDOMETRIO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS DURANTE EL PERIODO DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

(Abnormal expression of complement system proteins in endometrial mucosae during implantation window in women with endometriosis)

Argandoña F¹, Barrientos S¹, Ortiz M¹, Devoto L¹, Kohen P¹, Palomino WA¹.

¹Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

La respuesta inmune materna debe adaptarse a la invasión del embrión inmunológicamente semi-extraño para evitar su rechazo. El sistema del complemento es parte de la respuesta inmune inmediata y el control de su activación es fundamental para la supervivencia del embrión. La proteína decay accelerating factor (DAF; CD55) controla la activación de C3 previniendo el daño y lisis celular producido por el complemento. C3 y DAF son regulados por progesterona durante la receptividad endometrial. Se ha postulado resistencia a progesterona en el endometrio de mujeres con endometriosis. El objetivo de este trabajo fue comparar la expresión endometrial de C3 y DAF en mujeres con y sin endometriosis. La localización de DAF y C3 se visualizó mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en 20 biopsias de endometrio obtenidas durante la fase secretora media. Los niveles de mRNA de C3 y DAF se determinaron en células aisladas específicamente del compartimiento epitelial (CE) o estromal (CS) mediante microdissección celular con láser y qRT-PCR. Se utilizó el test Mann Withney para comparar los resultados. C3 y DAF fueron localizados en CS y CE respectivamente. Los niveles de mRNA de C3 fueron mayores mientras los de DAF fueron menores en los endometrios de mujeres con endometriosis ($6,7 \pm 1,4$ vs $2,1 \pm 0,3$ $p= 0,006$ y $1,2 \pm 0,2$ vs $5,1 \pm 0,3$ $p=0.032$ respectivamente). La expresión anormal del sistema del complemento en la mucosa endometrial puede comprometer la supervivencia del embrión y explicar las fallas de implantación en las mujeres con endometriosis.

FONDECYT 1140688

GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (HCG) MODULA LA SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE B (TGF- β) EN CELULAS DE ESTROMA ENDOMETRIAL HUMANO (ESC).

(Human Chorionic Gonadotropin (hCG) modulates Transforming Growth Factor β (TGF- β) signaling in human endometrial stromal cells (ESC)).

Zavaleta K¹, Gonzalez R¹, Johnson MC¹, Tapia-Pizarro A.¹

¹Laboratorio Endocrinología Molecular Reproductiva, Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

TGF- β se expresa en el endometrio humano secretor, sin embargo sus vías de señalización no han sido completamente estudiadas en ESC. Por otro lado, esta citoquina disminuye la invasión del trofoblasto por un mecanismo endometrial opuesto al observado con hCG, el cual favorece la invasividad. Esto sugiere que hCG podría modular los efectos de TGF- β en ESC. En este trabajo se evaluó por inmunoblot las vías de señalización canónica (SMAD2/3) y no canónicas (ERK1/2 y AKT1/2/3) activadas por TGF- β en ESC y su posible modulación por hCG. Para ello ESC fueron incubadas (5-160 min) con dosis crecientes de TGF- β (1-10ng/ml) en presencia o ausencia de hCG (10UI/ml). Además se determinó mediante qPCR el nivel de transcrito para SMAD7 en ESC estimuladas con TGF- β (10ng/ml) y/o hCG por 24 h. Los resultados muestran que TGF- β induce transientemente la fosforilación de ERK, siendo máxima a los 5 min. AKT disminuye su fosforilación basal a partir de los 5 min. manteniéndose hasta los 160 min. SMAD se activa partir de los 40 min. hasta los 160 min. hCG no modifico significativamente la activación de ERK y AKT. Sin embargo la activación de SMAD fue completamente revertida en presencia de hCG (n=3, p<0,05). El nivel de SMAD 7 aumento ~50% en ESC tratadas con TGF- β lo cual no se observó al co-estimular con hCG (n=4, p<0,05). Estos resultados muestran por primera vez un efecto modulador de hCG sobre TGF- β en ESC, lo cual tendría implicancias directas en el proceso de implantación embrionaria y placentación.

FONDECYT 1140614 (A.T)

POSTERS

POSTER 1

EFFECTO DE LA TRANSFECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS PARA SU USO EN TRANSGENESIS MEDIADA POR ESPERMATOZOIDES (SMGT)

(Effect of transfection of bovine sperm for use in sperm mediated gene transfer)

Arias ME¹, Delgado A¹, Sánchez R¹ y Felmer R^{1,2*}.

¹Laboratorio de Reproducción, Centro de Biotecnología de La Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera.

²Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera.

*ricardo.felmer@ufrontera.cl

En bovinos, el progreso de la transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT) ha sido lento debido a la ineficiente internalización del ADN exógeno en los espermatozoides. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de tres tratamientos de transfección sobre parámetros de calidad y función espermática, y sobre la capacidad de captura del ADN exógeno. La transfección se realizó utilizando complejos de ADN plasmidial con Lipofectamina, SuperFect y TurboFect durante 30 minutos, se incluyeron controles. Se determinó la viabilidad espermática, estado del acrosoma, nivel de ROS, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi M$), integridad de ADN y captura de ADN exógeno mediante citometría de flujo, y la motilidad mediante el sistema CASA. Los resultados mostraron que todos los espermatozoides transfectados capturan ADN exógeno, incluido el grupo control ADN, y que estos tratamientos no afectan la viabilidad espermática, en comparación con el control. Sin embargo, SuperFect y TurboFect generaron una mayor ($P < 0.01$) proporción de espermatozoides con acrosoma dañado. La motilidad y el $\Delta\Psi M$ sólo se afectaron ($P < 0.01$) cuando se utilizó TurboFect. No se observaron diferencia entre los tratamientos, incluido los controles, en el porcentaje de espermatozoides con daños en el ADN y niveles de ROS. En conclusión, la transfección de espermatozoides utilizando Lipofectamina, SuperFect y TurboFect son métodos eficientes para promover la captura de ADN por los espermatozoides. Futuros estudios son necesarios para evaluar la efectiva internalización del ADN exógeno luego de la transfección y su eficiencia sobre la producción *in vitro* de embriones transgénicos mediante SMGT vía ICSI y fecundación *in vitro* convencional.

FONDECYT 11130724. CONICYT, Chile. Proyecto de Inserción de Capital Humano Avanzado en la Academia. PAI-CONICYT, Chile.

POSTER 2

IMPACTO DEL METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) EN EL CONTENIDO DE COLESTEROL OVOCITARIO EN RATONES.

(Impact of HDL Cholesterol Metabolism on the Mouse Oocyte Cholesterol Content).

Quiroz A, Molina P, Cautivo K, Rigotti A, **Busso D.**

Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo, Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Las HDL captan colesterol a través del receptor ABCA1 y lo transportan al hígado donde es captado por el receptor scavenger clase B de tipo I (SR-BI) para su excreción biliar. Los SR-BI KO y los ABCA1 KO presentan, además de un metabolismo anómalo de colesterol HDL, infertilidad femenina. Los SR-BI KO presentan HDL grandes, cargadas de colesterol. Sus ovocitos presentan exceso de colesterol desde de las etapas foliculares antrales, cuando son expuestos a las HDL del fluido folicular, además de activación espontánea y alta mortalidad. El tratamiento con Probuco, droga reductora de los niveles de colesterol plasmático, restablece la fertilidad en ratonas SR-BI KO. En este trabajo analizamos si el tratamiento con Probuco en ratonas SR-BI KO reduce el contenido de colesterol ovocitario, y si existe una modulación de los niveles de colesterol de ovocitos incubados con HDL *in vitro*. Además, estudiamos la presencia y localización de ABCA1 ovárica, y el nivel de colesterol de ovocitos ABCA1 KO. El tratamiento con Probuco redujo el colesterol plasmático en ratones SR-BI KO así como el colesterol ovocitario, determinado por tinción con filipina ($p < 0,05$). Ovocitos silvestres cargados con colesterol (mediante incubación con MBCD-colesterol) y posteriormente incubados con HDL humanas purificadas redujeron sus niveles de colesterol de forma dosis-dependiente (resultados preliminares). Finalmente, ABCA1 fue detectado en ovocitos y células foliculares ováricas, y ovocitos ABCA1 KO exhibieron exceso de colesterol ($p < 0,05$). En conjunto, nuestros resultados en ratones sugieren que la homeostasis de colesterol ovocitario mediada por HDL sería importante para la fertilidad.

FONDECYT 1141236

POSTER 3

METHYL-B-CYCLODEXTRIN IMPROVES SPERM CAPACITATION STATUS ASSESSED BY FLOW CYTOMETRY ANALYSIS AND ZONA PELLUCIDA BINDING ABILITY OF FROZEN/THAWED BOVINE SPERMATOZOA

Aguila L¹, Arias ME¹, Vargas T¹, Zambrano F¹, Felmer R^{1,2,*}

¹Laboratory of Reproduction Centre of Reproductive Biotechnology (CEBIOR-BIOREN), Faculty of Medicine, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.

²Faculty of Agriculture and Forestry Sciences, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. * Email: ricardo.felmer@ufrontera.cl

Mammalian sperm undergo a series of biochemical transformations in female reproductive tract known as capacitation. Cyclodextrins added to the sperm culture medium have been described as inducers of *in vitro* capacitation. However, the additive capacitating effect of methyl- β -cyclodextrin (M β CD) in medium containing bovine serum albumin is unknown in bovines. In the present study, we evaluated the effects of M β CD-supplementation on different sperm functional parameters. Frozen-thawed bovine spermatozoa were incubated for 3 h in Sp-TALP medium supplemented with M β CD (1 and 3 mM) and in a control group not supplemented (CG). The sperm capacitation markers (cell plasma membrane fluidity (PMF), intracellular calcium concentration [Ca^{2+}_i], and acrosome reactivity) were evaluated by flow cytometry (n=3). The sperm ZP-binding assay was performed by co-incubating zona intact bovine oocytes with capacitated spermatozoa (n=5) for 1 h. The number of sperm ZP-bound was assessed using epifluorescence microscopy after Hoechst staining. Data were analyzed by ANOVA and the significance was set at $P < 0.05$. The results showed that M β CD-supplemented medium increased ($P < 0.05$) the PMF above 40%, the [Ca^{2+}_i] between 2-5%, and improved the acrosome reactivity (range 36-47%). The number of ZP-bound spermatozoa also was higher with the M β CD treatments (50, 190, and 200 sperm/oocyte for CG, 1 mM, and 3 mM of M β CD, respectively). Thus, we conclude that M β CD-supplementation is able to enhance the capacitation status of frozen-thawed bovine spermatozoa and could result in a valid strategy for its application on artificial reproductive technologies such as *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection.

FONDECYT 1120241 (R.F.), LA: Becario Doctorado Nacional CONICYT

POSTER 4

KISSPEPTINA REGULA LA EXPRESIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ 2 Y 9 EN OVARIOS DE RATAS EN EL PERIODO DE SUBFERTILIDAD

(Kisspeptin regulates the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in rat ovaries on the subfertility period)

Las Heras M, Lara H, Paredes A.

Laboratorio de Neurobioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El sistema proteolítico de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) juega un rol clave en el remodelamiento de la matriz extracelular del ovario. Un péptido que regula la expresión y actividad de las MMPs en líneas celulares es kisspetina. Recientemente, resultados del laboratorio han demostrado que kisspeptina participa en desarrollo folicular, ovulación y aumenta durante el envejecimiento reproductivo. Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual kisspetina regula la función ovárica. El propósito de este trabajo es determinar mediante RT-qPCR si kisspeptina regula la expresión génica de las MMPs y cómo éstas cambian en el ovario durante el ciclo estral. Para ello, se utilizaron animales fértiles (n=15, 3 y 6 meses de edad) y subfértiles (n=15, 8 meses de edad, ovarios incubados *in vitro* en presencia de kisspeptina y de kisspeptina + p234).

Los resultados obtenidos muestran que en ratas fértiles los niveles del transcrito de MMP-9 se encuentran elevados en proestro y disminuyen significativamente en estro ($p < 0,05$), mostrando un patrón similar al transcrito de KISS, cuya expresión aumenta en respuesta al pico de LH. Además, se encontró que en ovarios de ratas subfértiles incubados *in vitro* tanto en presencia de kisspeptina y de kisspeptina + p234 (antagonista del receptor) hay un aumento significativo en la expresión del transcrito de MMP-2 respecto a los controles (192% , $p < 0,05$). Estos resultados sugieren que kisspeptina favorece la expresión de MMP-2, pero no de MMP-9 durante el envejecimiento reproductivo y que este efecto es independiente de la actividad del receptor GPR54.

FONDECYT 1120147, M.LH: Becaria Magíster CONICYT

POSTER 5

EFFECTO DEL MODAFINILO (MENTIX) EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA.

(Effect of Modafinil (Mentix) in sperm quality)

Alvarado A¹, Aguirre P¹, Gripe S¹, Hidalgo I¹, Pérez B², Morales P^{2,3}, Díaz ES^{2,4}, Signorelli J.^{2,4}

¹Facultad de Medicina y Odontología; ²Laboratorio de Biología de la Reproducción, Departamento Biomédico. Universidad de Antofagasta; ³Instituto Antofagasta; ⁴CEMER-UA.

El modafinilo es un psicoestimulante utilizado para el tratamiento de la narcolepsia. Su propiedad como productor de vigilia y potenciador de la función cognitiva lo que motiva su consumo por parte de estudiantes universitarios. Es por ello, que estudiamos la calidad espermática en estudiantes que utilizan modafinilo y en ratones a los que se les administró durante 30 días el medicamento. Se evaluaron 14 estudiantes de diversas carreras, de los cuales 4 llevaban consumiendo modafinilo por 2 semanas. A cada uno de ellos se le realizó un espermiograma según los parámetros de la OMS. En ratones, se utilizaron 3 grupos: grupo control (no recibió ni medicamento ni vehículo, n= 4), grupo Sham (recibió el vehículo, n= 4) y grupo experimental (recibió el medicamento, n= 5). La dosis administrada a los ratones es proporcional al peso del macho y análoga a la consumida por los estudiantes. Los parámetros evaluados fueron: recuento espermático (concentración de espermatozoides), viabilidad y movilidad (progresivos, no progresivos e inmóviles). En humanos, se observó una disminución significativa de la viabilidad y la movilidad espermática ($P > 0,0001$ y $P > 0,0002$) en estudiantes que consumen modafinilo. Sin embargo, el recuento espermático no entregó diferencias significativas. En ratones, se observó: una disminución significativa en la movilidad y viabilidad espermática ($P > 0,0020$ y $P > 0,0042$) y un aumento en el recuento espermático ($P > 0,0380$) en aquellos ratones que consumieron la droga. Los resultados sugieren que el modafinilo reduce la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides humanos y de ratón y aumenta el recuento espermático en ratones.

FONDECYT 1130341 (ED) y 1120056 (PM)

POSTER 6

TÉCNICA DE CRIOPRESERVACIÓN IN VITRO DE SEMEN DE ZÁNGANO DE *Apis mellifera*

(In vitro Cryopreservation Technique of *Apis mellifera* sperm drones)

Cruz-Fernandes L¹, Díaz MC¹, Acuña R², Palomino J³, Moreno RD¹.

¹ Unidad de Endocrinología y Reproducción, Dpto. Fisiología, Pontificia Universidad de Católica de Chile. ² Centro Investigación Apícola Abejas del Bio Bio Ltda. ³ Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Departamento de Fomento de Producción Animal, Universidad de Chile.

Las abejas son organismos haplodiploides, con hembras (obreras) resultantes de ovocitos fertilizados y machos (zánganos) de huevos no fertilizados. Para que una colmena se mantenga funcional, es necesario un gran porcentaje de obreras por lo que la calidad del semen de zángano es de vital importancia. Debido a que la disponibilidad de zánganos maduros depende de un flujo de néctar apropiado, nuestro objetivo fue desarrollar un protocolo de criopreservación de semen de *A. mellifera* para su uso indiscriminado en el tiempo, mediante un equipo programable de congelación. Para esto se emplearon dos procedimientos de congelamiento (rápido y lento) con una mezcla de crioprotectores DMSO - Glicerol (5%) y se evaluó la viabilidad post-descongelamiento mediante el kit Live and Dead, que mide espermatozoides vivos / muertos con las sondas fluorescentes SYBR-14 / Ioduro de Propidio. Nuestros resultados arrojaron una viabilidad de 64,9% con el protocolo rápido contra una de 46,8% con el lento (n=2). La viabilidad espermática previa al congelamiento fue de un 72.6%. Estos resultados sugieren que la congelación rápida es mejor que la lenta. Usando el protocolo rápido e introduciendo al estudio semen de la sub-especie *Italiana*, se percibe una tendencia de mayores viabilidades espermáticas cuando comparando con la sub-especie *Carnica*. Además se evaluó la motilidad de las dos sub-especies, observándose un mayor movimiento en la *Italiana*. Sin embargo, se requieren más pruebas para confirmar esto. En conclusión, la criopreservación de semen de *A. mellifera* y su éxito parece depender de la sub-especie utilizada.

Financiado por Proyecto FIA: PYT-2013-0053

POSTER 7

PATRÓN DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN Y SITIO ESPECÍFICO DEL PROMOTOR DEL GEN DE LEPTINA EN HIJOS E HIJAS PERIPUBERALES DE MUJERES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (SOP)

(Global and leptin gene promoter DNA methylation in peripubertal sons and daughters of women with polycystic ovary syndrome (PCOS))

Echiburú B¹, Concha F¹, Pérez-Bravo F², Maliqueo M¹, Crisosto N¹, Sandoval D³, Vantman N¹, Recabarren SE³ y Sir-Petermann T¹.

¹Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile. ²Laboratorio de Genómica Nutricional, Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile. ³Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán.

Hemos establecido que los hijos e hijas de mujeres con SOP (HSOP) presentan alteraciones antropométricas, metabólicas y reproductivas desde la infancia. Algunos de estos rasgos pueden establecerse desde la gestación y modificarse en la vida postnatal. La leptina podría constituir un nexo entre estas complicaciones. Los cambios epigenéticos, pueden modular la expresión génica y traducir los factores ambientales en rasgos fenotípicos. Caracterizamos el patrón de metilación global del ADN en 70 HSOP y 63 hijos/as de mujeres controles (HC). Un sitio del promotor del gen de leptina (PGLEP) se evaluó en 20 HSOP y 21 HC. Se realizó un examen clínico-antropométrico, prueba de tolerancia a la glucosa oral con determinación de glucosa, insulina, perfil lipídico y de adipocitoquinas. La metilación global se evidenció mediante un kit colorimétrico y el PGLEP por curvas de disociación. Los grupos fueron comparables en edad y peso. El grado de metilación global fue significativamente más alto en los HSOP en comparación a los HC ($p=0.02$). La metilación específica y la concentración de leptina sérica fueron comparables entre los HSOP y HC. No obstante, los HSOP mostraron una correlación negativa entre el grado de metilación del PGLEP y la concentración de glucosa post-estímulo ($r=-0.49$, $p=0.03$). En conclusión, el mayor porcentaje de metilación global de ADN que presentaron los HSOP podría ser consecuencia de una regulación epigenética diferente. Este fenómeno podría estar condicionado por la madre con SOP a su descendencia desde la gestación o modificado posteriormente por diversos factores.

Fondecyt 1071007, 1110864 y 1151531.

POSTER 8

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CICLO REPRODUCTIVO EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS CANINOS

(Effect of the reproductive stage on in vitro maturation of canine oocytes)

Aspee K, Astudillo I, Palomino J, De Los Reyes M.

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Los ovocitos caninos han mostrado un desarrollo pobre durante la maduración in vitro comparado con otras especies, lo que puede atribuirse en parte a que son obtenidos principalmente de ovarios de perras adultas en anestro por ser la etapa más prolongada del ciclo estral. En este trabajo se comparó la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos provenientes de folículos antrales de ovarios de perras en distintas etapas del ciclo estral, las que se determinaron mediante las estructuras ováricas y progesterona sérica. Los ovocitos se obtuvieron a través de cortes ováricos seleccionando aquellos provenientes de folículos antrales de diferentes tamaños. Los ovocitos se maduraron in vitro en medio TCM-199 suplementado bajo condiciones de cultivo por 72h, evaluándose posteriormente el desarrollo meiótico de cada uno mediante tinción DAPI bajo microscopía de epifluorescencia. De los ovocitos que se distinguió claramente el material nuclear, se contabilizaron un total de 38 ovocitos en anestro (A); 38 en proestro y/o estro (P-E) y 184 en diestro (D). Los porcentajes de ovocitos que estaban en reinicio meiótico (GVBD) en A; P-E y D fueron de 39.4%, 23.6% y 38% respectivamente y de aquellos que alcanzaron la primera y segunda metafase (MI-MII): 42.1%, 63.1% y 43.4% respectivamente. Se concluye que los ovocitos obtenidos de folículos antrales en etapas de estro y/o proestro tendrían una mayor capacidad de maduración *in vitro*, logrando mayores porcentajes de ovocitos en MI-MII, a diferencia de los que son obtenidos en etapas de anestro o diestro donde predominan ovocitos en etapas más tempranas de la meiosis.

Proyecto FONDECYT 1140658

POSTER 9

INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SDC-1 POR SOBREENPRESIÓN DE ZEB1/ZEB2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

(Suppression of SDC-1 expression by overexpression of ZEB1/ZEB2 in prostate cancer cells)

Farfán N¹, Chrzanowsky D¹, Orellana-Serradell O¹, Castellón EA¹, García de Herreros A², **Contreras HR.**¹

¹Laboratorio de Andrología Celular y Molecular. Programa disciplinario de Fisiología y Biofísica. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

²Instituto de Investigaciones Médicas. Hospital del Mar. Universidad Pompeu Fabra. Barcelona. España.

En el cáncer de próstata (CaP) el aumento de la expresión de factores transcripcionales asociados con la transición epitelio mesenquimal (TEM) como Snail, Slug, TWIST, ZEB1/2 y la disminución de la expresión de E-cadherina y sindecano-1 (SDC-1) está asociada con mayor agresividad. Varios E-Box del promotor de SDC-1 pueden ser reconocidas por ZEB1/2. En este trabajo, se evaluó el efecto de ZEB1/2 sobre la expresión de SDC-1 en líneas celulares comerciales de CaP de baja (LNCaP) y alta (PC3) capacidad tumorigénica y en una línea epitelial de próstata normal (RWPE1). Knocked down y expresión ectópica de ZEB1/2 se obtuvo mediante transducción con vectores lentivirales. Marcadores de TEM fueron evaluados por PCR en tiempo real, western blot e inmunocitoquímica. Se realizaron ensayos de gen reportero de luciferasa y transfecciones transitorias con Lipofectamine 2000. La lectura de luminiscencia de luciferasa fue con Luciferasa Kit Dual Glo. En LNCaP, PC3 y RWPE1, se observó represión de E-cadherina y aumento de Snail, Slug y ZEB1. LNCaP y PC3 presentan altos niveles basales de ZEB1 y Snail. Sólo en células RWPE-1, ZEB1 reprimió la expresión transcripcional de SDC-1. La represión por ZEB1 fue mayor que con ZEB2. El silenciamiento de ZEB1 por transducción lentiviral aumenta el ARNm de SDC-1. Además, la expresión ectópica de ZEB1 reprime la actividad del promotor del gen de SDC-1 (-105 / +38). En células con sobreexpresión de ZEB1/2, SDC-1 se transloca desde la membrana plasmática al núcleo. ZEB1 reprime la expresión de SDC-1. La represión de SDC-1 podría ser un efecto exclusivo de ZEB1.

Financiado por FONDECYT 1151214 (HC) y 1140417 (EC)

POSTER 10

LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA MODIFICA LA CAPACIDAD DE UNIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$

(Sperm capacitation changes the ability of union of $\alpha 5\beta 1$ integrin)

Lonis MA¹, Pozo P¹, Morales P^{1,2}, Díaz ES.^{1,3}

¹Laboratorio Biología de la Reproducción y Desarrollo, Depto. Biomédico, Facultad Ciencias de la Salud, ²Instituto Antofagasta. Universidad de Antofagasta, ³CEMER-UA.

Previamente, demostramos que al aumentar el tiempo de capacitación de los espermatozoides humanos se detecta un aumento de la integrina $\alpha 5$ en la cabeza del espermatozoide y que el receptor de fibronectina (integrina $\alpha 5\beta 1$) se une, al ligando, con mayor afinidad y avidéz. Los cambios de conformación de la integrina están asociados a cambios intracelulares, que en el caso del espermatozoide podrían estar asociados al proceso de "capacitación". **Objetivo:** Determinar el grado de unión con la fibronectina (Fn) y detección del estado conformacional de la integrina $\alpha 5\beta 1$ durante la capacitación espermática. **Metodología:** Para esto, alícuotas de espermatozoides móviles, seleccionados por Percoll, capacitados durante 0, 3, 5 y 18 hrs, fueron utilizados para determinar: i) capacitación (usando CTC) y ii) reacción acrosomal (mediante PSA-FITC), iii) detectar cambios en la capacidad de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de unir Fn-FITC (por citometría de flujo e inmunofluorescencia), y iv) determinar el tipo de fosforilación de la integrina asociado a la capacitación y a la capacidad de unión del ligando. **Resultados:** Los resultados indican que el porcentaje de detección de la integrina $\alpha 5\beta 1$ aumenta a medida que el espermatozoide se capacita ($P < 0,001$ $N = 10$), lo que se correlaciona con el porcentaje de Fn-FITC unida y el aumento del porcentaje de espermatozoides reaccionados inducidos con fibronectina ($P < 0,001$ $N = 10$). Además, se observa un aumento en el grado de fosforilación de la subunidad $\beta 1$ ($N = 3$).

Los resultados obtenidos sugieren que existe una correlación entre el proceso de capacitación de espermatozoides humanos y la activación de la integrina $\alpha 5\beta 1$.

Investigación financiada por FONDECYT 1130341 y FONDECYT 1120056.

POSTER 11

EFFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL DE ESPERMATOZOIDES DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).

(Effect of cryopreservation on the mitochondrial function of spermatozoa of Atlantic salmon (*Salmo salar*)).

Figueroa E^{1,2,3}, Valdebenito I², Risopatrón J³, Farias JG.^{1,3}

¹Departamento de Ingeniería, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ²School of Aquaculture, Catholic University of Temuco, Temuco, Chile. ³BIOREN–Center for Biotechnology in Reproduction, La Frontera University, Temuco, Chile.

La criopreservación de espermatozoides de peces ha permitido cambios importantes en la biotecnología reproductiva. Sin embargo, estos protocolos generan extensos daños celulares afectando la función mitocondrial y la capacidad fecundante del espermatozoide. Actualmente existen pocos antecedentes del efecto de la criopreservación sobre la dinámica mitocondrial en espermatozoides en peces. El objetivo es evaluar el efecto de la criopreservación sobre la dinámica mitocondrial en espermatozoides de salmón del Atlántico. Los espermatozoides fueron congelado en medio Cortland®+ 1,3M DMSO+ 0,3M glucosa + 2% BSA para el tratamiento (T) y se utilizó semen fresco como control (C). Pajuelas de 0,5mL de suspensión fueron congeladas a una tasa de 68°C/min en vapores de N₂L. La descongelación se realizó en baño termorregulado (35°C). Post-descongelación se utilizó un lector de microplacas multimodal para evaluar en tiempo real el metabolismo mitocondrial (3 min.) a una concentración de 1x10⁹espermatozoides (esp)/mL: se determinó [ATP] con el kit CellTiter-Glo® y [O₂] con el kit MitoXpress® Xtra, para estos análisis se utilizaron inhibidores y desacoplantes de la cadena transportadora de electrones como: rotenona (R, 10µM), antimicina A (A, 10 µM), cianuro (C, 0,5 µM) y 2,4 dinitrofenol (D, 10µM). En los espermatozoides criopreservados (T) la [ATP] basal fue 5,7±1,2 nmoles/10⁹esp presentando diferencias significativas con control (7,4±0,64 nmoles/10⁹esp, p<0,05), de igual forma las células incubados con R (2,9±0,78 nmoles/10⁹esp), A (3,98±0,92 nmoles/10⁹esp), C (1,37±0,66 nmoles/10⁹esp) y D (1,59±0,48 nmoles/10⁹esp) presentaron diferencias estadísticamente significativas durante los primeros 10 segundos de incubación en relación al control (5,5±0,84 nmoles/10⁹esp; 6,1±0,56 nmoles/10⁹esp; 4,1±0,99 nmoles/10⁹esp y 4,9±0,79 nmoles/10⁹esp, respectivamente. p<0,05). La [O₂] basal en espermatozoides controles fue 4230±520 UFR/10⁹esp presentando diferencias significativas con T (3040 UFR/10⁹esp), también los tratamientos incubados con R (3508±320 UFR/10⁹esp), A (3627±480 UFR/10⁹esp) y D (4290±429 UFR/10⁹esp) presentaron diferencias significativas con el control (R: 2704±298 UFR/10⁹esp; A:2852±570 UFR/10⁹esp y D:3442±612 UFR/10⁹esp, respectivamente. p<0,05), los cambios en la tasa [O₂] de espermatozoides en presencia de inhibidores y desacoplantes fue posterior a 10 segundo de incubación. Estos resultados preliminares sugieren que la criopreservación induce alteraciones en la dinámica mitocondrial en espermatozoides de salmón del Atlántico, pero al parecer una adecuada respuesta fisiológica a inhibidores y desacoplantes.

FONDECYT 1151315 (F.J), FONDEF D10I1064 (I.V). F.E: Becario Doctorado CONICYT

POSTER 12

METFORMIN REDUCES PLATELET-ENHANCED OVARIAN CANCER CELL EMT, SPHERE FORMATION AND MIGRATION

(Metformina reduce el aumento de EMT, formación de esferas y migración promovida por plaquetas en células de cáncer de ovario)

Erices R^{1,2}, Cubillos S¹, Ramírez C¹, Marquez¹ M, González P¹, Bravo ML¹, Kato S², Cuello MA², **Owen GI**^{1,3}.

¹Facultad de Ciencias Biológicas, ²Facultad de Medicina & ³Centro UC Investigación en Oncología, Pontificia Universidad Católica de Chile. gowen@puc.cl

The anti-diabetic drug Metformin has shown benefits not only in diabetic patients, but also in patients with endometriosis, polycystic ovary syndrome and ovarian cancer. Metformin use has demonstrated clinical correlation with reduced ovarian cancer incidence and improved response to treatment. An increase in platelets (thrombocytosis) is recognized as an independent risk factor of metastasis in ovarian cancer patients and *in vitro* platelet-cancer cell interaction promotes Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) and migration. Our objective was to determine if Metformin can abrogate the effect of platelets on EMT and migration of ovarian cancer cells. Ascitic fluid of ovarian cancer patients was obtained with written informed patient consent from a network of hospitals in Chile. Ascitic fluid isolated cancer cells and ovarian cancer cell lines were co-cultivated with healthy human platelets in presence or absence of Metformin. Ovarian cancer cells were cultured under low attachment conditions to obtain cancer cell spheres (cancer stem cells). EMT transcription factor levels were determined by Western blotting and cell migration determined using Boyden chambers and the scratch assay. In both cell lines and primary culture, Metformin inhibits the platelet-induced increase in 1) EMT transcription factors, 2) cancer cell migration and 3) cancer sphere formation. We present the first evidence that Metformin can inhibit the pro-metastatic actions of platelets upon cancer cells. Our results support the consideration of Metformin as an adjuvant treatment for ovarian cancer patients.

FONDECYT 3150028, 1140970 & 1120292. CORFO L2 13IDL2-18608, BMRC 13CTI 21526-P6, CONICYT-FONDAP # 15130011

POSTER 13

CAMBIOS DINÁMICOS DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DURANTE LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE DE RATA

(Dinamical changes in mitochondrial activity during rat sperm capacitation)

Maldonado-Michea JR, Poveda PM, Andrade JC, Fábrega F, Morales P y Zúñiga LM.

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Antofagasta. Instituto Antofagasta. Universidad de Antofagasta.

La mitocondria provee la energía para llevar a cabo varios procesos celulares que incluyen la movilidad espermática. El patrón de movilidad espermática cambia cuando el espermatozoide adquiere su capacidad fecundante. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar la actividad mitocondrial durante la capacitación del espermatozoide de rata. Para ello trabajamos con ratas de la cepa *Sprague Dawley* de 4 meses de edad. Obtuvimos espermatozoides de la cola del epidídimo en medio Biggers Whitten & Whittingham (BWW) sin bicarbonato ni BSA. Incubamos los espermatozoides en medio capacitante: BWW + 25 mM de bicarbonato + 1.5% de BSA; por 0, 1.5, 3 y 5 h. Después de cada tiempo de incubación procesamos los espermatozoides utilizando el kit MitoStatus Red™ de BD Pharmigen para medir la actividad mitocondrial por citometría de flujo. Identificamos 5 poblaciones con diferente actividad mitocondrial a las que denominamos: súper-baja, baja, media, alta y súper-alta. A las 0 h de incubación detectamos principalmente dos poblaciones con baja (40%) y media (41%) actividad; a las 1.5 h de incubación detectamos tres poblaciones con baja (19%), media (22%) y súper-alta (44%) actividad; a las 3 h de incubación detectamos cuatro poblaciones con baja (26%), media (18%), alta (17%) y súper-alta (27%) actividad; y a las 5 h detectamos cinco poblaciones con súper-baja (29%), baja (23%), media (8%), alta (13%) y súper-alta (15%) actividad. Concluimos que la actividad mitocondrial cambia dinámicamente durante la capacitación espermática *in vitro*. Actualmente estamos realizando experimentos para identificar cuál de estas poblaciones de espermatozoides contienen el mayor número de espermatozoides capacitados.

FONDECYT 11121491 (L.Z.), FONDECYT 1120056 (P.M.).

POSTER 14

EL PROTEASOMA REGULA LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS SER Y THR DURANTE LA CAPACITACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS HUMANOS

(The Proteasome is Involved in the Regulation of Protein Phosphorylation on Serine and Threonine Residues During the Capacitation of Human Sperm)

Zapata HP¹, Barón L¹⁻², Díaz ES¹, Morales P.¹⁻²

¹Instituto Antofagasta. Universidad de Antofagasta, Chile. ²Laboratorio de Biología de la Reproducción. Departamento Biomédico. Facultad Ciencias de la Salud. Universidad de Antofagasta, Chile.

La capacitación espermática es un proceso que involucra la activación de proteínas quinasas (PKs) e inactivación de proteínas fosfatasas (PPs). El balance entre la actividad de PKs y PPs modifica el patrón de fosforilación de proteínas en residuos de Ser y Thr durante la capacitación; sin embargo, no se conoce cuál es la participación del proteasoma espermático en este proceso. El objetivo de este trabajo fue evaluar el rol del proteasoma durante la capacitación de los espermatozoides humanos.

Con este propósito, espermatozoides humanos fueron obtenidos en una gradiente doble de percoll y luego incubados en medio capacitante (2,6% BSA y 25 mM bicarbonato) a 37 °C, 5% CO₂. Luego, diferentes alícuotas fueron incubadas por varios períodos (0, 15, 30 y 60 min) con epoxomicina, un inhibidor del proteasoma, o con 0.1% DMSO (control). La actividad del proteasoma, el porcentaje de espermatozoides capacitados, el patrón de fosforilación en Ser y Thr, y la fosforilación de sustratos de PKA se analizaron usando un sustrato fluorogénico, el ensayo de clortetraciclina (CTC), análisis de Western blot y citometría de flujo, respectivamente.

Los resultados indican que la actividad enzimática del proteasoma aumenta durante la capacitación. El tratamiento con epoxomicina inhibe la actividad enzimática del proteasoma, disminuye el porcentaje de espermatozoides capacitados, cambia el patrón de fosforilación en residuos Ser y Thr y disminuye el porcentaje de proteínas fosforiladas en sustratos de PKA.

Los resultados sugieren que el proteasoma espermático tiene una función importante durante la capacitación y su mecanismo de acción implica modificaciones en el patrón de fosforilación de residuos de Ser y Thr.

FONDECYT: 1120056 (P.M.), 1130341 (E.D.) HZ: Becario Doctorado CONICYT

POSTER 15

EFFECTO DE LOS METABOLITOS DE ESTRADIOL 2-ME2 Y 2-OHE2 SOBRE LA ANGIOGÉNESIS Y SECRECIÓN DE VEGF EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA HUMANA.

(Estradiol metabolites effect, 2-ME2 and 2-OHE2, on angiogenesis and VEGF secretion in human granulosa cells).

Henríquez S¹, Cárdenas M¹, Retamales R¹, Kohen P¹, Godoy A¹, Orge F¹ y Devoto L¹.

¹Laboratorio de Endocrinología Clínico-Molecular de la Reproducción, Instituto de Investigación Materno Infantil (IDIMI), Universidad de Chile, Santiago, Chile.

El estradiol (E2) es el esteroide más importante secretado por las células de la granulosa (CG) del ovario humano. El E2 se metaboliza a diferentes metabolitos de estrógenos (ME) que carecen de actividad estrogénicas y poseen diferentes características, entre ellas destacan, la actividad anti-proliferativa, pro-apoptótica y anti-angiogénica. En fase folicular, durante la selección del folículo dominante, existe un incremento de la angiogénesis y permeabilidad vascular, sugiriendo que los ME podrían ser importantes durante el desarrollo folicular normal. En la angiogénesis participan varios factores, destacando entre ellos el VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular).

En este trabajo se determinó el efecto de los metabolitos de estradiol 2-OHE2 y 2-ME2 sobre la angiogénesis y la secreción de VEGF de CG humana.

El potencial angiogénico se evaluó por ensayos de angiogénesis *in vitro* y los niveles de VEGF por ELISA, desde medios condicionados proveniente de cultivo primario de células de la granulosa luteinizadas de pacientes del programa de Fertilización *in vitro*.

Los resultados muestran que 2-ME2 inhibió significativamente ($p \leq 0,05$) la secreción de VEGF y el potencial angiogénico de las CG respecto de la condición basal, mientras que a concentraciones fisiológicas no logró revertir el efecto pro-angiogénico de hCG. En forma inversa, 2-OHE2 aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) el potencial angiogénico y la secreción de VEGF respecto del basal. Esta información permite postular la existencia de un balance intra-folicular de ambos ME durante el desarrollo folicular normal, (selección-dominancia), ya sea favoreciendo (pro-angiogénico) o inhibiendo (anti-angiogénico) la selección y dominancia del folículo en desarrollo.

FONDECYT REGULAR 1140693

POSTER 16

EFFECTO DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE SOBRE EL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN EN EL OVARIO

(Effect of FSH on the ovarian glycosylation pattern)

Barón L¹, Zúñiga L¹, Morales P¹, Owen GI², Velásquez EV.³

¹ Laboratorio de Biología de la Reproducción, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile. ² Unidad de Endocrinología y Reproducción, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. ³ Departamento de Aplicaciones Nucleares, Comisión Chilena de Energía Nuclear, Santiago, Chile

El desarrollo y la maduración folicular dependen principalmente de la Hormona Folículo Estimulante (FSH). Recientemente, reportamos que una lectina causa muerte de las células de la granulosa (CG) e incrementa la atresia folicular, afectando principalmente la población de folículos antrales tempranos saludables. Nuestros resultados sugieren un rol para la glicosilación en el proceso de selección folicular, sin embargo no se ha descrito previamente en la literatura una asociación entre FSH y el perfil de glicosilación en el ovario. En este trabajo se investigó el efecto de FSH sobre el patrón de glicosilación en el ovario, utilizando un modelo animal (rata). Cultivos primarios de CG fueron incubados en presencia o ausencia de FSH durante 48 horas y los cambios en el perfil de glicosilación fueron evaluados mediante análisis de array de lectinas (GlycoTechnica Ltd., Japon). En un ensayo *in vivo*, se examinó el efecto de FSH administrada intrabursalmente, en ovarios colectados 24 o 48 horas después de la cirugía. El patrón de glicosilación fue evaluado por análisis histológico utilizando un panel de lectinas (MPA, ECA, STL, Con-A) que reconocen una variedad de residuos y estructuras de carbohidratos. Resultados preliminares sugieren que FSH modifica la presencia de O- y N-glicanos altamente ramificados, así como también estructuras con menor grado de procesamiento, directamente en granulosa y también en distintos compartimentos del ovario. Estos resultados muestran que FSH modula el patrón de glicosilación en el ovario. Se requieren estudios adicionales para determinar la función de los carbohidratos en el proceso de selección folicular.

Financiado por FONDECYT #1100870 (GO), # 11121491 (LZ), #3090066 (EV).

POSTER 17

UNA EXPOSICIÓN CRÓNICA A UNA MEZCLA DE DISRUPTORES ENDOCRINOS (FTALATOS Y ALQUILFENOLES) ALTERA EL CICLO REPRODUCTIVO EN RATÓN HEMBRA

(A chronic exposure to a mixture of endocrine disrupters (phthalates and alkylphenols) disturbs the reproductive cycle in female mice)

Patiño-García DF y Moreno RD.

Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los humanos están crónicamente expuestos a mezclas de disruptores endocrinos (DEs) como los ftalatos y alquilfenoles presentes principalmente en los alimentos. La exposición a DEs se asocia a problemas de fertilidad, pero se desconoce el efecto de las mezclas de DEs sobre el sistema reproductor femenino. Por ello en este trabajo se administró por vía oral la mezcla de ftalatos y alquilfenoles a ratones hembra desde la concepción hasta la adultez. Nuestro objetivo fue determinar el efecto de la exposición crónica a la mezcla de ftalatos y alquilfenoles sobre el ciclo reproductivo en ratón hembra. El inicio de la pubertad se evaluó mediante el día de la apertura vaginal (AV) y primer estro. Además, se evaluó el ciclo estral mediante frotis vaginal. Nuestros resultados muestran que la exposición a 1 mg/Kg (n=3) de la mezcla retrasa AV y el primer estro (indicadores de pubertad) comparado con el tratamiento 10 mg/Kg (n=3) y el vehículo (n=4) ($p < 0.05$). Empero, se observó que ambos tratamientos disminuyeron el número de ciclos estrales comparado con el vehículo ($p < 0.05$). También se observó un aumento del peso relativo del útero y disminución del peso relativo del ovario en ambos tratamientos comparado con el vehículo ($p < 0.05$). Finalmente, por histología observamos un aumento del número de folículos pre-antrales y disminución del número de folículos antrales al comparar ambos tratamientos con el vehículo ($p < 0.05$). Nuestros resultados sugieren que la exposición crónica a la mezcla de ftalatos y alquilfenoles altera el ciclo reproductivo en ratón hembra pudiendo comprometer la fertilidad femenina.

FONDECYT 1150352 (RD.M.), DPG: Becario Doctorado CONICYT

POSTER 18

EI RECEPTOR DE PROGESTERONA DE MEMBRANA (PRGMC1) CAMBIA SU FUNCIONALIDAD DURANTE LA CAPACITACIÓN EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

(Detection and function of membrane progesterone receptor C1 (PRGMC1) rise during capacitation in human sperm).

Milla K¹, Pérez B¹, Pozo P¹, Morales P^{1,2}, Díaz ES^{1,3}.

¹Laboratorio Biología de la Reproducción, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta. ²Instituto Antofagasta. ³CEMER-UA

Los espermatozoides humanos recién eyaculados no tienen la capacidad de fecundar a un ovocito ni de desencadenar reacción acrosómica en presencia de ningún ligando. Para esto, requiere de procesos que involucran cambios a nivel celular y molecular como: aumento en la fluidez de la membrana facilitando la activación y re-distribución de receptores. Dado que el espermatozoide es una célula transcripcionalmente inactiva, debe tener todas las moléculas necesarias para llevar a cabo su tarea, incluyendo los receptores que inducen reacción acrosómica. Por ello, quisimos estudiar el funcionamiento del PRMGC1 durante la capacitación en espermatozoides humanos. Por consiguiente, en alícuotas de espermatozoides móviles, seleccionados por Percoll, no capacitados y capacitados durante 5 y 18 hrs se determinó: 1) el porcentaje del patrón B de capacitación por CTC, 2) la detección del PRMGC1, por inmunofluorescencia y citometría de flujo, 3) el estado acrosomal por PSA-FITC 4) la capacidad del PRMGC1 de unir a su ligando (progesterona) usando la sonda P-BSA-FITC, 5) dimerización por Western blot. Resultados: El porcentaje de detección del PRMGC1 cambia a medida que el espermatozoide se capacita ($P < 0,01$ $N=9$), lo que se relaciona con el aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados inducidos por progesterona. Además, se observa un aumento en el porcentaje de espermatozoides que unen progesterona durante la capacitación ($P < 0,01$ $n=8$) y la dimerización del receptor (25kDa a 50kDa). Los resultados sugieren que el cambio en la funcionalidad del PRMGC1 durante la capacitación, podría adjudicarse a cambios conformacionales del mismo, lo que permite su interacción con el ligando.

Investigación financiada por FONDECYT 1130341 y FONDECYT 1120056.

POSTER 19

EFFECTO DE TNF- α SOBRE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA POR CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES HUMANAS EXPUESTAS A UN AMBIENTE HIPERANDROGÉNICO E HIPERINSULÍNICO

(Effect of TNF- α on glucose uptake by human endometrial stromal cells exposed to hyperinsulinic and hyperandrogenic environment)

Oróstica L¹, Carvajal R^{1,2}, García V^{1,4}, Gabler F³, Romero C^{1,2} y Vega M^{1,2}

¹Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción. ²Dpto. Obstetricia/Ginecología. ³Dpto. Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Hospital Clínico, Universidad de Chile; ⁴Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta, Chile.

Setenta por ciento de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS) presentan obesidad e hiperinsulinemia. TNF- α aumenta en obesidad y tiene un efecto negativo sobre la acción de insulina; además, en endometrios de mujeres-PCOS la señalización de insulina está disminuida, alterando el metabolismo glucosídico del tejido, esencial para su normal funcionamiento. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de TNF- α sobre moléculas involucradas en su vía de señalización y sobre la captación de glucosa por células estromales endometriales humanas bajo condiciones hiperandrogénicas/hiperinsulínicas propias del PCOS. Para esto, las células fueron cultivadas con concentraciones suprafisiológicas de insulina y testosterona (100nM c/u) con y sin TNF- α (100ng/mL) por 24/48-h. En proteínas totales se determinó niveles de: RTNF1, RTNF2, NF κ B (p65), p-IKK α / β e I κ B α , mediante Western-blot. Además, se evaluó la localización subcelular de p65 por Inmunocitoquímica y captación de glucosa mediante incorporación de 2-deoxy-D[1-3H]glucosa. Los resultados muestran que niveles proteicos de RTNF1, RTNF2 y p65 aumentan con TNF- α a las 24-h, independiente de la condición hiperandrogénica/hiperinsulinica. p-IKK α / β no varía con los tratamientos, mientras que I κ B α (inhibe p65) disminuye con TNF- α (p<0,05). El tratamiento con testosterona reduce 75% la captación de glucosa, mientras que con TNF- α o TNF- α /testosterona/insulina disminuye 50% (48-h). Los resultados señalan que TNF- α incrementa su propia actividad al aumentar RTNF1/2 y activar p65, lo que llevaría a una menor capacidad de captar glucosa, sugiriendo un rol negativo para TNF- α sobre la acción de insulina en células endometriales, siendo independiente del efecto negativo de testosterona sobre la captación de glucosa descrito previamente en estas células.

MV: FONDECYT #1130053; LO: Beca CONICYT Doctorado Nacional #21120541

POSTER 20

SINDECAN-4 PRESENTE EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS, PARTICIPA EN LA REACCIÓN ACROSÓMICA (RA) INDUCIDA CON FIBRONECTINA (FN)

(Syndecan-4 is involved in acrosome reaction induced by fibronectin in human sperm)

Barón L^{1,2}, Zapata HP¹, Mondaca N¹, Díaz ES¹, Morales P^{1,2}, **Kong M**¹.

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción. Departamento Biomédico. Facultad Ciencias de la Salud. ²Instituto Antofagasta. Universidad de Antofagasta.

Previamente, describimos que FN/integrina $\alpha 5\beta 1$ induce RA en espermatozoides humanos, gatillando vías de señalización que involucran un aumento en la concentración de calcio intracelular y fosforilación de proteínas en residuos tirosina. Además, se ha descrito que FN posee un dominio de unión a heparina que interactúa con sindecán-4, modulando la adhesión de fibroblastos a la matriz extracelular. En la literatura no hay reportes de la expresión de sindecán-4 en espermatozoides humanos, por lo que nuestro objetivo es determinar su expresión en estas células y establecer si este proteoglicano está involucrado en la RA inducida con FN.

Para determinar la presencia de sindecán-4 se emplearon técnicas de Western blot e inmunofluorescencia. El uso de anticuerpos que bloquean la interacción ligando/receptor fueron utilizados para determinar la participación de sindecán-4 en la RA inducida con FN. El estado acrosomal de los espermatozoides fue evaluado con el método PSA-FITC/Hoechst 33258. Para esto, espermatozoides seleccionados por Percoll fueron mantenidos por 18 horas en medio Tyrode suplementado con BSA y bicarbonato. Durante los últimos 30 minutos, los espermatozoides fueron incubados o no con anticuerpo anti-sindecán-4 y luego estimulados o no con FN (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los resultados preliminares indican que sindecán-4 está presente en los espermatozoides y que el bloqueo de la interacción FN/sindecán-4, disminuye el porcentaje de espermatozoides que experimentan la RA ($p=0,027$). Estos resultados sugieren por primera vez, un papel de sindecán-4 en la RA inducida con FN, lo que aporta en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso.

Fondecyt 1130341 (ED), Fondecyt 1120056 (PM)

POSTER 21

ESPERMATOLOGÍA DEL RÓBALO PATAGÓNICO (*Eleginops maclovinus*) (PERCIFORMES: ELEGINOPIDAE) CRIADO EN FORMA EXPERIMENTAL.

[Spermatology of experimentally farmed patagonian blenny (*eleginops maclovinus*) (perciformes: elegendinopidae)].

Valdebenito I¹, Ubilla A¹, Figueroa E^{1,4}, Sánchez JC², Risopatrón J³ y Farías JG^{3,4}.

¹Escuela de Acuicultura. Universidad Católica de Temuco, Chile. ²Estación Experimental Quillaípe. Fundación Chile. ³CEBIOR. Universidad de la Frontera. ⁴Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco-Chile. ivisler@uct.cl

El róbalo patagónico, es una de las especies ícticas de mayor importancia para los pescadores artesanales de bajos recursos. Debido a la sobrepesca, las poblaciones naturales disminuyen en forma permanente y el desarrollo de su producción en estanques es una necesidad para el país. Los conocimientos sobre la biología reproductiva de esta especie son escasos y sólo se conoce su carácter protándrico. En la presente investigación se estudió la espermatología del róbalo patagónico (*Eleginops maclovinus*); densidad espermática, espermatozoide y su motilidad en diferentes medios de activación (815 mOsm Kg-1, 716 mOsm Kg-1, 590 mOsm Kg-1, 0mOsm Kg-1) con diferentes temperaturas (5°, 10° y 15°C) y pH (5, 7 y 9). Los especímenes utilizados fueron obtenidos de la Estación Experimental Quillaípe de Fundación Chile y fueron mantenidos bajo condiciones estándares de piscicultura. Los resultados preliminares indican que el espermatozoide del róbalo posee forma primitiva, presenta una longitud total de $44,09 \pm 3,36\mu\text{m}$, con una cabeza de $2,15 \pm 0,28\mu\text{m}$ de longitud y de $2,5 \pm 0,31\mu\text{m}$ de ancho. La pieza media posee una extensión de $0,72 \pm 0,12\mu\text{m}$ y su flagelo mide $41,21 \pm 3,21\mu\text{m}$ de longitud. El patrón de movilidad indica que el espermatozoide de róbalo se encuentra inmóvil en plasma seminal y sólo comienza a moverse en un medio hipertónico. El mayor tiempo de motilidad se registró a 10°C en T1 con $245 \pm 39\text{s}$, observándose un pH óptimo de 7.

Investigación financiada por proyecto FONDECYT 1151315

POSTER 22

NIVELES DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL RUNX2 EN CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL

(Levels of transcriptional factor RUNX2 in epithelial ovarian cancer)

García P¹, Oróstica L¹, Vera C¹, Galindo M², Vega M^{1,3}, Romero C.^{1,3}

¹Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva. ²Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ³Depto. Obstetricia/Ginecología, Hospital Clínico, Universidad de Chile.

RUNX2 es un factor transcripcional conocido como el regulador maestro de la osteogénesis en mamíferos. En un contexto patológico, se ha descrito ampliamente su asociación en el desarrollo de osteosarcoma, leucemia, linfoma de células T, cáncer prostático y de mama. Existen escasos antecedentes de RUNX2 en cáncer ovárico epitelial. En el presente trabajo se evaluaron, mediante western blot, los niveles de RUNX2 en tejidos ováricos derivados de pacientes; tejido ovárico normal (OVI; n=3), tumores benignos (TBE; n=5), tumores borderline (TBO; n=3) y tumores malignos, COEs grado I, II y III (n=12), y en líneas celulares de epitelio ovárico normal, HOSE, y cáncer ovárico epitelial de alto grado, A2780 (n=3 en ambas líneas celulares). Los resultados muestran una reducción significativa de RUNX2 en tumores malignos respecto a los tumores borderline ($p < 0,05$). En concordancia, los niveles de RUNX2 se encuentran significativamente disminuidos en la línea celular A2780 comparado con la línea celular HOSE ($p < 0,01$). Al realizar fraccionamiento celular, el análisis de los niveles nucleares y citosólicos de RUNX2 por western blot en ambas líneas celulares, indica que este factor se encuentra fundamentalmente a nivel nuclear. Estos resultados señalan, que en el modelo utilizado de esta investigación, el factor transcripcional RUNX2 pudiese tener un rol en cáncer ovárico epitelial principalmente por su localización a nivel nuclear.

Proyecto Fondecyt N° 1110372

POSTER 23

EXPRESIÓN DE CATEPSINAS D Y L EN RELACIÓN AL GRADO DE FLOTABILIDAD EN HUEVOS Y EMBRIONES DEL PEZ DORADO *Seriola lalandi*

(Cathepsins D and L expression related with buoyancy degree in eggs and embryos of yellow tail kigfish *Seriola lalandi*)

Rodríguez J, Hernández E, De los Reyes M, Palomino J.

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

En especies pelágicas como *S. lalandi*, se ha descrito que la flotabilidad en huevos y embriones es el reflejo de la viabilidad y calidad de éstos. Esta característica, se adquiere con la proteólisis del vitelo provocando la hidratación y generando nutrientes para el embrión. Las enzimas involucradas en este proceso son las catepsinas, por lo que han sido propuestas como biomarcadores de calidad en estas especies. Con el objeto de conocer aspectos moleculares involucrados en la adquisición de flotabilidad en *S. lalandi*, se comparó la expresión de las catepsinas D y L en huevos y embriones con diferente grado de flotabilidad. Para esto, se colectaron muestras flotantes y no flotantes de huevos y embriones en diferentes etapas del desarrollo. La expresión se evaluó en forma relativa mediante RT-qPCR utilizando partidores diseñados por alineamiento de secuencias de otros peces. Los niveles de ARNm de catepsina D en muestras flotantes aumentaron hasta gástrula, disminuyendo a partir de embriones de 12 horas. En no flotantes, los niveles de catepsina D disminuyeron con el desarrollo, pero fueron significativamente mayores a las flotantes en huevos y mórulas, sin diferencias en los demás estadíos. Catepsina L presentó mayor expresión en huevos flotantes en comparación a los no flotantes, pero en los otros estadíos no se presentaron diferencias. Estos resultados permiten proponer a catepsina D como un marcador de mala calidad en huevos y mórulas y por el contrario catepsina L, podría ser considerado un marcador de buena calidad, pero sólo en huevos de esta especie.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 11140639

POSTER 24

LOS TÓXICOS AMBIENTALES ENDOTHALL Y NONILFENOL INDUCEN LA REACCIÓN ACROSÓMICA (RA) VÍA LA PROTEÍNA CINASA A (PKA), EN ESPERMATOZOIDES DE RATÓN.

(The Environmental Toxics Endothall and Nonylphenol, lead to sperm acrosome reaction (AR) through a protein kinase A (PKA) pathway)

Gallardo LM¹, Puga Molina LA², Buffone MG², Moreno RD¹.

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

²Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

La evidencia muestra que los contaminantes ambientales pueden afectar la reproducción, pero aún se desconocen sus efectos en la fecundación. Por ello, seleccionamos dos tóxicos ambientales, Endothall, un pesticida que inhibe la fosfatasa PP2A y nonilfenol, un xenoestrógeno con efecto estrogénico. Nuestro objetivo fue investigar si Endothall y nonilfenol inducen la RA modulando a PKA. Para ello, se recuperaron espermatozoides de ratón con o sin el inhibidor de PKA H89 y se incubaron con Endothall, nonilfenol o progesterona, en condiciones capacitantes (MC) o no capacitantes (MNC). El rol de PKA se estudió, evaluando los niveles de PKA activada (pT197), de sus sustratos fosforilados (pPKAs) y de proteínas fosforiladas en tirosina, mediante Wblott. El porcentaje de RA se cuantificó con la tinción de azul de Comassie, con la sonda Lysotraker y con citometría de flujo empleando ratones transgénicos acro-EGFP. Nuestros resultados de inmunofluorescencia mostraron que PP2A se encuentra en la cola y la región acrosomal del espermatozoide. Endothall y nonilfenol en concentraciones encontradas en el medioambiente y dependiendo del estado de capacitación del espermatozoide, indujeron en un 31% y 19 % la RA, respectivamente, y potenciaron el efecto inductor de progesterona. Por otro lado, H89 previno el efecto inductor de la RA de Endothall y nonilfenol. Finalmente, la incubación de espermatozoides con Endothall y nonilfenol incrementó en 4 y 2,5 veces los niveles de PKA activada (pT197), respectivamente y aumentó los niveles de sustratos de PKA fosforilados. En conclusión estos tóxicos inducen la RA modulando a PKA y podrían alterar la fecundación.

FONDECYT 1150352 (RD.M), LMG: Becaria Doctorado CONICYT

POSTER 25

PRODUCTOS DE SECRECIÓN DE CÉLULAS DE ESTROMA ENDOMETRIAL HUMANO (ESC) INHIBEN LA ANGIOGÉNESIS *IN VITRO* ESTIMULADA POR GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (hCG) DISMINUYENDO LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

(Secretion products from human endometrial stromal cells (ESC) inhibit human chorionic gonadotropin (hCG)-induced angiogenesis *in vitro* by decreasing the migration of endothelial cells).

Valencia C¹, Nazir I¹, Molina I², Sánchez C², Solari G², Tapia-Pizarro A¹.

¹Laboratorio Endocrinología Molecular Reproductiva, Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Universidad de Chile; ²Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La angiogénesis y remodelamiento vascular son procesos cruciales durante la implantación del embrión y el desarrollo placentario. Anteriormente, mostramos que el medio condicionado de ESC (MC) revierte el efecto pro-angiogénico de hCG *in vitro*, aunque no se descarta que sea por la depleción de nutrientes en el MC. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar el efecto de productos de secreción en MC sobre la angiogénesis *in vitro* inducida por hCG y determinar efectos del MC sobre la viabilidad y potencial migratorio de la línea celular derivada de endotelio Eahy.926. Se preparó MC, de los cuales se obtuvo una fracción enriquecida (100X) de moléculas de >3KDa y luego llevada a 1X en medio fresco (MC reconstituido, MCR). Se evaluó el potencial angiogénico *in vitro* de MCR usando un ensayo de angiogénesis 3D usando células Eahy.926 adheridas a microesferas en presencia o ausencia de hCG (100 UI/mL) o VEGF-A. También se evaluó migración por ensayo de herida y viabilidad por MTS en presencia de MC. Los resultados muestran que el MCR revirtió significativamente el efecto pro-angiogénico de hCG (n=3, P<0.05) pero no el inducido por VEGF-A. No se encontraron cambios significativos en la viabilidad sin embargo el potencial migratorio disminuyó significativamente. Concluimos que la inhibición de la angiogénesis *in vitro* específicamente inducida por hCG es revertida por productos de secreción de ESC al menos por una disminución del potencial migratorio de las células endoteliales. Estos resultados sugieren que la angiogénesis endometrial durante la implantación embrionaria no es dirigida por hCG.

FONDECYT 1140614 (A.T.)

POSTER 26

INMUNODETECCIÓN DE TNF α , SU RECEPTOR 2 Y DEL MARCADOR DE MACRÓFAGOS CD68 EN ENDOMETRIOS DE MUJERES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (PCOS) EN FASE SECRETORA MEDIA.

(Immunodetection of TNF α , its receptor type 2 and macrophage marker CD68 in mid secretory phase endometria from women with Polycystic Ovary Syndrome)

Plaza-Parrochia F¹, Carvajal R², Gabler F³, Romero C^{1,2}, Vega M.^{1,2}

¹Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva, ²Dpto. Obstetricia/Ginecología, Hospital Clínico, Universidad de Chile. ³Dpto. Anatomía Patológica, Hospital San Borja Arriarán, Universidad de Chile.

Durante la fase secretora media, el endometrio se hace receptivo al embrión permitiendo su implantación. Para que ello ocurra, en el tejido endometrial existe aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y el reclutamiento de leucocitos (macrófagos). Se desconoce si en endometrio de fase secretora de mujeres con PCOS (PCOSEs), existen alteraciones en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α , sus receptores o los macrófagos, que pudiesen explicar en parte la disminución en la fertilidad descrita en estas mujeres. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los niveles proteicos de TNF α y de su receptor 2 (RTNF2), así como el marcador de macrófagos CD68, en PCOSEs (n=5) y en endometrio de mujeres controles en fase secretora (CEs) (n=5). Las evaluaciones de los niveles proteicos de TNF α y RTNF2 se realizaron por inmunohistoquímica y se analizaron con el programa Image Pro Plus 6.0 y CD68 por número de células positivas/área. En los endometrios patológicos se detectó una disminución del 46% en los niveles de TNF α (CEs: 11517 \pm 5822 vs. PCOSEs: 6259 \pm 4503 UA) y del 68% de RTNF2 (CEs: 9382 \pm 3598 vs. PCOSEs: 2986 \pm 999,8 UA) al compararlos con CEs. No obstante, la cantidad de células positivas para CD68 fue similar en ambos grupos de estudio (CEs: 0,00026 \pm 0,0001 vs. PCOSEs: 0,00027 \pm 0,0001 n° macrófagos/área). La disminución de los niveles de TNF α y su receptor 2 en los endometrios patológicos permite considerar que la falta de esta citoquina generaría una alteración en los procesos de implantación, lo cual explicaría en parte, la falla en la fertilidad de estas mujeres.

FONDECYT 1130053 (M.V.)

POSTER 27

DERMATAN SULFATO INCREMENTA EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS DE RATA

(Dermatan sulfate increases the number of capacitated rat sperm)

Poveda PM, Maldonado-Michea JR, Andrade JC, Fábrega F, Morales P y Zúñiga LM.

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad de Antofagasta.

Instituto Antofagasta. Universidad de Antofagasta.

El apareamiento induce la expresión de *Dermatan sulfate epimerase like* (*Dsel*) en el epitelio oviductal de la rata. Esta enzima convierte el ácido glucurónico en ácido idurónico para la síntesis de Dermatan sulfato (DS) e híbridos Condroitin sulfato (CS)/DS. En bovinos, DS se secreta al fluido oviductal e induce la capacitación espermática *in vitro*. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar si DS induce la capacitación del espermatozoide de rata *in vitro*. Para ello, trabajamos con ratas de la cepa *Sprague Dawley* de 4 meses de edad. Obtuvimos espermatozoides de la cola del epidídimo en medio no capacitante (MNC): Biggers Whitten & Whittingham (BWW) sin bicarbonato ni BSA. Incubamos los espermatozoides en MNC; MNC + DS; Medio capacitante (MC: BWW + 25 mM de bicarbonato y 1.5% BSA); o MC + DS por 0, 1.5, 3 y 5 h. Luego, procesamos los espermatozoides para determinar los niveles de fosforilación en residuos tirosina por western blot (anti-pTyr4G10) y el número de espermatozoides cuyas proteínas intracelulares contienen residuos tirosina fosforilados por citometría de flujo (PE anti-pTyrPY20). Encontramos que la intensidad de varias proteínas fosforiladas en residuos tirosina se incrementa desde las 1.5 h de incubación en MC, alcanzando su máximo a las 5 h. MC + DS (0.25 mg/mL) incrementa significativamente la intensidad de las bandas sólo a las 5 h. MNC + DS incrementa la fosforilación sólo de una banda de 70 KDa a las 5 h. MC + DS incrementa significativamente el porcentaje de espermatozoides capacitados a las 5 h de 44% a 56%. En conclusión, DS incrementa significativamente el número de espermatozoides capacitados de rata.

FONDECYT 11121491 (L.Z.), FONDECYT 1120056 (P.M.).

POSTER 28

RESPUESTA DEL PÁNCREAS Y DE LA INSULINA FETAL A UNA EXPOSICIÓN MATERNA CON TESTOSTERONA

(Response of the fetal pancreas and insulin to a maternal exposure with testosterone)

Carrasco A¹, Recabarren M¹, Sandoval D², Assman D², Sir-Petermann T³, Recabarren SE.¹

¹Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal, Departamento Ciencias Pecuarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

²Departamento de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

³Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) en mujeres gestantes conlleva a la exposición del feto a altos niveles de testosterona (T) que pueden tener impacto en sistemas reguladores del metabolismo, como el páncreas y la insulina, pues se evidencia resistencia a la insulina (RI) en hijos de estas pacientes. En un modelo ovino del SOP, consistente en el tratamiento de madres gestantes con niveles suprafisiológicos de T propionato por 3 meses, estudiamos los niveles plasmáticos de T e insulina en la madre y en sus fetos y sus correlaciones, así como el peso del páncreas fetal a los 120 días de gestación. Los fetos fueron extraídos mediante cesárea y luego eutanasiados bajo estándares bioéticos aprobados por la Universidad. Madres ovinas inyectadas con aceite vegetal fueron consideradas controles y sus respectivos fetos. Las madres tratadas alcanzaron niveles de T superiores a las madres control. En las madres tratadas, los niveles de T se correlacionaron positivamente con los niveles de insulina y de T fetal, a mayor T materna, mayor insulina y T fetal. Adicionalmente, el peso del páncreas fue significativamente menor en los fetos T, aun cuando entre los grupos de fetos y de madres la insulina plasmática a los 120 días de gestación fue similar. Estos resultados podrían sugerir que la exposición materna a T resulta en un defecto en la organogénesis pancreática, forzando al páncreas fetal a producir más insulina, antesala a la RI observada en la vida postnatal en pacientes SOP.

Financiamiento: FONDECYT REGULAR1140433

POSTER 29

MEDICINA DE PRECISIÓN EN REPRODUCCIÓN: ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE CALIDAD ESPERMÁTICA.

(Precision medicine in reproduction: Automated analysis of sperm quality)

Córdova C¹, Palacios C¹, Concha V², Scarella A², Chamy V², Olivero P.¹

¹Laboratorio de Estructura y Función Celular. ²Centro de Reproducción Humana. Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso.

El espermiograma es un examen de exploración cualitativo y de resultados muy variables, debido a que la obtención de los datos se basa en parámetros morfológicos y tinciones de vitalidad dependientes del criterio del operador y que además no contempla la integridad del núcleo como parámetro de calidad. Este examen es determinante para evaluar el factor masculino en la pareja infértil, por lo que incluir mayor sensibilidad, automatización y la evaluación del estado del DNA daría mayor robustez a este examen. La calidad espermática fue evaluada mediante el registro por microscopia de fluorescencia en tiempo real, midiendo la función mitocondrial, permeabilidad de membrana, cinética de movimiento y fragmentación de DNA por citometría de flujo. Nuestros resultados preliminares demuestran que es posible cuantificar la concentración de espermatozoides/ml, viabilidad y caracterizar los patrones de movimiento espermático y categorizarlos según los valores de referencia internacional. El análisis estadístico de ROC indica que la evaluación de la vitalidad posee un modelo óptimo de discriminación diagnóstica y la correlación de Pearson, indica que resultados obtenidos por la metodología de rutina para la vitalidad, espermatozoides/ml y espermatozoides totales, son análogos. Por otra parte la determinación de la fragmentación del DNA, permite clasificar espermatozoides con un bajo o alto grado de fragmentación, siendo este último correlacionable de forma positiva con la motilidad espermática no progresiva. Estos resultados permitirán establecer una orientación clínica más precisa al incorporar la evaluación del DNA, mediciones más sensibles y automatizables al examen.

POSTER 30

EXPRESIÓN DE GENES DE PLURIPOTENCIA Y MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN TEMPRANA EN BLASTOCISTOS BOVINOS PRE-TRATADOS CON SIN-1

(Expression of pluripotency genes and early differentiation markers in bovine blastocyst pre-treated with SIN-1)

Loren P^a, Cheuquemán C^a, Risopatrón J^{a,b}, Arias ME ^{a,c}, Felmer R^{a,d}, Sánchez R^{a,d*}.

^aCentro de Biotecnología de la Reproducción (BIOREN-CEBIOR), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ^bDepartamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ^cDepartamento de Producción Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ^dDepartamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ^eDepartamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

La segregación de las líneas celulares que darán lugar al macizo celular interno (ICM) y el trofoectodermo (TE) es determinada por la expresión de factores de transcripción, OCT4 y CDX2; así como la expresión del factor de pluripotencia, NANOG. La exposición de ovocitos mamíferos por cortos periodos de tiempo a diversos tipos de estrés puede generar tolerancia a este en embriones mamíferos. El objetivo del estudio fue evaluar la expresión de OCT4, NANOG y CDX2 en blastocistos bovinos pre-tratados con un inductor de estrés oxidativo y nitrosativo, 3-morfolinosisidnonimina (SIN-1). Ovocitos bovinos inmaduros fueron madurados durante 22-23 horas. Posteriormente, los ovocitos maduros fueron incubados con SIN-1 (Control, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M SIN-1) por 1 hora. La co-incubación de los gametos fue realizada durante 18 horas. Los presuntos cigotos fueron cultivados hasta el día 7. Los blastocistos bovinos expandidos fueron utilizados para el análisis de expresión génica relativa mediante RT-qPCR, observándose una regulación positiva de los niveles de expresión relativa de OCT4, NANOG y CDX2 en todos los tratamientos comparado con el grupo control, aunque esta sobreexpresión no es significativa. En conclusión, es posible generar embriones tolerantes a estrés oxidativo y nitrosativo, sin la alteración del desarrollo embrionario y manteniendo una adecuada segregación de las líneas celulares del ICM y TE.

Proyecto Fondecyt 1130888, Conicyt, Gobierno de Chile.

Beca de Doctorado Nacional, Conicyt, Gobierno de Chile.

POSTER 31

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A TESTOSTERONA EN EL TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO E ISLOTES PANCREÁTICOS EN OVINOS FETALES

Sandoval D², Recabarren M¹, Carrasco A², Montalban, A², Rojas D², Assman D², Sir-Petermann T³, Recabarren SE.¹

¹Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal, Departamento Ciencias Pecuarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

²Departamento de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

³Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

El modelo ovino de reprogramación fetal, por exposición prenatal a testosterona, ha establecido que los pesos corporales de fetos y animales peripuberales de ambos sexos son similares. Sin embargo, el diámetro de las fibras en hembras-T peripuberales presentan un menor tamaño que en machos-T y hembras-C de la misma etapa. Considerando que el músculo esquelético, es demandante de glucosa y que las células beta producen insulina, se establece una potencial dependencia directa. En este sentido, el propósito del estudio, fue evaluar el efecto de la T sobre las características morfológicas del músculo esquelético y páncreas endocrino en fetos ovinos (120 dg). Para ello se evaluó en biopsias de *gluteus superficialis* número, diámetro y fenotipo fibrilar en hembras-C (n=8) y hembras-T (n=3). Adicionalmente, se evaluó la estructura histológica de los islotes pancreáticos. Los resultados indican que en fetos hembras C y T, el número total de fibras musculares no presentó diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$). Adicionalmente, se determinó que el fenotipo fibrilar predominante en ambos grupos, corresponde al tipo I con una CSA de $27,79 \pm 2,96$ y $23,88 \pm 2,38$ respectivamente. A nivel pancreático, se determinó que el área de los islotes (μm^2) en hembras C y T no presentó diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$). Sin embargo, se determinó que la proporción de islotes de tamaño menor fue mayor en hembras-T ($P<0,05$). Estos resultados sugieren que la exposición prenatal a T, podría tener un efecto negativo en la organización estructural de los islotes y por ende de su funcionamiento, forzando a las células beta fetales a producir más insulina.

Financiamiento: FONDECYT REGULAR 1140433 (S.R.) y FISENLAB (UdeC)

POSTER 32

EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE RECEPTORES DE ANHIDRASA CARBÓNICA (AC) Y ÁCIDO RETINOICO (AR) EN BIOPSIAS TESTICULARES DE PACIENTES CON SÍNDROME DE KLINEFELTER

(Immunohistochemical expression of carbonic anhydrase (CA) and retinoic acid (RA) receptors in testicular biopsies in patients with Klinefelter syndrome)

Espinoza-Navarro O¹, Rodríguez H².

¹Departamento de Biología, Universidad de Tarapacá. ²Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Síndrome de Klinefelter es una alteración cromosómica (un cromosoma X extra en los varones), se caracteriza por ginecomastia, reducción en el número de espermatozoides y pequeño tamaño testicular. Alteraciones en las concentraciones de anhidrasa carbónica (AC) y ácido retinoico (AR) en testículo humano podrían ser un importante factor de infertilidad masculina en estos pacientes. Se pretende demostrar la presencia de AC y receptores de AR en el testículo de pacientes con Síndrome de Klinefelter a través de inmunohistoquímica.

Biopsias testiculares humanas obtenidas de la Escuela de Medicina, Sede Sur, Universidad de Chile, fueron tratadas para inmunohistoquímica anti AC y anti RA. Células marcadas positivamente se observan con núcleo de color rojo. Se evaluaron los compartimentos tubular, peritubular e intersticial. Los resultados muestran un epitelio seminífero alterado con espermatogénesis incompleta, ausencia de células germinales y áreas de vacuolización. La inmunohistoquímica para receptores de AC permite demostrar su detección diferencial en el compartimiento intersticial. La detección de receptores para AR se focaliza mayormente en los compartimentos tubulares (células de Sertoli) y peritubulares. Esta condición metabólica diferente y acidófila podría ser una de las causas del daño de la espermatogénesis en varones con diagnóstico confirmado de Klinefelter, sumado a la probable disfunción variable de las células de Leydig, como característica del Síndrome de Klinefelter, causante de la infertilidad. Por lo tanto, en el testículo con diagnóstico de Klinefelter existe una espermatogénesis reducida y variable según los compartimentos histológicos. También se observa niveles diferentes y variables en el análisis de inmunohistoquímica anti AC y anti RA.

PROYECTO MAYOR UTA Nº 4712-13

POSTER 33

EL ESTRÉS SIMPÁTICO APLICADO DURANTE LA GESTACIÓN EN RATAS MODIFICA EL TRANSPORTADOR PLACENTARIO DE NORADRENALINA. CAMBIOS DEPENDIENTE DE GÉNERO.

(Sympathetic stress during pregnancy in rats changes the placental noradrenaline transporter. Sex-dependent changes in the offsprings)

Piquer B¹, Fonseca JL¹, Lara HE¹

¹Laboratorio de Neurobioquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Existen etapas del desarrollo particularmente sensibles a situaciones de estrés, que modifican el ambiente fetal y programan su desarrollo postnatal. Durante el embarazo, la placenta juega un rol esencial en mantener bajas concentraciones de monoaminas en la circulación uteroplacental, algo que en el caso de la noradrenalina (NA) está mediado por el transportador de NA (NET). Estudiamos el efecto que produce el estrés prenatal por frío sobre la noradrenalina plasmática en ratas gestantes y sus consecuencias sobre los NET placentarios.

Ratas Sprague-Dawley preñadas fueron expuestas a estrés por frío (4°C/3h/día) durante toda la preñez y se evaluó el efecto en la descendencia. Se pesaron las crías (15 y 19 días de gestación) y sus placentas, se determinó el NET placentarios (incorporación de ³H-NA y western blot) y NA plasmática en ratas gestantes.

El estrés gestacional aumenta las concentraciones de NA plasmática en ratas gestantes y disminuye la incorporación de ³H-NA por los NET. Este efecto es diferente de acuerdo al género: en las crías hembras produce un aumento de la proteína del NET en cambio en los machos produce una disminución, es decir las crías están expuestas a diferentes concentraciones de NA y esto podría explicar el aumento en el peso de las crías y de sus placentas al compararlas con los controles. La diferencia en la sensibilidad a la NA de acuerdo al género podría ser el resultado de esta exposición.

Proyecto FONDECYT 1090036 (H.E.L), Beca Doctorado Nacional Conicyt 21120077 (B.P)

POSTER 34

LOS GENES SOX2, KLF4 Y MYC DE LAS CÉLULAS TRONCALES TUMORALES REGULAN LA RESISTENCIA A DROGAS Y LA METÁSTASIS EN CÁNCER PROSTÁTICO

(SOX2, KLF4 and MYC genes of cancer stem cells regulate drug resistance and metastasis in prostate cancer).

Valenzuela R., Cifuentes F, Miyaoka F, Castillo V, Contreras HR, y Castellón EA.

Laboratorio de Andrología Celular y Molecular. Programa de Fisiología y Biofísica. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

Existe evidencia que las células troncales tumorales (CSCs) del cáncer prostático (CaP) serían responsables de la resistencia a drogas y metástasis. El bloqueo selectivo de genes de pluripotencialidad podría revertir algunas características de las CSCs. El objetivo de este trabajo fue evaluar la inhibición selectiva de los genes de troncalidad SOX2, KLF4 y MYC sobre la resistencia a drogas y la capacidad metastásica de las CSCs de CaP.

Se obtuvo cultivos de esferas (prostatósferas) a partir de muestras tumorales humanas, las cuales se caracterizaron molecular y funcionalmente. Mediante qPCR se determinó la expresión de genes de troncalidad seleccionándose para su silenciamiento los genes SOX2, KLF4 y MYC usando shRNAs específicos. Se evaluaron, mediante ensayos funcionales in vitro, la resistencia a drogas de las CSCs silenciadas y su capacidad metastásica en un modelo ortotópico de CaP en ratones NOD/SCID. Los protocolos humanos y animales fueron aprobados por los respectivos comités de ética institucionales.

Las prostatósferas presentaron características génicas y funcionales de troncalidad. SOX2, KLF4 y MYC mostraron alta sobreexpresión (>50%). El silenciamiento de estos genes (>60%) resultaron en sensibilización de las CSCs a Topotecan (>40%). In vivo, el silenciamiento de SOX2 resultó en disminución del crecimiento tumoral (50%) e inhibición de la metástasis.

Se concluye que los genes de troncalidad analizados en este trabajo son relevantes para la mantención de la resistencia a drogas de las CSCs. El gen SOX2 sería determinante en la capacidad metastásica y puede ser considerado como un blanco terapéutico interesante en el CaP.

Financiamiento: Proyectos Fondecyt 1140417 (EAC) y 1151214 (HRC).

ÍNDICE DE AUTORES

- Acuña R, 66
Aguila L, 63
Aguirre P, 65
Alvarado A, 65
Alvarenga M, 50
Álvarez D, 52
Ambrosetti V, 52
Andrade JC, 73, 87
Angulo C, 22
Araya D, 32
Argandoña F, 42, 49, 58
Arias ME, 61, 63, 90
Aspee K, 51, 68
Assman D, 88, 91
Astudillo I, 51, 68
Balmaceda J, 28
Barón L, 74, 76, 80
Barrientos S, 49, 58
Becerra V, 32
Berkowitz L, 55
Boguen R, 48
Bravo M.L, 72
Bravo S, 38
Buffone MG, 84
Busso D, 30, 55, 62
Cárdenas M, 75
Carrasco A, 88, 91
Carvajal R, 79, 86
Castellón EA, 69, 94
Castillo V, 94
Castro A, 42
Castro M, 22
Cautivo K, 62
Cereceda K, 22
Chamy V, 89
Cheuquemán C, 45, 90
Chrzanowsky D, 69
Cifuentes F, 94
Concha F, 67
Concha I, 22
Concha V, 89
Contreras HR, 69, 94
Córdova C, 89
Cortegana W, 49
Covarrubias A, 22
Crisosto N, 67
Cruz G, 52
Cruz-Fernandes L, 66
Cubillos S, 72
Cuello M.A, 72
Cuevas F, 32, 54
Darszon A, 18
De Grava Kempinas W, 21
De los Reyes M, 47, 51, 68, 83
Delgado A, 61
Devoto L, 49, 58, 75
Díaz E.S, 57, 65, 70, 74, 78, 80
Díaz MC, 66
Díaz P, 43, 56
Ebensperger M, 42
Echiburú B, 67
Erices R, 72
Espinoza-Navarro O, 92
Evans G, 28
Fábrega F, 73, 87
Farfán N, 69
Farías J.G, 44, 71, 81
Felmer R, 61, 63, 90
Fernández T, 47
Fernandois D, 52, 54
Figueroa E, 44, 71, 81
Flórez M, 42
Fonseca J.L, 93
Gabler F, 79, 86
Galindo M, 82
Gallardo LM, 84
García de Herreros A, 69
García P, 82
García V, 31, 79
Godoy A, 75
González P, 72
Gonzalez R, 59

Gripe S, 65
 Guajardo E, 43, 56
 Guerra M, 52
 Hartley R, 50
 Henríquez S, 75
 Hernández E, 83
 Hidalgo I, 65
 Huanca W, 40
 Johnson M.C, 59
 Kato S, 72
 Kohen P, 49, 58, 75
 Kong M, 80
 Lara H.E, 35, 54, 64, 93
 Lardone MC, 42
 Las Heras M, 64
 Lonis M. A, 70
 López C, 22
 Loren P, 90
 Maldonado R, 22
 Maldonado-Michea JR, 73, 87
 Maliqueo M, 67
 Mancilla H, 22
 Marquez M, 72
 Mayerhofer A, 35
 Mena D, 43, 56
 Merino O, 44
 Milla K, 78
 Miyaoka F, 94
 Molina I, 85
 Molina P, 62
 Mondaca N, 80
 Montalban A, 91
 Morales P, 65, 70, 73, 74, 76, 78, 80, 87
 Moreno RD, 18, 66, 77, 84
 Muñoz A, 42
 Na A, 54
 Nazir I, 85
 Okamura L, 32
 Olgúin S, 52
 Olivero P, 89
 Orellana-Serradell O, 69
 Orge F, 75
 Orihuela PA, 43, 56
 Oróstica L, 79, 82
 Ortiz M, 49, 58
 Owen G.I, 72, 76
 Palacios C, 89
 Palma C, 42
 Palomino J, 47, 51, 66, 68, 83
 Palomino WA, 49, 58
 Paradowska-Dogan A, 50
 Paredes A, 35, 54, 64
 Patiño-García DF, 77
 Paz E, 38
 Peralta OA, 32
 Pérez B, 57, 65, 78
 Pérez-Bravo F, 67
 Piottante A, 42
 Piquer B, 93
 Plaza-Parrochia F, 86
 Poveda PM, 73, 87
 Pozo P, 70, 78
 Puga Molina LA, 84
 Quiroz A, 62
 Ramírez C, 72
 Ramírez LA, 52
 Ramirez-Reveco A, 50
 Recabarren M, 88, 91
 Recabarren SE, 67, 88, 91
 Retamales R, 75
 Reyes A, 52
 Rigotti A, 30, 62
 Risopatrón J, 44, 45, 71, 81, 90
 Rodríguez H, 92
 Rodríguez J, 83
 Rojas D, 91
 Romero C, 36, 79, 82, 86
 Romero F, 50
 Salas C, 50
 Salas F, 55
 Sánchez C, 85
 Sánchez J.C, 81
 Sánchez R, 27, 45, 61, 90
 Sandoval D, 67, 88, 91
 Santander N, 30, 55
 Scarella A, 89

Schneider A, 55
Sepúlveda N, 38
Signorelli J, 57, 65
Sir-Petermann T, 34, 67, 88, 91
Slebe JC, 22
Solari G, 85
Sotomayor-Zárate R, 52
Suarez S, 20
Sutovsky P, 23
Tapia-Pizarro A, 59, 85
Tomes CN, 18
Torres Fuentes JL, 18
Treulen F, 48
Treviño CL, 18
Ubilla A, 44, 81
Unda-Sanzana E, 24
Uribe P, 48
Urria J, 35
Valdebenito I, 39, 44, 71, 81
Valencia C, 85
Valenzuela R, 94
Vander Stelt K, 22
Vantman N, 67
Vargas T, 63
Vega M, 79, 82, 86
Velásquez EV 76
Vera C, 82
Villarroel-Espíndola F, 22
Villegas JV, 48
Zambrano F, 63
Zapata HP, 74, 80
Zavaleta K, 59
Zúñiga LM, 73, 76, 87

