

# Congreso Latino Americano Conjunto de Reproducción

Santiago de Chile 12 al 14 de septiembre  
Hotel Plaza El Bosque Av. Manquehue N° 656, Las Condes



## XXVI REUNIÓN BIENAL ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE INVESTIGADORES EN REPRODUCCIÓN HUMANA (ALIRH) XXX REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO (SCHRD) XVII REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD DE ANDROLOGÍA Y GAMETOLOGÍA DE CHILE (SAGACH)

# LIBRO DE RESUMENES

Hotel Plaza El Bosque, 12 al 14 de Septiembre de 2019, Santiago, Chile.



## RESUMENES

### Simposium

---

#### **GnIH: un neuropéptido inhibidor y su participación en el desarrollo del fenotipo de ovario poliquístico en la rata.**

Dra. Valentina Squicciarini R.

Centro de Estudios Neuroquímicos para Enfermedades Endocrinas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es la patología ovárica más frecuente en mujeres en edad fértil. Su origen podría explicarse por un aumento en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), provocando cambios en la función ovárica. En humano y en rata se ha descrito un aumento en la actividad simpática relacionada con el síndrome. Otro neuropéptido que regula a GnRH, es la hormona inhibidora de gonadotropina (GnIH). GnIH inhibe la producción de GnRH en el hipotálamo. Se ha determinado la presencia de su receptor (NPFF1, homólogo en mamíferos) y de RFRP-3 (homólogo en mamíferos de GnIH) en el ovario y – aunque se conoce poco de su funcionamiento podrían participar como reguladores de la función ovárica. En esta presentación discutiremos si RFRP-3 es un componente local en el desarrollo y mantención de SOP en un modelo de rata expuesta a estrés para producir una sobre activación simpática que regula el desarrollo del fenotipo de SOP.

Al estudiar el efecto sobre la estereoidogénesis ovárica, observamos que RFRP-3 disminuye la producción de testosterona y progesterona inducida por LH/hCG. Observamos también, que el estrés simpático para desarrollar el fenotipo SOP disminuye ambos el péptido y su receptor tanto en el hipotálamo como en ovario. Finalmente estudiamos si el tratamiento intraovárico in vivo con RFRP-3 por 28 días tiene efecto en la dinámica folicular que ha sido modificada por el estrés simpático, observando una disminución en la formación de quistes foliculares y un aumento en los folículos secundarios y antrales.

Estos resultados muestran que RFRP-3 tiene una acción local en el ovario y que podría participar como un péptido protector para el desarrollo del fenotipo de ovario poliquístico en la rata.

Proyecto REDES CONICYT 140061 Y FONDECYT: N°1130049

#### **ENZYMES INVOLVED IN THE BIOSYNTHESIS OF SPHINGOLIPIDS WITH VERY-LONG-CHAIN PUFA CONCUR WITH MALE GERM CELL DIFFERENTIATION.**

Oresti GM1, Santiago Valtierra FX1, Reyes JG2 and Aveldaño MI1

1INIBIBB, CONICET-UNS y Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, Bahía Blanca, Argentina and 2Instituto de Química, PUCV, Valparaíso, Chile. E-mail: gmoresti@criba.edu.ar.

The sphingolipids sphingomyelin (SM) and ceramide (Cer), of male rodent germ cells (spermatocytes, spermatids) and spermatozoa contain very-long-chain (C28-C32) polyenoic fatty acids (VLCPUFA) in non-hydroxy (n-V) and 2-hydroxy forms (h-V) not present in Sertoli cells. During postnatal development, SM and Cer species with n-V appear in testes concomitantly with pachytene spermatocytes and those with h-V with spermatids. Both are able to biosynthesize their own sphingolipids, the former more actively than the latter. The biosynthesis of n-V requires elongation of PUFA (20:4n-6, 22:5n-6) by elongation of very-long-chain fatty acid (Elovl) proteins, while that of h-V requires a fatty acid 2-hydroxylase (Fa2h). Elovl5 and Elovl2, coding for enzymes responsible for PUFA biosynthesis, and Elovl4, in turn responsible for the formation of PUFA longer than C26, are actively expressed in germ cells. The Elovl4 protein is exclusively expressed in germ cells in a stage-dependent manner, spermatocytes displaying the highest Elovl4 protein levels and enzymatic activity. Along with high proportion of h-V Cer and h-V SM species, the Fa2h protein is mainly concentrated in late spermatids, in the step of spermiogenesis in which they elongate and their heads change shape. Consistently, spermatocytes express the highest levels of ceramide synthase 3, required for the N-acylation of sphingosine with a VLCPUFA, while spermatids express the highest levels of SM synthase 2. Irrespective of the maturation stage, the small raft-like domains of the germ cell plasma membrane contain species of SM and Cer with saturated fatty acids, while those containing n-V and h-V abound in the large non-raft areas. These species, with unique physico-chemical properties, could play a structural role facilitating the germ cell shape changes associated with the progress of

spermatogenesis. If released from such species, free n-V and h-V could be involved in germ cell differentiation as potential precursors of uncommon elovanoic-like bioactive derivatives. Supported by SGCyT UNS-PGI-UNS [24/B272 to GMO and 24/B218 to MIA], FONCyT . [PICT2017-2535 to GMO] and Fondecyt 1140758 to JGR.

#### **APOPTOSIS OF MALE GERM CELLS INDUCED BY XENOESTROGENS: ROLE OF ARACHIDONIC ACID IN THE ADAM17 ACTIVATION.**

Urriola-Muñoz P1,2, Moreno RD2 and Reyes JG1.

1Instituto de Química, Facultad de Ciencias, PUCV, Valparaíso, Chile.

2Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, PUC, Santiago, Chile.

Germ cell apoptosis induced by the xenoestrogens Bisphenol-A (BPA) and 4-Nonylphenol (NP) depends on the transmembrane metalloproteases, ADAM17. These xenoestrogens also promote the release of Arachidonic Acid (AA) from Sertoli cells, which in turn induces apoptosis of male germ cells. However, we do not know whether these events are part of the same mechanism.

Our aim was to determine whether AA induces germ cell apoptosis by activating ADAM17 induced by BPA or NP. We determined that AA induces the activation of ADAM17 in primary spermatocytes cultures and the cell lines GC-1 and GC-2. AA induces an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and the activation of PKC $\alpha/\beta$  that leads the activation of ADAM17. BPA and NP induce the release of AA in primary cultures of Sertoli cells and TM4 cell lines (mouse Sertoli cells) but not in primary cultures of spermatocytes or GC-1 and GC-2 cell lines. Furthermore, when using a pharmacological inhibitor of PLA2, a decrease in BPA and NP-induced apoptosis was observed in cultures of mouse seminiferous tubules. We observed the activation of ADAM17 in GC-1 and GC-2 cell lines using a conditioned medium from TM4 cells (Sertoli) previously treated with BPA or NP, and not with the direct treatment with these compounds. Finally, we observed a decrease in AA-induced apoptosis in primary cultures of ADAM17-KO spermatocytes when compared to wild-type spermatocytes.

In conclusion, we determined that the AA from Sertoli cells is involved in the activation of ADAM17 induced by BPA and NP, which lead to germ cell apoptosis. Funding FONDECYT N° 3160273.

#### **Comunicaciones Libres**

---

#### **EFEECTO DE GTPASAS RHO BACTERIANAS EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS**

(Effect of bacterial Rho GTPase on human spermatozoa)

Boguen R1, González D2, Lefillanca K2, Gaepi P2, Uribe P3,4, Villegas JV3,5

1Departamento de Procesos Diagnósticos y Evaluación, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica de Temuco, Temuco Chile.

2Carrera de Tecnología Médica, Universidad de la Frontera, Temuco Chile.

3Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco Chile.

4Centro de Excelencia de Medicina Traslacional (CEMT), Universidad de La Frontera, Temuco Chile.

5Centro de Excelencia de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR), Universidad de La Frontera, Temuco Chile.

La presencia de bacterias en el semen se asocia con deterioro de la calidad espermática. Durante su patogenia ciertas toxinas bacterianas regulan la actividad de GTPasas Rho, las que se relacionan con distribución de actina del citoesqueleto y la función en células somáticas, sin embargo el efecto de esas GTPasas en espermatozoides humanos no ha sido estudiado. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la modulación de GTPasas Rho bacterianas en la función de espermatozoides humanos. Espermatozoides humanos seleccionados se incubaron con activador e inhibidor de GTPasas Rho adquiridos comercialmente siendo producidos a partir de bacterias. También se incluyó un control basal de espermatozoides libre de moduladores. En primer lugar se incubaron los espermatozoides por 2 horas a 37 °C para lograr un efecto moderado Rho, evaluando motilidad progresiva por medio de CASA, daño en membrana plasmática y producción de especies reactivas del oxígeno intracelular (ROSi) por medio de citometría de flujo (CMF). En un segundo experimento los espermatozoides se incubaron por 4 horas a 37 °C para lograr un efecto robusto Rho, usando solo el activador de GTPasas Rho para evaluar sumado a lo anterior, el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) por CMF y la polimerización de actina usando microscopia de fluorescencia. A las 2 horas de incubación, la concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  del inhibidor de GTPasas Rho redujo significativamente la motilidad progresiva, sin alterar otras variables. El

activador no produjo cambios significativos a las 2 horas, sin embargo al extender la incubación a 4 horas, se observa una disminución significativa con 1 µg/ml de activador además de alterar el  $\Delta\Psi_m$ , ROSi y la polimerización de actina. Con estos resultados se infiere que la modulación de GTPasas Rho podría ser un mecanismo por el cual algunas bacterias alterarían la función de espermatozoides humanos causando infertilidad. Agradecimientos a los proyectos FEQUIP2018-PL-06 y VIPUCT2018PF-RB-05 de la Universidad Católica de Temuco.

### **EXPRESIÓN DE RECEPTORES OVIDUCTALES DE PROGESTERONA A TRAVÉS DE CICLO ESTRAL EN LA PERRA.** (Progesterone oviductal receptors expression throughout bitch estral cycle).

Flores J, Palomino J, De los Reyes M.

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

La hembra canina presenta características reproductivas que la diferencian del resto de los mamíferos. Entre éstas se pueden mencionar el aumento de los niveles plasmáticos de Progesterona durante el estro, antes de la ovulación, debido a una luteinización folicular preovulatoria y la ovulación de un ovocito inmaduro detenido en Profase I, que reanuda la meiosis en el oviducto entre 48 y 72 horas después de la ovulación. Con el fin de entender la participación de esta hormona en la función del oviducto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la dinámica de expresión de su receptor (RP) en las células oviductales a través del ciclo reproductivo de la perra. Para esto, se recolectaron células de oviductos de perras que se encontraban en diferentes etapas del ciclo estral (tres de cada etapa: anestro, proestro, estro y diestro) para la extracción del RNA total y evaluación de la expresión relativa del RP mediante RT-qPCR. Los resultados muestran un aumento ( $p < 0,05$ ) en los niveles de mRNA del RP desde la etapa de anestro hasta el diestro (A=1,00; P=1,90; E=2,75; D=4,27), que correspondió a la etapa del ciclo en donde se observó la mayor ( $p < 0,05$ ) expresión de este receptor. Los niveles de expresión de RP en estro fueron mayores a la etapa de anestro, pero no se diferenciaron del nivel observado en proestro. Estos resultados indican que la expresión del RP en las células oviductales de la perra presenta variaciones a través del ciclo que concuerdan con los niveles plasmáticos de Progesterona descritos en esta especie, lo cual sugiere un importante rol de esta hormona en la función de las células oviductales y los procesos particulares que ocurren en el oviducto canino, como lo es la maduración final del ovocito.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1171670

### **EL ESTRÉS OXIDATIVO ACTIVA LA AUTOFAGIA EN ESPERMATOZOIDEOS HUMANOS**

(Oxidative stress activates autophagy in human spermatozoa)

Meriño J1, Zambrano F1,2, Schulz M1,2 and Sánchez R1,2, Pezo F1, Uribe P1,3\*.

Centro de Excelencia en Medicina Traslacional (CEMT - BIOREN)(1), Departamento de Ciencias Preclínicas(2), Departamento de Medicina Interna(3), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Correspondencia a autor: [pamela.uribe@ufrontera.cl](mailto:pamela.uribe@ufrontera.cl)

La autofagia es una vía regulada de degradación lisosómica que contribuye a mantener o restaurar la homeostasis celular, siendo un mecanismo de respuesta a estrés, que está presente en los espermatozoides humanos. El estrés oxidativo es una causa importante de alteración de la función espermática y el desarrollo de infertilidad masculina, sin embargo, se desconoce su capacidad para activar la maquinaria autofágica en los espermatozoides humanos. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta autofágica en espermatozoides humanos expuestos a estrés oxidativo. Espermatozoides de donantes normozoospermicos fueron expuestos por separado a ionomicina y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para inducir estrés oxidativo. Se incluyó un control sin tratamiento. La generación de estrés oxidativo se determinó mediante el análisis de la viabilidad, la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), el potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la motilidad. Luego, se analizaron las proteínas involucradas en la autofagia LC3-I, LC3II, ATG5, ATG16, pAMPK y pS6quinasa. Los resultados mostraron que la exposición a ionomicina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promueve la generación de estrés oxidativo caracterizado por una mayor producción de EROs y una menor viabilidad, PMM y motilidad. Estas alteraciones se acompañaron de una disminución en LC3-I. Ionomicina también causó una disminución en LC3-II, ATG5 y ATG16. Los niveles de pAMPK y pS6kinase no se vieron afectados. En conclusión, los espermatozoides humanos sometidos a estrés oxidativo activan una respuesta autofágica. Aunque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causó una disminución en las proteínas LC3-I, no se observaron cambios en otras proteínas relacionadas con la autofagia, lo que sugiere que la LC3-I es un biomarcador más sensible de la activación de la autofagia en espermatozoides humanos y podría ser utilizada para mejorar el diagnóstico de pacientes que presentan infertilidad asociada a estrés oxidativo.

Financiado por FONDECYT 11170758 y PAI-CONICYT 79160030

**DISMINUCIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN UN PERÍODO DE 10 AÑOS: ESTUDIO RETROSPECTIVO EN 2854 PACIENTES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MATERNO INFANTIL.** (Decrease of sperm motility over a 10 year period: retrospective study in 2854 patients of the institute of maternal and child research.)

Lardone MC1, Flórez M1, Madariaga M1, Venegas M2, Villar R2, Smith R1, Castro A1.

1Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 2Estudiante de la carrera de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**Introducción:** Los parámetros de la calidad seminal son la primera aproximación para el estudio de la fertilidad masculina y han mostrado una paulatina disminución de la calidad seminal en las últimas décadas. Debido a la escasa información del patrón seminal en nuestra población, nos propusimos describir y analizar temporalmente la calidad seminal de sujetos infértiles. **Sujetos y métodos:** Se analizaron datos de 2913 espermogramas, realizados en la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva del Instituto de Investigaciones Materno Infantil de pacientes (n=2854) que consultaron por infertilidad entre los años 2009 a 2019. Las muestras de semen fueron obtenidas por masturbación con 2-6 días de abstinencia eyaculatoria. Los espermogramas realizados durante 2009 a 2013 siguieron las guías para el análisis del semen de la OMS-1999. Desde el año 2014, el análisis seminal se realizó siguiendo las guías OMS-2010. **Resultados:** La mediana (percentil 5-95) de la edad fue de 34 (23-46) años. De acuerdo a los valores OMS-2010, 4,9% de los pacientes presentaron azoospermia, 13,4% oligozoospermia y 14% astenozoospermia. La teratozoospermia se observó en el 40,5% de los pacientes según criterio OMS correspondiente. Agrupando los resultados en 5 periodos bianuales, el análisis mostró un incremento de la astenozoospermia (12% vs.16%) y disminución de la oligozoospermia (17% vs. 11%) entre los periodos 2009-2010 (n=430) y 2017-2019 (n=633) (P<0,05 Chi-cuadrado). En concordancia, la motilidad progresiva (66% [12-81] vs. 54% [15-74]) disminuyó entre estos mismos periodos (P<0,001, Mann-Whitney). El modelo de regresión lineal corregido por edad confirma la tendencia temporal anual de la disminución de la motilidad progresiva (beta = -1,9; P<0,001). **Conclusión:** Nuestros resultados sugieren un deterioro de la motilidad progresiva en la población analizada en los últimos 10 años independiente de la variación del recuento espermático. Estudios más amplios y multicéntricos permitirán confirmar estos hallazgos e identificar posibles factores ambientales asociados.

**GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA HIPERGLICOSILADA (hCG-H) AUMENTA EL POTENCIAL ADHESIVO IN VITRO DE CÉLULAS ISHIKAWA A ESFEROIDES DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS** (Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin increases the adhesive potential of Ishikawa cells to trophoblastic spheroids in-vitro)

Garcés L.M.1, Alfaro C. 1, Koistinen H. 2, Tapia-Pizarro A. 1.

1Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2Department of Clinical Chemistry Medicum, Faculty of Medicine, University of Helsinki.

La implantación embrionaria comienza con la aposición del blastocisto sobre el endometrio materno, seguida de la unión al epitelio de la superficie endometrial. hCG-H es una isoforma hiperglicosilada de la hCG que sólo puede ser detectada en el medio de embriones cultivados in vitro después del hatching y es la isoforma más abundante durante el primer trimestre, lo que sugiere que esta hormona podría tener un papel modulador sobre el endometrio durante la implantación del blastocisto. Sin embargo, su posible efecto paracrino sobre la receptividad del epitelio endometrial no ha sido estudiado. El objetivo de este trabajo fue determinar el rol de hCG-H sobre la adhesión del epitelio endometrial usando un modelo de implantación in vitro. Para ello se utilizó la línea celular Ishikawa como modelo de epitelio endometrial y esferoides la línea de trofoblástica HTR8/SVneo como modelo de blastocisto. Los esferoides fueron preparados a través del método de gota colgante. Células Ishikawa cultivadas en monocapa fueron incubadas con vehículo o 10 UI/mL de hCG enriquecida en 21% o 89% con hCG-H por 24 horas. Posteriormente se reemplazó el medio de cultivo y se agregó 10 esferoides por condición en duplicado y luego de 2 horas se evaluó la proporción de esferoides adheridos a las células Ishikawa a través de un microscopio invertido. La proporción de esferoides adheridos en la condición con vehículo fue de un 45%. Los tratamientos con hCG-H de 21% y 89% aumentaron la adhesión en un 22% y 67% respectivamente en relación al vehículo (p<0,05 para hCG-H 89%). Estos resultados sugieren que hCG-H gatilla mecanismos de señalización en las

células endometriales que facilitan la adhesión del embrión el cual podría ocurrir por una modulación en el repertorio de moléculas de superficie involucradas en la adhesión celular.

### **ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN ANDROLOGIA EN FUNCION DEL TIEMPO DE PRODUCCION DE EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS ATOMIZADOS DE MACA ROJA Y MACA NEGRA (*Lepidium meyenii*)**

Gasco ME1,2, Zorrilla I1, Arbañil K1, Gonzales GF1,2.

1Laboratorio de Endocrinología y Reproducción. Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) y Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2Instituto de Investigaciones de la Altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

**Introducción.** La maca es reconocida en la actualidad en muchos países del mundo por sus propiedades funcionales en la función reproductiva. Según los cronistas españoles los hipocótilos de maca pueden ser consumidos luego de la cosecha y de ser deshidratados hasta por 7 años sin perder sus propiedades.

**Objetivos.** Evaluar las propiedades biológicas de diferentes años de producción de maca roja (*Lepidium meyenii*) contra la hiperplasia benigna de próstata (HPB) y de la maca negra sobre el conteo de espermatozoides en testículo, epidídimo y conducto deferente. **Material y métodos.** Para evaluar el efecto de diferentes lotes de producción (2007, 2008, 2009, 2010, 2016 y 2018) de maca roja, los animales (ratones) fueron inducidos a HPB con dos dosis de enantato de testosterona (25 mg/0.1 ml) en el día 1 y día 7. El extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja fue administrado en forma oral durante 21 días. Para evaluar el efecto de diferentes lotes de producción (2007, 2008, 2009 y 2017) de maca negra, se administró vía oral a los ratones durante 7 días. Para determinar el efecto biológico se evaluó el conteo de espermátides en testículo, conteo de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente. Se realizaron también análisis fisicoquímicos como son la prueba de la actividad antioxidante in vitro del DPPH y se midieron los niveles de polifenoles, metabolitos secundarios que hay en la maca. **Resultados.** El extracto atomizado de maca roja hasta doce años después de haber sido producida administrados a los animales inducidos a HPB, disminuyeron el tamaño de la próstata. En cuanto al tratamiento con los diversos lotes de maca negra, se determinó que aún el extracto atomizado producido hace doce años mantiene su actividad aumentando el conteo de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente, así como también su efecto sobre el conteo de espermátides en testículo, tal como lo produce el extracto preparado con un año de antigüedad. Los diversos lotes mostraron actividad antioxidante con la prueba del DPPH y se determinó también que todos los lotes presentan niveles adecuados de polifenoles. **Conclusiones.** Se ha determinado que la actividad biológica de diversos lotes de producción de los extractos hidroalcohólico atomizados de maca roja y maca negra, se mantiene a pesar del tiempo que han sido producidos, con más de 10 años de antigüedad.

### **SALUD SEXUAL Y REPRODUCTIVA EN EL ADOLESCENTE: Un estudio exploratorio de la atención brindada en el Centro Especializado de Salud Sexual y Reproductiva del Adolescente en Lima Perú.** (Sexual and reproductive health in the adolescent: An exploratory study of the care provided at the specialized center for adolescent sexual and reproductive health in Lima, Peru)

Baca-Neglia H1, Roa-Meggo Y1, Baca-Gamarra A1, Asencios-Falcón E1, Vidal-Escudero R1.

1Universidad de San Martín de Porres, Facultad de Obstetricia y Enfermería, Lima-Perú.

**Objetivo:** Identificar los motivos de consulta de los adolescentes atendidos en el Centro Especializado en Salud Sexual Reproductiva del Adolescente (CESSRA) de la Facultad de Obstetricia y Enfermería de la Universidad de San Martín de Porres.

**Material y Método:** Estudio descriptivo simple, transversal, retrospectivo. La muestra estuvo conformada por 549 historias clínicas del año de 2007 a julio de 2017, de adolescentes entre 15 y 19 años, usuarias del servicio CESSRA – FOE. USMP. Se consideraron los datos registrados en la primera consulta hasta las atenciones posteriores que abarcaron la etapa de vida adolescente. Para el procesamiento de los datos se usó del programa estadístico informático SPSS, versión 25.

**Resultados:** Edad promedio de 18 años, el 31.3% cursaban el I ciclo y el 20.6% el III ciclo. El 90.5% había tenido relaciones coitales, 87.8% iniciaron actividad coital entre 15 y 19 años de edad, 80% refiere haber tenido entre 1 y 2 parejas sexuales. El 54.1% había usado algún método anticonceptivo en el pasado, el 87.4% nunca había estado

embarazada, el 96.3% era nulípara y 9% había tenido un aborto alguna vez. 50.3% de las consultas fueron por consejería en salud sexual y reproductiva y el 47.8% para asistencia para la anticoncepción.

Conclusiones: El inicio de las relaciones coitales, asociado al poco uso de algún método anticonceptivo, representa un mayor riesgo para las adolescentes de contraer infecciones de transmisión sexual, embarazos no deseados, morbilidad y muerte de la madre y/o el recién nacido.

Las adolescentes universitarias hicieron mayor uso del servicio por consejería en salud sexual y reproductiva, así como asistencia para la anticoncepción. Por lo que, es importante implementar espacios para la atención y educación sexual integral, dentro de la universidad, que son los escenarios que albergan a una importante cantidad de adolescentes.

### **NACER EN OTRO PAÍS: PARTO Y RECIÉN NACIDO EN MIGRANTES ATENDIDAS EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN LIMA, PERÚ.** (Born in another country: Childbirth and newborn in migrants treated in a third level hospital in Lima, Peru).

Magallanes-Corimanya M.

Universidad de San Martín de Porres. Lima – Perú.

Antecedentes: En el año 2018 Perú se convirtió en el segundo país en el mundo en albergar a más ciudadanos venezolanos, haciendo visible el problema migratorio ya que al parecer no se estaba preparado para tal magnitud. Reconociendo que el embarazo y el parto son eventos importantes de la vida, el objetivo de esta investigación fue comparar algunas características de la atención de parto en migrantes comparadas a peruanas atendidas en el Hospital Nivel III-1 de Lima-Perú.

Métodos: estudio transversal, descriptivo comparativo, cuya muestra fue de 246 migrantes y 251 peruanas. La información se recolectó de: libro de atención de partos, sistema informático perinatal e historias clínicas. Se utilizó la estadística descriptiva univariada y bivariada para comparar los datos.

Resultados: La prevalencia de migrantes fue 4,31%. El país principal de origen de las migrantes fue Venezuela (96,4%), seguido muy de lejos por Colombia (1,2%), Bolivia (1,2%), Haití, Argentina y Ecuador (0,4% cada uno).

El promedio de edad de las mujeres y sus parejas fue de: 25,5±5,3 y 27,3±6,7 años para las migrantes; y de 25,9±5,5 y 29,7±7,4, para las peruanas.

Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las migrantes y las peruanas solo en las variables: educación de la madre y del padre, país de procedencia del padre, ocupación de la madre, partos previos y semana de inicio del control prenatal. Ninguna variable del recién nacido tuvo significancia estadística.

Conclusión: durante el periodo de estudio hubo un porcentaje importante de migrantes venezolanas, por lo que el Ministerio de Salud debe formular políticas públicas viables para atender el incremento de esta demanda. Sin embargo, hasta el momento la condición de migrante parece no afectar los resultados materno-perinatales. Los datos sugieren un efecto del “migrante saludable”.

### **EVALUACIÓN REPRODUCTIVA DE QUIMERAS DE SANGRE EN GEMELOS DICIGÓTICOS EQUINOS HETEROSEXUALES.** (Reproductive evaluation of blood chimeras in heterosexual equine dizygotic twins).

Ramírez-Reveco A1,2,3; Gajardo G2,3; Rubilar J4; Ulloa C2,3; Vera T1,2,3; Ortiz M3,5.

1Laboratorio de Criobiología y Análisis de Funcionalidad Espermática,

2Instituto de Ciencia Animal

3Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

4Facultad de Medicina Veterinaria, Sede Patagonia, Universidad San Sebastián, Pto Montt.

5Laboratorio de Marcadores Moleculares, Centro de Inseminación Artificial

El quimerismo es una condición producida por intercambio celular trans-placentario feto-materno (microquimerismo), anastomosis entre gemelos dicigóticos (quimeras de sangre) o fusión temprana de dos embriones (quimeras verdaderas). Aunque las quimeras de sangre han sido reportadas en equinos, muy pocos casos sobreviven al nacimiento. El único estudio de prevalencia de gestación gemelar y quimerismo de sangre en equinos (caballo español), confirma la baja frecuencia de gemelos (0,066%) y de quimeras de sangre (0,011) (Anaya et al 2018). El objetivo de este estudio fue determinar si la condición de quimerismo de sangre se asocia a patologías en desarrollo reproductivo de las crías en pubertad.

Materiales y Metodologías: Gemelos dicigóticos heterosexuales paridos de yegua mestiza de primera

gestación. La confirmación de quimerismo de fue determinada mediante contrastación de padrón molecular (DNA microsatellite) de muestras de pelo versus sangre de ambas crías. Los análisis reproductivos de ambas crías se hicieron en pubertad (2 años), mediante exploración visual, palpación rectal y ecografía.

Resultados: Se informa gestación larga, parto eutócico y nacimiento de crías heterosexuales en óptimas condiciones. El genotipado en sangre vs pelo confirmo quimerismo de sangre de ambas crías y sugirió predominancia de los alelos de la hembra en ambas muestras. La evaluación reproductiva de la hembra revela estructura y conformación genital normal, cervix, útero y estructura ovárica de aspecto normal, estos últimos en un estado de transición A2 propio de la edad estación reproductiva, se descarta freemartinismo. El análisis reproductivo del macho revela una conformación testicular y glandular normal de acuerdo a la edad y la especie.

Conclusiones: El quimerismo de sangre en la hembra y el macho no parece afectar el desarrollo reproductivo. La cuantificación molecular (DNA) en sangre, órganos y tejidos permitirá determinar el grado del quimerismo y también si esta condición se extiende más allá del linaje hematopoyético.

### **CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EQUINO: EFECTO DE LA ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES AL MEDIO DE CONGELACIÓN EN LA FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA.** (Equine semen cryopreservation: effect of adding antioxidants into freezing medium on sperm physiology)

Contreras MJ1, Treulén F2, Arias ME1,3, Silva M4, Felmer R1,5.

1Laboratorio de Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

2Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Temuco, Chile.

3Departamento de Producción Animal, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

4Departamento de Ciencias Veterinarias y Salud Pública, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

5Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

La criopreservación de semen equino no ha alcanzado el nivel de eficiencia y los resultados positivos descritos en otras especies. Esto se debe a que el espermatozoide equino es más susceptible al proceso de congelación, mostrando mayores índices de estrés oxidativo y daño de la membrana plasmática, lo que desencadena la activación de diversas vías de daño celular que culminan en la fragmentación del ADN y la muerte celular. Estos antecedentes sugieren la necesidad de identificar antioxidantes que agregados al medio de congelación permitan mejorar la sobrevivencia y funcionalidad de los espermatozoides sometidos a este proceso de congelación.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de tres antioxidantes (MnTBAP, NAC y FeTPPS) en dos condiciones: i) previo a la congelación, y ii) previo y posterior a la congelación, en parámetros de calidad y funcionalidad espermática.

Se evaluaron muestras de semen de tres potros congeladas con los antioxidantes adicionados en las dos condiciones y se evaluó mediante citometría de flujo viabilidad (SYBR/PI), potencial de membrana mitocondrial (TMRM/SYTOX Green), peroxidación lipídica (BODIPY/PI), producción de especies reactivas (DHE/SYTOX), desorden lipídico de las membranas (MC540/SYTOX Green), fragmentación de DNA (TUNEL), motilidad espermática (ISAS) y adhesión a la zona pelúcida.

Los resultados confirman que MnTBAP es el antioxidante que mejor controla el proceso de estrés oxidativo y daño celular post descongelación. MnTBAP mejoró la viabilidad, motilidad, potencial de membrana mitocondrial, desorden lipídico de las membranas y número de espermatozoides adheridos a los ovocitos respecto al control y a los antioxidantes. Además, se determinó que una segunda aplicación post descongelación induce daño celular, ya que no se observó un efecto benéfico en los espermatozoides.

Financiamiento y Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1160467 y Beca doctoral CONICYT 21181068

### **IMPACTO DE LA BIOPSIA DE ENDOMETRIO Y LA EXPRESION DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN LA IMPLANTACION EMBRIONARIA EN CICLOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.** (Assessment of endometrial scratching and progesterone receptor expression on embryo implantation outcome in assisted reproduction cycles).

WA Palomino, F Argandoña, A Godoy, A Muñoz, A Salinas, Escalona J, Fuentes A, MC Johnson,

O Luengo, Devoto L.

Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Unidad de Medicina Reproductiva, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

**Objetivo:** La disminución del receptor de progesterona (PGR) en el epitelio endometrial caracteriza el endometrio receptivo. La injuria del endometrio (“scratching”) podría crear condiciones facilitando la implantación embrionaria. Determinar el impacto de la biopsia de endometrio (Bx) y la expresión de PGR, en ciclos de reproducción asistida con transferencia de embriones desvitrificados (FET).

**Material y métodos:** En un estudio prospectivo, se obtuvieron Bx con canula pipelle en 35 ciclos de preparación hormonal endometrial (PE). PGR se localizó mediante inmunohistoquímica asignando un valor histológico (Hscore) a la inmunotinción. Las tasas de embarazo clínico (EC) en ciclos FET posteriores a Bx fueron analizadas en relación al antecedente de Bx y la expresión de PGR. 131 ciclos FET realizados en el mismo periodo, sin antecedente de Bx sirvieron como controles. Se utilizó Fisher exact test para comparar las variables categóricas y Mann Withney test para comparar variables continuas, considerando significativo  $p < 0,05$ .

**Resultados:** No se detectaron diferencias en edad, índice de masa corporal, grosor del endometrio ni número de embriones transferidos entre las participantes. La tasa de EC con o sin antecedente de Bx fue 35,2% (12/35) y 28,2% (37/131) respectivamente; sin diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,52$ , RR 1,2 IC 95% 0,6-1,9). El Hscore para PGR fue  $0,95 \pm 0,4$  en los ciclos FET con embarazo y  $1,8 \pm 0,4$  en aquellos sin embarazo ( $p=0,009$ ).

**Conclusión:** El antecedente de Bx previo al ciclo FET no se asocia al resultado de embarazo. Sin embargo; la persistencia de PGR en el epitelio endometrial afectaría la capacidad de comunicación embrión-endometrio comprometiendo su implantación.

**Financiamiento:** Fondecyt 1140688

## Posters

---

### **DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE BISFENOL A POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA**

(Quantitative determination of Bisphenol A by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector)

Pisaroni B1, Azcárate F2, Munuce MJ1, Boschetti C2 y Caille A1.

1Laboratorio Medicina Reproductiva, Bioquímica Clínica. 2Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos – Área Tecnología Química, Rosario.

1,2 Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina. adricaille@yahoo.com

El BPA es un compuesto sintetizado a partir de acetona y fenol, usado comúnmente en la producción de policarbonatos, resinas epoxi y resinas de poliéster. El riesgo fundamental de exposición humana, surge debido al uso inadecuado de materiales plásticos no aptos para estar en contacto con alimentos, por aspiración o dermatológico. Así podría surgir una exposición inadvertida a dosis variables de BisA, generando potencialmente cierto daño asociado a su toxicidad como disruptor endócrino, pudiendo interrumpir o generar una respuesta anormal de procesos fisiológicos controlados por hormonas. Se ha clasificado a este compuesto como potencialmente cancerígeno, afectando principalmente a las glándulas mamarias. Se han evidenciado efectos deletéreos en roedores, en útero y testículos por exposición diaria; y en próstata por exposición fetal. Además se ha descrito en humanos afecciones del sistema reproductor masculino, particularmente asociadas a fertilidad. **Objetivo:** Desarrollar una metodología, adecuada para la determinación cuantitativa de Bisfenol A (BPA) en orina humana. **Material y métodos:** Cromatografía líquida de alta eficacia con detección de fluorescencia (HPLC-FLD), con una mezcla de tres solventes para la composición de la Fase Móvil. Se trataron orinas previamente con una micro extracción QuEChERS en fase sólida dispersiva. **Resultados:** Se redujo la fase móvil a una proporción de sólo dos solventes (agua:acetonitrilo). Luego se determinó la mejor proporción de ambos resultando en 60:40, con la cual se obtuvo la mejor resolución del pico. **Conclusión:** Tras analizar diversas técnicas de clean up para las muestras, se pudo comprobar que mediante la metodología propuesta conseguimos eliminar las interferencias más importantes con buena recuperación del analito. Se realizó una curva de calibración obteniendo valores aceptables para linealidad; como a su vez, también se corroboró que el método es reproducible y los patrones son estables como máximo por tres meses.

**Financiamiento:** BIO468 y BIO563, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

## **ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE ACETATO DE ULIPRISTAL Y MIFEPRISTONA SOBRE LA REACCIÓN ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.**

Caille A., Zumoffen C., Munuce MJ.

Laboratorio Medicina Reproductiva, Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.  
adricaille@yahoo.com

La anticoncepción de emergencia (AE) consiste en utilizar drogas o dispositivos para prevenir un embarazo no deseado luego de una relación sexual no protegida. El acetato de ulipristal (UPA) y la Mifepristona (RU486) han sido desarrolladas como moduladores selectivos del receptor de progesterona (SPRM) con acción agonista/antagonista. Sus efectos se asocian con la supresión de la ovulación, y se estudia su acción sobre los procesos involucrados en la interacción entre los gametos.

Objetivo: Comparar los efectos del UPA y RU486, en concentraciones compatibles con AE, sobre el estatus acrosomal de espermatozoides humanos.

Material y Métodos: Los espermatozoides fueron capacitados en ausencia (control) o presencia de UPA [100 (0,21  $\mu$ M) a 10000 (21  $\mu$ M) ng/ml] o de RU486 [de 100 (0,23  $\mu$ M) a 5000 (11,6  $\mu$ M) ng/ml] o Progesterona (5000 ng/ml). Se evaluó la reacción acrosomal (RA) basal e inducida por fluido folicular (hFF) mediante tinción con lectinas Pisum sativum-FITC. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, se utilizó ANOVA y Tukey-Kramer y prueba exacta de Fisher, considerando significativo  $p < 0,05$ .

Resultados: UPA y RU486 no afectaron ni la viabilidad y ni la motilidad espermática, en las condiciones ensayadas. La viabilidad celular en todos los casos fue superior al 85%. UPA y RU486 no aumentaron la RA espontánea para ninguna de las dosis evaluadas, y permitieron una correcta inducción de la misma frente al hFF, en todos los casos.

Conclusión: UPA y RU486 no producen efecto deletéreo sobre la población espermática, no inducen per se la RA (no existe acción agonista), ni inhiben la inducción de la misma al utilizar un inductor fisiológico (tampoco existe acción antagonista). A concentraciones compatibles con AE tanto el UPA como el RU486 no competirían con los sitios activos para la inducción de la RA.

Este Trabajo fue financiado Parcialmente por: Proyecto BIO468 y BIO565 Universidad Nacional de Rosario.

## **NGF INCREASED CHOLINE ACETYL TRANSFERASE AND THE VESICULAR ACETYLCHOLINE TRANSPORTER EXPRESSION IN RAT OVARY EX VIVO**

Benítez, A.1; Lara, H.1

1. Centre for Neurochemical Studies in Neuroendocrine Diseases, Laboratorio de Neurobioquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

The ovary is an endocrine organ which is regulated by hormonal and neural signals. It is well known that noradrenaline controls steroid secretion and follicular development. Its source comes from sympathetic neurons that innervate the ovary. In addition, evidence suggests that acetylcholine enhances follicular development and its intraovarian production would be in granulosa cells which express choline acetyltransferase (ChAT), vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) for acetylcholine storage, cholinergic muscarinic receptors (M1, M3, M5) and acetylcholinesterase (AChE). However, it is not known how this intraovarian cholinergic system is regulated. In vitro studies had shown that human granulosa cells incubated with neuronal growth factor (NGF) increased ChAT. Moreover, in a chronic cold stress model (in which increase the activity of sympathetic nerves) that induces impairments in follicular development, it has been described an increment in intraovarian NGF and acetylcholine in rat ovary.

Thus, the objective of the present work was to determine if NGF enhances acetylcholine production ex vivo in the rat ovary. We used 26 days old Sprague-Dawley rats and the ovaries extracted were incubated with 100 ng/mL NGF for 3 and 24 hrs with 95% oxygen and 5% CO<sub>2</sub> in buffer Krebs. We measured mRNA levels by qRT-PCR and acetylcholine levels by fluorometric assay. After 3 hrs, NGF produced an increment in ChAT and VAcHT mRNA levels, but a decrease in acetylcholine in medium. After 24 hrs, we didn't find changes neither in intraovarian acetylcholine nor in acetylcholine in medium. Altogether these data suggest that NGF regulates intraovarian acetylcholine production and storage ex vivo. The modest but constant increase in acetylcholine

production suggests that a longer time of incubation is needed to better visualize the neurotransmitter. Probably these changes will be easily demonstrated after chronic intraovarian increment of NGF in vivo.

Supported by: FONDECYT #1170291 (Lara, H.) and thesis partial support "Beca de Doctorado Nacional de CONICYT" #21161218 (Benítez, A.)

**ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA AUTOFAGIA CON PARÁMETROS DE CALIDAD DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.** (Correlation analysis of the autophagy proteins with quality parameters of human spermatozoa)

Valdebenito A1, Castro T1, Muñoz F1, Zambrano F1,2, Schulz M1,2 Pezo F1, and Sánchez R1,2 Uribe P1,3\*.

Centro de Excelencia en Medicina Traslacional (CEMT - BIOREN)(1), Departamento de Ciencias Preclínicas(2), Departamento de Medicina Interna(3), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Correspondencia a autor: pamela.uribe@ufrontera.cl

La autofagia es un mecanismo de respuesta a estrés que contribuye a mantener o restaurar la homeostasis celular. La autofagia es esencial para muchos procesos en la reproducción, como la gametogénesis, la fertilización, la embriogénesis y el desarrollo placentario, sin embargo, la participación de la autofagia en la función de espermatozoides maduros aún no ha sido dilucidada completamente. Recientemente, hemos demostrado que este proceso se activa en espermatozoides humanos maduros en respuesta a estrés oxidativo, sin embargo, la correlación de las proteínas de la autofagia con los parámetros de calidad espermática no se ha descrito. El objetivo de este estudio fue determinar la correlación entre las proteínas de la autofagia LC3-I y LC3-II con los parámetros del espermiograma y parámetros complementarios de análisis de calidad espermática. Para ello, se analizaron 15 muestras de donantes voluntarios aparentemente sanos. Se realizó el espermiograma y, mediante citometría de flujo, se analizó del potencial de membrana mitocondrial (PMM), la viabilidad, la oxidación de tioles, la externalización de fosfatidilserina, la producción de EROs y la determinación de proteínas LC3-I y LC3-II. Se realizó un análisis de correlación entre las proteínas de la autofagia y los parámetros seminales y espermáticos. Los resultados demostraron, primero, que las proteínas LC3-I y LC3-II se expresan de manera variable en las muestras de semen de los distintos donantes. Además, se observó una correlación positiva entre LC3-I y LC3II y entre LC3-II y el PMM, mientras que una correlación negativa se observó entre LC3-II y la motilidad progresiva. En conclusión, debido a que las proteínas LC3-II se correlacionan positivamente con el PMM, considerado un marcador altamente sensible de calidad espermática, estas proteínas podrían ser incluidas en el análisis seminal, mejorando la evaluación clínica de pacientes que consultan por infertilidad.

Financiado por FONDECYT 11170758 y PAI-CONICYT 79160030

**FOTOESTIMULACIÓN LED-630nm DEL SEMEN BOVINO CONGELADO Y SU EFECTO EN CALIDAD SEMINAL, EXPOSICIÓN NUCLEAR DE GRUPOS SH Y LA FERTILIDAD EN PROTOCOLO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO (IATF).** (LED-630nm

photostimulation of frozen bovine semen and its effect in sperm quality, nuclear exposure of SH groups and fertility in Protocol of Artificial Insemination in Fixed Time (AIFT)

1,9Gruzmacher A; 2,9Ortiz M; 3,8,9Ratto M; 3,8,9Urra F; 5Uribe P; 3,4,9Vera T; 6Hartley R; 7Rodríguez-Gil JE; 4,8,9Ramírez-Reveco A.

1Centro de Capacitación y Entrenamiento en Reproducción y Manejo Animal (CENEREMA)

2Laboratorio de Marcadores Moleculares, Centro de Inseminación Artificial (CIA)

3Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto de Ciencia Animal

4Laboratorio de Criobiología y Análisis de Funcionalidad Espermática

5Centro de Excelencia en Medicina Traslacional, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

6Instituto de Investigación e Innovación en Salud, Universidad Central de Chile, Santiago, Chile

7Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España

8Instituto de Ciencia Animal

9Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

La aplicación de la Inseminación Artificial a celo detectado en bovinos tiene limitaciones asociadas a fallas en la detección de celo, anestro postparto y pubertad tardía. En este contexto, la sincronización hormonal del celo e inducción de la ovulación permiten la IATF, cuya tasa de fertilidad promedio bordea el 50%, y es más baja en vacas que en vaquillas. Por otra parte, el uso de fotoestimulación LED 630nm (FE-LED-630nm) en espermatozoides porcinos es una aplicación comercial que mejora longevidad espermática, fertilidad y también prolificidad. El objetivo de este trabajo fue incluir la FE-LED-630nm en IATF en bovinos de carne y evaluar el efecto de su uso en la calidad seminal y tasas de preñez. Materiales y métodos: El protocolo de FELED-630nm incluyó la iluminación pulsátil (2min luz/1min-oscuridad/2min-luz) acoplada a la descongelación a 20°C (prototipo MaxiCow-IUL,S.A.). Al grupo control se aplicó descongelación convencional a 37°C por 30seg. Se usaron 116 vacas/vaquillas de buena condición corporal y normal aptitud reproductiva. La IATF se realizó a las 50-52 horas después del retiro de los dispositivos de progesterona. El diagnóstico de gestación se realizó 32-40 días post IATF. La evaluación de la calidad seminal incluyó análisis CASA y citometría de flujo. Resultados: La tasa de gestación promedio para dosis FE-LED-630nm vs control fue de un 60% (21/35) y 45% (37/81), respectivamente. Interesantemente, con la FE-LED-630nm se obtuvieron mayores tasas de preñez en vacas que en vaquillas: 62% (13/21) vs 43% (21/49) en vacas y 57% (8/14) vs 50% (16/32) en vaquillas, sugiriendo un efecto sobre la longevidad espermática in vivo. Los análisis de calidad seminal (viabilidad/motilidad) y de exposición de grupos SH libres in situ, no evidencian cambios asociados a la FE-LED-630nm acoplada a la descongelación seminal. Conclusiones: La inclusión de la FELED-630nm en IATF convencional incrementa las tasas de preñez del semen bovino criopreservado.

Financiamiento: PCI-MEC-CONICYT 80150017

**DISRUPTOR ENDOCRINO FAVORECE LA CALIDAD DE LA DESCENDENCIA DE PECES SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo Salar*).** (Endocrine disruptor favors the quality of offspring Atlantic salmon (*Salmo salar*))

Zepeda AB1, Miranda I2, Valdebenito I3, Farías JG2, Moreno RD1.

1Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 2Laboratorio de Ingeniería, Biotecnología y Bioquímica Aplicada, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. 3Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

Chile es el segundo productor a nivel mundial de especies salmónídeas, siendo una práctica común el uso de hormonas sintéticas para regular la madurez sexual de peces en cautiverio, considerando que producen durante todo el año, requiriendo estándares de calidad, principalmente en lo relacionado a las características de los peces producidos. Es así, como el desarrollo embrionario puede ser influenciado por la exposición al medio ambiente de toxinas y por una variedad de patologías. Por esta razón, el objetivo de esta investigación es determinar el efecto de un disruptor endocrino (GnRH $\alpha$ ) en peces reproductores machos y hembras de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en cautiverio, observando los efectos producidos directamente sobre sus gónadas y su repercusión sobre su descendencia. Para este estudio se fecundaron peces reproductores adultos con y sin tratamiento con GnRH $\alpha$  para evaluar el desarrollo de las crías hasta su etapa de alevín y se determinaron las concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol y testosterona mediante Kits de ELISA disponibles comercialmente. Es así como en esta investigación, se demostró que el tratamiento de reproductores machos y hembras *Salmo salar* con GnRH $\alpha$  el factor endógeno que induce el aumento en la presencia de malformaciones en la descendencia disminuye, favoreciendo el desarrollo normal durante su etapa larvaria, al regular en los progenitores su madurez sexual. Además, se determinó a través del ratio E2/T que el uso de esta hormona tendría efectos beneficiosos sobre progenitores y su descendencia. De acuerdo con nuestros resultados se concluye que el uso de GnRH $\alpha$  en peces reproductores machos y hembras de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en cautiverio, actuaría como un disruptor endocrino que no influye sobre la tasa de fecundación normal y presenta efectos positivos sobre el desarrollo de la descendencia al disminuir el número de malformaciones en la etapa larvaria.

Agradecimientos: A Hendrix Genetics por proporcionar sus peces y facilitar sus instalaciones. Post-doctorado FONDECYT/CONICYT (AZP) Proyecto N° 3170193 y FONDECYT N°1180387 (JGF).

**EFFECTO DEL BLOQUEO DEL UNIORTADOR DE CA $^{2+}$  MITOCONDRIAL Y DEL INTERCAMBIADOR DE NA $^{+}$ /CA $^{2+}$  MITOCONDRIAL SOBRE LA MOTILIDAD E INDUCCIÓN DE LA MOTILIDAD HIPERACTIVADA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.**

(Effect of the mitochondrial calcium uniporter blocking or mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger blocking on the motility and induction of the hyperactivated motility of human spermatozoa)

Bravo A1., Quilaqueo N1,2., Jofré I1., Villegas J.V.1,3.

1Núcleo Científico Tecnológico en Biorecursos-Centro de Excelencia de Biotecnología de Reproducción (BIOREN-CEBIOR); 2Magister en Ciencias mención Biología de La Reproducción; 3Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

El Ca<sup>2+</sup> es un segundo mensajero que controla las respuestas celulares en todos los organismos eucariotas. En espermatozoides, la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> regula procesos esenciales para que ocurra la fecundación del ovocito, como la motilidad e hiperactivación. A nivel mitocondrial, la concentración de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>mt</sub>) es importante, ya que regula la tasa de producción de ATP, clave en los procesos mencionados anteriormente. Para cumplir con sus funciones metabólicas, la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mt</sub> se establece mediante el equilibrio entre el influjo de Ca<sup>2+</sup>, a través del mCU y del eflujo de Ca<sup>2+</sup>, a través del intercambiador mNCX. Ru360 y CGP-37157 se han descrito como bloqueadores específicos de la actividad del mCU y del intercambiador mNCX, respectivamente. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del bloqueo del influjo y eflujo de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial sobre la motilidad y sobre la inducción de motilidad hiperactivada de espermatozoides humanos. Para esto, espermatozoides humanos seleccionados por swim-up, se expusieron a 5 μmol/L de Ru360 o 10 μmol/L de CGP-37157 durante 30 minutos a 37°C. La motilidad e hiperactivación se analizaron mediante el sistema computacional CASA. Nuestros resultados mostraron que la exposición a Ru360 y CGP-37157, no alteró la motilidad total y progresiva. Sin embargo, los espermatozoides móviles, expuestos al bloqueo ya sea del influjo, o del eflujo de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial, fueron incapaces de desarrollar motilidad hiperactivada, mostrando alteración en los parámetros de velocidad curvilínea y porcentaje de linealidad. En conclusión, la alteración de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> mitocondrial, producto del bloqueo del mCU o del intercambiador mNCX, no modula la motilidad espermática. En cambio, hemos encontrado que el bloqueo del mCU y del intercambiador mNCX, modula la capacidad para la adquisición de un estado de motilidad hiperactivada, proceso fundamental para el gameto masculino funcional.

Financiado por DI10-0021, Universidad de La Frontera.

### **EXPOSICIÓN A BPA y FTALATOS EN MUJERES EMBARAZADAS EN MEDELLÍN - COLOMBIA - RESULTADOS DE LA COHORTE SAMI.** Bisphenol A and Phthalate exposure among pregnant women in Medellín – Colombia - Results from the SAMI cohort.

Gómez Mercado CA1; Mejía-Sandoval G1; Segura-Cardona AM1 ; Arango-Alzate CA1 ; Barraza-Villareal A2; Patiño García D3.

1.Universidad CES, Medellín Colombia

2.Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México

3.Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Introducción: el bisfenol A (BPA) y los ftalatos son disruptores endocrinos relacionados con resultados adversos en el desarrollo intrauterino y postnatal. Los humanos expuestos a estos químicos metabolizan y excretan principalmente a través de la orina, la cual es utilizada como biomarcador de exposición. En Suramérica, la medición de estos disruptores endocrinos es limitada, especialmente en mujeres embarazadas. El objetivo del estudio fue medir BPA y metabolitos de ftalato en muestras de orina de mujeres durante su primer trimestre de embarazo. Materiales y métodos: en 38 gestantes que hacen parte de la cohorte SAMI (Salud Ambiental Materno Infantil), se aplicó un cuestionario para obtener datos sociodemográficos, nutricionales y fuentes de exposición ambiental. Además, se recolectaron 20 muestras de orina durante el primer trimestre de gestación y en un pool de las muestras se determinó BPA y 12 metabolitos de ftalato urinario mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de núcleo con cubierta con extracción en fase sólida en línea, cambio de columna y espectrometría de masas en tándem. Resultados: de BPA y ftalatos fue detectable en todas las participantes y ajustado por gravedad específica. El promedio de BPA fue de 2,32 ng/mL, con una desviación estándar (DE):2,64 ng/mL siendo 0,41 ng/mL la concentración mínima y 16,91 ng/mL la máxima y la media de DEHP fue de 188,49 μ/L (DE: 111,72 μ/L), con valores de 57,07 μ/L y 602,62 μ/L (mínimo y máximo respectivamente). También se hallaron los metabolitos primarios del DEHP (MEHP, MEHHP, MEOHP, MECPP) y otros metabolitos de ftalatos (MEP, MiBP, MnBP, MBzP, OH-MiNP y oxo-MINCH). Conclusión: este estudio proporciona el primer biomonitoreo en mujeres embarazadas en el primer trimestre del embarazo en Colombia. Los resultados indican que la

exposición en mujeres embarazadas a estos químicos es comparable o incluso más alta que lo observado en otras cohortes del mundo.

### **EFFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN REFRIGERADO A 17°C, DÍAS DE DESCANSO Y EDAD DEL VERRACO SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA TOTAL Y PROGRESIVA.**

Namuncura C1; Zambrano F1,2, Pezo F1, Uribe P1,3; Navarro P4,5; Sánchez R1,2.

Centro de Excelencia en Medicina Traslacional (CEMT - BIOREN)(1), Departamento de Ciencias Preclínicas(2), Departamento de Medicina Interna (3), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Correspondencia a autor: [fabiola.zambrano@ufrontera.cl](mailto:fabiola.zambrano@ufrontera.cl)

La fertilidad del verraco es esencial evaluarla en la producción porcina y determinar los factores que disminuyan la capacidad fecundante. En muestras seminales refrigeradas a 17° C, uno de los parámetros más importantes a determinar es la movilidad. Este estudio determina la relación entre el tiempo de conservación y los días de descanso de machos reproductores entre 10 y 32 meses de edad con la movilidad total y progresiva de los espermatozoides de semen refrigerado a 17°C. La obtención de los eyaculados se realizó mediante la técnica guante-mano y el análisis de la movilidad se realizó utilizando el sistema computacional SCA®. La movilidad total y progresiva se relacionó con los siguientes parámetros: tiempo de conservación del semen refrigerado a 17°C, días de descanso y edad del verraco. Los resultados para la relación movilidad total y tiempo de descanso mostraron una correlación negativa moderada ( $r=0.627$ ), con un valor  $p=0.000$  cuya función corresponde a  $Y=93.087-6.021 X$  y para la movilidad progresiva se obtuvo una correlación negativa baja ( $r=0,239$ ), con un valor  $p=0,013$  cuya función obtenida corresponde a  $Y= 41,31 - 3,132 X$ , por tanto, la movilidad total y progresiva de los espermatozoides disminuye a medida que aumenta el tiempo de conservación del semen. En relación, a los días de descanso y la movilidad total se presentó una correlación negativa muy baja ( $r=0,056$ ) con un valor  $p=0,567$  siendo la función obtenida  $Y= 87,341 - 0,206 X$ , para la movilidad progresiva se obtuvo una correlación negativa muy baja ( $r=0.095$ ) con valor  $p=0.327$  cuya función obtenida corresponde a  $Y= 41,250 - 0480 X$  determinándose que los días de descanso no influyeron en la movilidad total y progresiva de los espermatozoides, como asimismo la edad de los verracos. Esto permite concluir que el parámetro más importante a determinar son los días límites de conservación de semen refrigerado para mantener la capacidad fecundante de la muestra seminal de cerdo.

Financiado por FONDECYT 1180912

### **ACTIVACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS POR ANISOMICINA: EFECTO SOBRE MPF Y MAPK ERK1/2.** (Activation of bovine oocytes by anisomycin: effect on MPF and MAPK Erk1/2)

Valencia C, Pérez F, Matus C, Felmer R y Arias ME.

Laboratorio de Reproducción, Centro de Biotecnología de La Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera. Temuco - Chile

Estudios previos han demostrado mejoría en las tasas de desarrollo y calidad de embriones obtenidos por ICSI, SCNT y partenogénesis, utilizando anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en la activación de ovocitos bovinos y porcinos (Zygote 5:724-32; Biotechnol Lett. 39(2):189-196). No obstante, el mecanismo por el que anisomicina libera los ovocitos del arresto meiótico y promueve el desarrollo embrionario se desconoce. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la activación de ovocitos bovinos por anisomicina sobre el Factor Promotor de la Mitosis (MPF) y Erk1/2. Los tratamientos que se evaluaron incluyeron ovocitos MII activados con ionomicina (IO), ionomicina+anisomicina (ANY) e ionomicina+cicloheximida (CHX), ovocitos MII y fertilizados in vitro (FIV). Mediante inmunoblot a las 4 horas post-activación (hpa) se detectaron el nivel de ciclina B1 y fosforilación de Cdk1 y Erk1/2. Los resultados no mostraron diferencias en el nivel de ciclina B1 entre los distintos tratamientos, no obstante, el tratamiento CHX mostró un alto nivel ( $p<0.05$ ) de fosforilación de Cdk1, en comparación con ovocitos MII, IO y FIV. El tratamiento ANY, a pesar de mostrar un nivel de fosforilación de Cdk1 similar al tratamiento CHX, no presentó diferencia con los tratamientos restantes. Por otra parte, se observó que el nivel de fosforilación de Erk1/2 fue menor en los tratamientos ANY y CHX, en comparación con los tratamientos MII, IO y FIV. La fosforilación de Erk1/2 en el tratamiento FIV fue superior ( $p<0.05$ ), en relación con los restantes tratamientos evaluados. En conclusión, anisomicina modula MPF y Erk1/2

en ovocitos bovinos a las 4 hpa de forma similar a CHX, el compuesto mayoritariamente utilizado para la activación exógena de ovocitos. Además, la fertilización in vitro activaría los ovocitos bovinos por una vía independiente de Erk1/2.

Financiado por FONDECYT N° 1181453 y Dirección de Investigación, Universidad de La Frontera.

**LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE DESVITRIFICACIÓN E INCUBACIÓN CON EL ANTIOXIDANTE MnTBAP DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS CRIOPRESERVADOS.** (Supplementation of devitrification and incubation media with the antioxidant MnTBAP decreases reactive oxygen species production in cryopreserved human spermatozoa)

Cárcamo C1, Navarro E1, Sepúlveda J1, Zambrano F1,2, Schulz M1,2, Pezo F1, and Sánchez R1,2 Uribe P1,3\*. Centro de Excelencia en Medicina Traslacional (CEMT - BIOREN)(1), Departamento de Ciencias Preclínicas(2), Departamento de Medicina Interna(3), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Correspondencia a autor: pamela.uribe@ufrontera.cl

Las tecnologías de reproducción asistida cumplen un rol importante en el tratamiento de la infertilidad. Entre ellas, la criopreservación de espermatozoides es un área emergente, que ofrece la posibilidad de mantener la salud reproductiva a pacientes en diferentes condiciones clínicas. A pesar de la estandarización de los protocolos de criopreservación, este proceso induce un estado de estrés oxidativo debido al incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), afectando la calidad espermática post-criopreservación. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación de los medios de vitrificación, desvitrificación e incubación post-desvitrificación con el antioxidante MnTBAP □Manganeso (III) meso-tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin□ sobre la calidad de espermatozoides humanos criopreservados. Primero, se evaluó el efecto individual de MnTBAP sobre la producción de EROs y la viabilidad de espermatozoides de donates normozoospermicos, para determinar las concentraciones del antioxidante a utilizar en los experimentos posteriores. Luego, espermatozoides fueron criopreservados mediante la técnica de vitrificación suplementado separadamente el medio de vitrificación, desvitrificación e incubación post-desvitrificación con MnTBAP. En cada experimento se incluyó un control sin tratamiento. Se analizó la producción de EROs, la viabilidad y la motilidad espermática. Los resultados mostraron que la suplementación del medio de vitrificación con MnTBAP no afectó los parámetros analizados, sin embargo, la suplementación del medio de desvitrificación e incubación post-desvitrificación resultó en una disminución de la producción de EROs, aunque la concentración mayor de MnTBAP causó una disminución de la motilidad total a las 4 horas de incubación. En conclusión, la inclusión del antioxidante MnTBAP en el proceso de desvitrificación ejerce un efecto beneficioso, disminuyendo la producción de EROs en espermatozoides humanos criopreservados. Además, la suplementación del medio de incubación de espermatozoides con MnTBAP podría preservar de mejor manera la calidad espermática, especialmente en espermatozoides previo a su uso en protocolos de reproducción asistida.

Financiado por FONDECYT 11170758 y PAI-CONICYT 79160030

**LA EXPOSICIÓN A UNA MEZCLA DE FTALATOS FAVORECE EL AMBIENTE ESTROGÉNICO EN DOS LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE ENDOMETRIOSIS.** (the exposure a phthalate mixture favors the estrogen environment in two cell lines derived from endometriosis)

Patiño-García D1,2, Moreno RD1, Orellana R2.

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

2.Dependiente de Ciencias Químicas y Biológicas, Facultad de Salud, Universidad Bernardo O'Higgins, Santiago, Chile.

Endometriosis es un desorden ginecológico benigno cuya incidencia es del 20-40% y su prevalencia es 10-15% en mujeres en edad reproductiva. En Chile, su recurrencia es del 28.5%. Alrededor del 50% de mujeres con endometriosis son infértiles. Se define como la presencia de tejido endometrial (epitelio y estroma) fuera del útero, causando implantes que crecen cíclicamente debido al estradiol (E2) por lo que esta patología es considerada dependiente de estrógeno.

La esteroidogénesis es un proceso en cual se sintetizan hormonas a partir del colesterol, entre ellas E2, y en mujeres, este proceso ocurre principalmente en el ovario. Sin embargo, los tejidos endometrióticos tienen la capacidad de producir esta hormona debido a que cuentan con las enzimas necesarias para ello.

Los disruptores endocrinos (DEs) son compuestos o mezclas de compuestos que alteran el balance de las hormonas. Entre los DEs destacan los ftalatos dado que hacen parte de productos de uso cotidiano tales como botellas plásticas y productos de cuidado personal. Estudios epidemiológicos recientes sugieren una asociación entre la exposición a ftalatos con la ocurrencia de endometriosis. Particularmente, los niveles plasmáticos de tres ftalatos (DEHP, DBP y BBP) se encuentran aumentados en estas mujeres. Sin embargo el efecto de la exposición a mezclas de ftalatos y endometriosis no ha sido estudiado.

Objetivo: Determinar si la exposición a una mezcla de ftalatos altera la expresión de enzimas esteroideogénicas en líneas celulares de endometriosis.

Materiales: líneas celulares 11z y Hs832 (epitelio y estroma endometriótico), DEHP, DBP, BBP (Sigma, MO, USA), Anti-PR (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Anti-CYP19A1, anti-HSD17B1, anti-HSD17B2 y anti-ACTIN (Abnova, Cambridge, UK).

Resultados: La mezcla de ftalatos (7 µg/mL) aumentó los niveles proteicos de CYP19A1 y HSD17B1, y disminuyó los niveles proteicos de PR-B y HSD17B2.

Conclusiones: La mezcla de ftalatos favorece el ambiente estrogénico en células derivadas de endometriosis.

Agradecimientos: FONDECYT Inicio 11170603.

### **CRYOPRESERVATION OF YELLOWTAIL KINGFISH SPERM (SERIOLA LALANDI): EFFECTS ON SPERM PHYSIOLOGY.** (Criopreservación de espermatozoides de seriola lalandi: Efecto en la fisiología espermática)

Figueroa E1, Wilson R2, Lee M3, Sandoval L1, Risopatrón J4, Farias J.G3, Valdebenito I1, Romero J5.

1Núcleo de Investigación en Producción Alimentaria, Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile. 2Departamento de Ciencias Acuáticas y Ambientales, Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile. 3Departamento de Ingeniería, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. 4BIOREN – Center for Biotechnology in Reproduction, La Frontera University, Temuco, Chile. 5Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Cryopreservation generates changes in sperm physiology in fish. Affecting plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, DNA integrity and increased oxidative stress, altering viability, motility, fertilizing capacity and offspring quality. However, there are no studies that evaluate these parameters in Yellowtail kingfish sperm. The objective was to determine the effect of freezing on the sperm function of *Seriola lalandi*. The semen was frozen in Cortland@+1.3M DMSO+0.3M glucose in a 1:3 ratio (semen/cryoprotectant) treatment (T) and fresh control semen (C). Straws (0.5mL) were frozen 4cm from the N2L. Thawed was carried out in a thermo-regulated bath (35°C). After thawed was evaluated by flow cytometry and multimodal reader: Sperm rate with fragmented DNA (TUNEL), intracellular superoxide production (DHE / SYTOX) plasma membrane integrity (SYBR-14 / PI), intracellular calcium (Fluo-4 AM), mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ Mit: JC-1) and by motility microscopy (CASA). In the cryopreserved semen (T) the DNA fragmentation was  $5.2\pm 1.7\%$ , intracellular superoxide of  $27\pm 3.9\%$ , plasma membrane integrity of  $77\pm 5.4\%$ ; intracellular calcium of  $38\pm 4.8\text{nM} / 109\text{ sp}$ , mitochondrial membrane potential of  $51\pm 3.6\%$  and motility of  $40\pm 6.2\%$ , presenting significant differences with the control group ( $P<0.05$ ). The intracellular calcium concentration was correlated with the mitochondrial membrane potential and motility ( $r=0.65$  and  $r=0.79$ , respectively.  $P<0.05$ ). Preliminary results suggest that cryopreservation induces alterations in sperm function in *Seriola lalandi*.

Acknowledgements: This work was supported by the Fund for the Promotion of Scientific and Technological Development of CONICYT, FONDECYT/ POSTDOCTORAL (N° 3180765), FONDECYT/REGULAR (N° 1180387 and N° 1171129) and CONICYT National Doctorate Scholarship (N° 21150246) Chile.

### **DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN qPCR PARA EVALUAR LA EFICIENCIA DEL SEXADO DE ESPERMATOZOIDEOS EQUINOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.** (Design of a method based on qPCR to evaluate the efficiency of sexed stallion sperm through flow cytometry)

Muñoz E.1,2, Arias M.E.2,3, Felmer R.2,4.

1Programa de Doctorado en Ciencias, Mención Biología Celular y Molecular Aplicada, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

2Laboratorio de Reproducción, Centro de Excelencia en Biotecnología de la Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

3Departamento de Producción Animal, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

4Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

El sexado de espermatozoides es la separación de gametos masculinos X o Y, una herramienta de gran valor productivo para la obtención de animales del sexo deseado. Las actuales técnicas de sexado mediante citometría de flujo se basan en el marcaje del ADN mediante una tinción fluorescente que permite detectar la pequeña diferencia de fluorescencia que se produce por el mayor contenido de ADN en el cromosoma X respecto al Y. Sin embargo, estas técnicas pueden tener un porcentaje de error significativo si no son correctamente estandarizadas. En este trabajo se presenta una metodología basada en qPCR absoluto, para evaluar la eficiencia del sexado de espermatozoides equinos con el fin de reducir el porcentaje de error de la técnica.

Utilizando ADN extraído desde una yegua y un potro se amplificó por PCR una región del gen TNMD del cromosoma X y del gen SRY del cromosoma Y. Ambos amplicones se clonaron por separado en el vector pUC19. Con estos vectores (pUC19-TNMD y pUC19-SRY) se construyó una curva de calibración utilizando un nuevo set de partidores específicos para cada gen. Paralelamente, mediante Citometría de flujo (FACS Aria Fusion, BD) se realizó la separación de los espermatozoides equinos teñidos con Hoechst (15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), recolectando diferentes cantidades de células X e Y en cada tubo con el fin de evaluar la metodología basada en qPCR. Se extrajo ADN de los espermatozoides de cada tubo y se realizó la cuantificación absoluta por qPCR basándose en la curva de calibración. Los resultados indican que efectivamente existe una correlación positiva entre la cantidad de amplicones generados y el número de espermatozoides X e Y presentes en cada tubo. Por lo tanto, se concluye que la metodología implementada puede ser utilizada para estandarizar el sexado de espermatozoides equinos mediante citometría de flujo.

Agradecimientos: FONDECYT-1160467, Beca doctoral CONICYT-21191434

#### **ACTIVIDAD QUINASA DE ERK 1/2 EN OVOCITOS BOVINOS ACTIVADOS** (Kinase activity of ERK 1/2 on activated bovine oocytes)

Pérez F, Valencia C, Matus C, Felmer R y Arias ME.

Laboratorio de Reproducción, Centro de Biotecnología de La Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera. Temuco – Chile.

Anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, previamente demostró ser exitoso en la activación de ovocitos bovinos luego de procedimientos de ICSI y clonación (Arias et al., *Zygote*, 5:724-32, 2016; Felmer and Arias., *Mol Reprod Dev*, 6:441-9, 2015), generando una alta tasa de embriones al estadio de blastocisto y reduciendo la fragmentación del ADN y aberraciones cromosómicas. Sin embargo, se desconoce el mecanismo que utiliza anisomicina para lograr la activación de los ovocitos MII. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la anisomicina sobre la actividad quinasa de ERK 1/2, la que se ha descrito regularía el Factor Promotor de la Mitosis (MPF) que participa en la liberación del arresto meiótico de los ovocitos MII. Las evaluaciones se realizaron en ovocitos MII activados con: ionomicina (Io), ionomicina más cicloheximida (Io/CHX) e ionomicina más anisomicina (Io/ANY), y en ovocitos fecundados in vitro (FIV) y ovocitos MII. Las evaluaciones se realizaron a la 1, 4 y 15 horas post-activación (hpa) mediante un ensayo de actividad enzimática. Los resultados a la 1 hpa no mostraron diferencias significativas en la actividad de ERK 1/2 entre los tratamientos evaluados. No obstante, a las 4 hpa sólo se observó un incremento ( $p < 0.05$ ) en la actividad quinasa en los tratamientos Io y MII, comparados con el tratamiento FIV. Los tratamientos Io/ANY e Io/CHX mostraron una actividad quinasa levemente inferior a Io y MII, y superior FIV, sin embargo, esta observación no fue estadísticamente significativa. Las evaluaciones a las 15 hpa mostraron igualdad en la actividad de ERK 1/2 en los diferentes tratamientos evaluados. En conclusión, anisomicina mostró una actividad enzimática de ERK 1/2 similar a CHX, el principal compuesto utilizado en la activación de ovocitos.

Financiado por FONDECYT N° 1181453 y Dirección de Investigación, Universidad de La Frontera.

#### **EFFECTO DE LA ADICIÓN DE M $\beta$ CD, IBMX Y dbAMPc, SOBRE PARÁMETROS DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN EQUINOS.** (Effect of the addition of M $\beta$ CD, IBMX and dbcAMP, on stallion sperm capacitation parameters)

Fuentes F1, Arroyo C2, Arias ME1,3, Merino O1, Cabrera, P1, Silva M4, Felmer R1,5.

1Laboratorio de Reproducción, Centro de Excelencia en Biotecnología de la Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

2Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

3Departamento de Producción Animal, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

4Departamento de Ciencias Veterinarias y Salud Pública, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

5Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Los eventos involucrados en la capacitación espermática conducen a un cambio en el patrón de motilidad y finalizan con la fosforilación de tirosina de diversas proteínas, proceso utilizado como marcador de capacitación. Bajo condiciones apropiadas, los espermatozoides de mamíferos se pueden capacitar *in vitro*, sin embargo, en equinos esto aún no se logra. En el presente estudio, se evaluó el efecto de dos medios de capacitación espermática, Whitten y Tyrode, bajo condiciones no capacitantes (NC), capacitantes por incorporación de bicarbonato y BSA (C), y capacitantes con la adición de los inductores exógenos de capacitación M $\beta$ CD (M), IBMX (I) y/o dbAMPc (D), sobre la motilidad, niveles de fosforilación de tirosina y número de espermatozoides unidos a zona pelúcida en un ensayo heterólogo con ovocitos bovinos.

Se colectó semen fresco de 3 potros de raza Chilote. Se incubaron los espermatozoides equinos durante 0, 2, 4 y 8 h. Se registró la motilidad subjetiva mediante microscopía óptica y se evaluaron los niveles de fosforilación de tirosina a las 4 h por citometría de flujo empleando un anticuerpo monoclonal y por Western blot. Mediante microscopía de fluorescencia se contaron los espermatozoides adheridos a ZP bovina. Los resultados indican que en ambos medios los tratamientos CI, CID y CMID no afectaron la motilidad total respecto al control. La fosforilación de tirosina aumentó significativamente en ambos medios conteniendo inductores de capacitación (CID y CMID), lo cual se confirmó mediante Western blot. El promedio de espermatozoides adheridos a ZP fue significativamente mayor en los tratamientos en condiciones capacitantes (C, CID y CMID), respecto al control. En conclusión, los espermatozoides equinos incubados con estos inductores exógenos muestran cambios celulares y moleculares consistentes con la capacitación espermática y el ensayo de adhesión a ZP confirma su funcionalidad.

Agradecimientos FONDECYT 1160467 y Beca doctoral CONICYT 21191408

#### **EFFECTS OF TESTOSTERONE AND SOLUBLE FACTORS FROM SERTOLI CELLS ON SPHINGOLIPID BIOSYNTHESIS OF SPERMATOGENIC CELLS**

Santiago Valtierra FX, Rodríguez Álvarez T, Aveldaño MI and Oresti GM.

INIBIBB, CONICET-UNS y Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, Bahía Blanca, Argentina. E-mail: fsantiago@inibibb-conicet-gob.ar.

Germ cells from male rodents require membrane sphingolipids (SL) with very-long-chain polyunsaturated fatty acids (VLCPUFA), in non-hydroxylated (n-V) and 2-hydroxylated (h-V) versions, for normal spermatogenesis. We are showing that spermatogenic cells isolated from seminiferous tubules of adult rats, in culture, are able to biosynthesize ceramides (Cer), sphingomyelins (SM), and glucosylceramides (GlcCer), including species with VLCPUFA. By using [3H]16:0 as precursor, such an ability is shown here to be maximal in pachytene spermatocytes (PtS) and to decrease with differentiation to round spermatids (RS). As measured by RT-qPCR, the mRNA levels of the SL synthases CerS3 and GlcCerS were higher in PtS than in RS, those of SMS1 were similar, while those of SMS2 were higher in RS than in PtS. Next, we evaluated the effect on SL biosynthesis and gene expression of supplementing the cultures with testosterone (Tes), with Sertoli cell-conditioned medium (SCM), and with both together. In the presence of Tes, the biosynthesis of Cer from [3H]16:0 was not affected in PtS and RS, while that of SM was increased significantly, and that of GlcCer decreased, in RS. In the presence of SCM, the labeling of Cer was stimulated in PtS and RS, whereas that of SM increased only in RS and that of GlcCer in PtS. Supplementation with SCM plus Tes increased the incorporation of [3H]16:0 into n-V species of SM, and the transcript levels of SMS2, in PtS. In RS, this combination increased the formation of n-V species of [3H]Cer, but only Tes increased the transcript levels of Elov14 and CerS3, enzymes responsible for the synthesis of n-V and of Cer species containing n-V, respectively. Our results indicate that the *de novo* biosynthesis of SL in spermatogenic cells during the course of differentiation is coordinately regulated by Tes and by soluble factor(s) released from Sertoli cells. Supported by SGCyT UNS-PGI-UNS [24/B272 to GMO and 24/B218 to MIA], FONCyT, [PICT2017-2535 to GMO].

#### **RELATIONSHIP BETWEEN REACTIVE OXYGEN SPECIES LEVELS AND SPERM PARAMETERS IN IDIOPATHIC INFERTILE MEN.**

Maldonado, G; Florez, M; Castro, A; Parada-Bustamante, A.  
Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI); Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Increased seminal reactive oxygen species (ROS) have been directly related with alterations in spermatozoa of infertile men with varicocele, genital infections and unhealthy lifestyles, but its relationship in idiopathic infertile men is not clear. The aim of this study was to determine whether there is a relationship between ROS and sperm parameters in infertile men without an evident cause of infertility.

Men with a diagnosis of primary infertility without clinical varicocele or chronic diseases were included in this study. They smoked less than 5 cigarettes by day, were not heavy drinkers and did not consume drugs or medicaments. A spermogram was performed according to WHO guidelines. Men with leukocytospermia and/or with necrozoospermia were excluded. ROS levels were measured using luminol reagent. A detailed analysis of the different sperm morphological alterations was performed. Data were analyzed by Spearman's correlation analysis. A total of 50 men were recruited. 29 were normozoospermic, 16 had isolated teratozoospermia and 5 had more than one alteration in spermogram (count, morphology and/or motility). In total population, ROS levels were inversely correlated with total count sperm, vitality and normal sperm morphology. Besides, ROS levels were directly correlated with percentage of spermatozoa with the alterations: grossed midpiece, small acrosome, coiled tail and bent tail. Although men with leukocytospermia were excluded, ROS levels were directly related with concentration of positive-peroxidase cells. Interestingly, 0% of normozoospermic men, 31% with isolated teratozoospermia and 80% with more than one alteration had high ROS levels ( $\geq 1 \times 10^6$  cpm/ $20 \times 10^6$  spermatozoa).

In summary, ROS sperm levels in idiopathic infertile men are directly correlated with altered sperm parameters, excluding alterations in motility. High ROS levels would be related with more severe alterations found in spermogram analysis. Our results also suggest that antioxidant treatment would not be the correct therapy to all men with isolated teratozoospermia.

#### **EXTRACELLULAR MATRIX LAMININ INVOLVEMENT IN THE FORMATION OF VASCULOGENIC MIMICRY IN BREAST AND OVARIAN CANCER.**

Mingo G1,3, Valdivia A1,3, Aldana V1, González P1, Leyton L3,4, & Owen G1,2,3,5  
(gamingo@uc.cl)

1Facultad de Ciencias Biológicas & 2Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 3Advanced Center for Chronic Disease (ACCDIS), Universidad de Chile, Santiago, Chile. 4Laboratory of Cellular Communication, ICBM, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile. 5Millennium Institute on Immunology and Immunotherapy, Santiago, Chile.

**Introduction and Objectives:** Vasculogenic mimicry (VM) describes a process by which cancer cells establish an alternative perfusion pathway in an endothelial cell-free manner. Despite its strong correlation with reduced patient survival, the mechanisms by which a tumor can create a self-generated irrigation system are still not understood. VM occurs in vitro only in the presence of an extracellular matrix (Matrigel), however the protein component and signaling pathway involved in this process is unknown.

**Materials and Methods:** Using an established in vitro model of VM in ovarian and breast cancer cell lines we utilized immunofluorescence and sirius red staining to determine the essential protein component of the glycoprotein matrix. Pharmacological inhibitors and gene silencing were used to elucidate the role of integrins and intercellular signaling pathways.

**Results:** Laminin is present in the glycoprotein matrix forming the tubular structures, but collagen is not present in this matrix. Chemical inhibition of integrins  $\beta 1$  and  $\beta 3$  prevents the formation of VM, although gene silencing of integrin  $\beta 3$  alone is not sufficient to prevent this process.

**Discussion and conclusion:** We demonstrate that laminin, not collagen, is an essential extracellular protein required for in vitro VM formation. Integrins (receptors for laminin) are essential for this process. As VM is strongly associated with poor patient survival, understanding the mechanisms of VM formation may deliver new druggable targets.

**Funding:** FONDECYT1180241, CONICYT FONDAP-15130011, IMII P09/016-F

**REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA QUINASA A (PKA) POR EL PROTEASOMA DURANTE LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO.** (Regulation of the protein kinase A (PKA) activity for the proteasome during the human sperm capacitation)

Zapata-Carmona, H.1, Barón, L. 1-2, Kong, M. 1, Morales, P.1-2.

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

2Instituto Antofagasta. Universidad de Antofagasta. Antofagasta. Chile.

Uno de los primeros eventos de la capacitación espermática es la activación de la vía SACY/ cAMP/PKA. Recientemente, demostramos que el proteasoma aumenta su actividad al inicio de la capacitación mediante la vía SACY/PKA-C $\alpha$ . La activación del proteasoma por PKA-C $\alpha$  es necesaria para el proceso de capacitación. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el proteasoma participa en la regulación de la actividad de PKA una vez iniciada la capacitación.

Con este propósito, espermatozoides humanos fueron obtenidos en una gradiente doble de percoll e incubados en medio capacitante (2,6% BSA y 25 mM bicarbonato). Luego, distintas alícuotas fueron incubadas por diferentes tiempos (0, 1, 15, 30 y 60 min) en presencia y ausencia de epoxomicina, un inhibidor específico del proteasoma, o con 0.1% DMSO (control). La actividad de PKA, el patrón de fosforilación de sustratos de PKA ( $\alpha$ -pPKAs), y la expresión de PKA-RI, PKA-RII y AKAP3 se evaluó mediante western blot. El porcentaje de  $\alpha$ -pPKAs se evaluó mediante citometría de flujo. La localización de  $\alpha$ -pPKAs, PKA-RI, PKA-RII y AKAP3 se evaluó mediante inmunofluorescencia.

Los resultados indican que el tratamiento con 10  $\mu$ M epoxomicina cambia el patrón de fosforilación, disminuye el porcentaje y la localización de los  $\alpha$ -pPKAs. La actividad de PKA incrementa significativamente a 1 min de capacitación, manteniéndose alta durante toda la incubación ( $p < 0.01$ ;  $n = 5$ ). Sin embargo, el tratamiento con epoxomicina disminuye significativamente la actividad de PKA a partir de los 30 min de incubación ( $p < 0.01$ ;  $n = 5$ ). Además, nuestros resultados muestran que PKA-RII no es degradada por el proteasoma y su localización es exclusivamente flagelar, mientras que PKA-RI y AKAP3 son degradadas por el proteasoma pero en tiempos distintos siendo PKA-RI el posible blanco de regulación del proteasoma sobre PKA. En conclusión, nuestros datos revelan la regulación de PKA por el proteasoma durante la capacitación espermática.

Financiado por "Fondo Puente de Investigación de Excelencia" de la Universidad de Antofagasta

**MORFOMETRÍA Y ESTEREOLOGÍA EN VASOS DEL CORDÓN UMBILICAL Y DISCO PLACENTARIO DE RATAS EXPUESTAS A POLUCIÓN DEL AIRE POR HUMO DE COMBUSTIÓN DE LEÑA RESIDENCIAL.** (Morphometry and Stereology in Vessels of the Umbilical Cord and Placental Disc of Rats exposed to Air Pollution by Wood Combustion of Residential Heating)

1Ignacio Rubio, 2Diego Lira; 3Carlos Veuthey; 4Ingrid Romero; 2Paulo Salinas.

1Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

2Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

3Centro de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

4Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

Introducción. El humo de la combustión de madera para calefacción residencial (WCRH) en el centrosur de Chile se ha convertido en una fuente importante de material particulado ambiental (MP). La asociación entre la exposición a MP con problemas reproductivos ha sido sugerida en estudios epidemiológicos. El objetivo fue describir los efectos morfocuantitativos en el cordón umbilical (CU) y disco placentario (DP) en ratas expuestas al humo de WCRH.

Material/Método. Se utilizaron 4 grupos de fetos ( $n=11$ /grupo), cuyas madres fueron expuestas a diferentes condiciones de polución ambiental por WCRH antes/durante la preñez. (N/N: indoor/indoor; N/E: indoor/outdoor; E/N: outdoor/indoor; E/E: outdoor/outdoor). Se realizó cesáreas el día 18 post-cruza y posteriormente un estudio morfométrico y estereológico (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

Resultados. En CU el grosor de las paredes de las arterias y venas alantoideas presentaron diferencias entre grupos E/E vs N/N ( $p < 0,0001$ ). Arterias y venas vitelinas presentaron diferencias en el grosor de la pared ( $p < 0,0001$ ) y área luminal ( $p = 0,0004$ ) En DP se observó diferencias entre E/E y N/N en: volumen total ( $p < 0,0001$ ), área de

sección transversal ( $p=0,0439$ ) y proporción de área de la región del laberinto, basal y decidua. Además, en el laberinto, la proporción ( $V_v$ , %;  $p<0,001$ ), superficie ( $S_v$ ,  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ;  $p=0,002$ ) y longitud ( $L_v$ ,  $\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$ ;  $p=0,006$ ) de vasos sanguíneos presentó diferencias entre grupos N/N vs N/E.

Discusión/conclusión. Nuestro estudio demostró que el periodo de exposición a humo de WCRH determina cambios en CU y DP. La exposición antes y durante la gestación (E/E) reduce el lumen de los vasos, lo que consecuentemente podría contribuir al bajo peso fetal observado. Además, la exposición de madres al humo de WCRH previo a la gestación determina una asociación negativa con el volumen del DP, al contrario, la exposición durante la gestación demostró un efecto negativo sobre la longitud, superficie y cantidad de vasos sanguíneos en DP.

Autor para correspondencia: paulo.salinas@pucv.cl

Financiamiento: Dirección de Investigación PUCV DI INICIACIÓN 039.378/2019

**EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE LA VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS EN HUEVOS Y EMBRIONES TEMPRANOS DEL PEZ DORADO *Seriola lalandi*.** (Expression of apoptosis extrinsic pathway molecules in eggs and early embryos of the yellow-tail kingfish *Seriola lalandi*).

Palomino J12, Otárola MT12, Dettleff P1, De los Reyes M1, Moreno RD2.

1Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

2Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La mortalidad embrionaria en el cultivo del pez *Seriola lalandi* es uno de los principales obstáculos que han frenado su desarrollo acuícola en nuestro país. Esta mortalidad se caracteriza por una pérdida de flotabilidad de huevos y embriones tempranos, la cual se debería a la participación del mecanismo de apoptosis celular. Estudios previos demostraron una mayor expresión de moléculas de la vía intrínseca, en huevos y embriones con baja flotabilidad en comparación con aquellos con una flotabilidad normal. De este modo, el objetivo de este trabajo fue determinar si en esta pérdida de flotabilidad, participan también moléculas de la vía extrínseca, como el sistema Fas/FasL y Caspasa 8. Para esto, se evaluó mediante Western Blot la expresión de las proteínas Fas y FasL y mediante RT-qPCR la expresión de Caspasa 8 en huevos y embriones de *S. lalandi* con diferente nivel de flotabilidad. La proteína Fas se expresó como una banda de 50 kDa en todos los embriones flotantes. Sin embargo, en los no flotantes se detectó en tres bandas reactivas de 40, 50 y 65 kDa. FasL (44 kDa) no se detectó en los embriones flotantes, mientras que en las muestras no flotantes se detectó en todos los estadios con un aumento ( $p<0,05$ ) en su expresión, en la medida que avanzó el desarrollo. La expresión del ARNm de Caspasa 8 fue mayor ( $p<0,05$ ) en las muestras no flotantes, en comparación con las flotantes, en todos los estadios del desarrollo. Estos resultados, confirman la presencia de moléculas de la vía extrínseca de la apoptosis en huevos y embriones tempranos de *S. lalandi*, con perfiles de expresión en las muestras no flotantes que representarían un estado pre-apoptótico de estas muestras. Sin embargo, se requieren estudios especie-específicos y complementarios para entender la naturaleza del agente inductor de la activación de esta vía.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 11140639

**CRYOPRESERVATION DISTURBS RAM SPERMATOZOA PHOSPHOLIPID CLASSES AND SUBCLASSES RICH IN SPECIFIC PUFA**

Luquez JM1, Carro MM2, Buschiazzi J2, Hozbor FA2, Aveldaño MI1, Furland NE1.

1INIBIBB, CONICET-UNS y Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, Bahía Blanca; 2Laboratorio de Calidad Seminal, INTA, Balcarce; Argentina. E-mail: jluquez@criba.edu.ar

Freeze/thawing procedures induce reactive oxygen species production and membrane injury in mammalian spermatozoa. Evidence indicates that cryotolerance and membrane lipid composition are related. Among mammals, ram sperm are known to be extremely vulnerable to cryopreservation. We previously confirmed deleterious effects of freezing on functional aspects of these gametes. Here, we investigated the effect of cryopreservation as a potential disturber of the sperm lipid profile. Semen samples were collected from mature rams during the autumn and cryopreserved using an egg yolk-free commercial extender. Lipid isolation, identification and quantification were performed using chromatographic techniques (TLC, GC, and HPLC). Mitochondrial functionality was evaluated by the probe Rhodamine 123, coupled with propidium iodide. Levels of 4-hydroxynonenal (4-HNE), a stable marker for lipoperoxidation, were measured in protein samples by Western Blot. In fresh ram spermatozoa, ether-linked (alkyl- and alkenyl- subclasses) of choline and ethanolamine glycerophospholipids (CGP, EGP) represented more than 70% of the total phospholipids (PL), with a remarkable

predominance of the plasmalogen plasmenylcholine (62% of PL). Unexpectedly, 22:6n-3 not only predominated at sn-2 in diacyl-, but it was the only PUFA present at sn-2 in alkyl- and alkenyl- subclasses of both PL. Cryopreservation did not affect the sphingomyelin species rich in very long chain PUFA. The subclasses of EGP also remained unchanged. In contrast, frozen-thawed spermatozoa showed markedly reduced levels of 22:6-rich alkyl- and alkenyl- subclasses of CGP. Concomitantly with an increase of 4-HNE levels and mitochondrial dysfunction, cryopreserved spermatozoa also showed a significant reduction of the mitochondrial PL cardiolipin, predominantly involving species with 18:2n-6, followed by 18:1n-9. The unique composition of ram spermatozoa lipid classes and subclasses may play a role in determining their high susceptibility to freezing. Further studies are still needed to understand the potential relationship between functional alterations and changes in lipid profiles.

### **¿TIENE LA ALTURA UN EFECTO SOBRE LOS PARÁMETROS SEMINALES Y FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO EN VARONES EVALUADOS POR INFERTILIDAD?**

(Have the altitude an effect on seminal parameters and sperm DNA fragmentation?)

Portella JR1,2, Luna M1, Alvarado A2, Cahuana R1, Rojas JC2, Jarufe F1, Ramal H2, Zevallos D2, Jara M1.

1 CEFERGIN. Centro Especializado de Fertilidad y Ginecología. Arequipa, Perú.

2 FERTÍLITA. Genética y Reproducción In Vitro. Trujillo, Perú.

Objetivo: Comparar los parámetros seminales y fragmentación de ADN espermático de varones evaluados en la primera consulta de fertilidad en dos ciudades de Perú a diferentes alturas, Trujillo (35 msnm) y Arequipa (2335 msnm).

Materiales y métodos: Estudio retrospectivo de casos realizados en los Laboratorios de Andrología de FERTÍLITA (Trujillo, n=135 pacientes; 37.4±7.5 años) y CEFERGIN (Arequipa, n=121 pacientes; 38.9±6.9 años), entre marzo 2018 y mayo 2019. Se utilizó el criterio de la OMS 2010 para el análisis de semen. La fragmentación de ADN espermático fue realizada por la técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) utilizando el kit Halosperm®. Se trabajó con el programa estadístico STATA12. Los resultados no presentan una distribución normal, se analizan por la prueba de U de Mann-Whitney y se expresan en mediana y rango intercuartil.

Resultados: La edad de los pacientes fue similar entre los grupos. La proporción de pacientes normozoospermicos (Concentración, motilidad y morfología) representaron el 63% en Trujillo y 47.9% en Arequipa. Los días de abstinencia (2;2-4 vs 3;2-3) al momento de obtener la muestra seminal fue menor en Trujillo que en Arequipa. Respecto a los parámetros seminales, sólo la motilidad progresiva (34%;25-40 vs 34.9%;16.7-49.2) fue similar entre los grupos. El volumen (2.6 ml;2-3.6 vs 2.4 ml;1.6-3), concentración en millones de espermatozoides por ml (45;22-85 vs 35.7;17-68), motilidad total (55%;43-67 vs 43.6%;27.8-58), viabilidad (77%;69-85 vs 67%;50.3-77) y la fragmentación de ADN espermático (16%;12-25 vs 10%;4-21) fueron estadísticamente mayores en Trujillo que en Arequipa (p<0.05). Finalmente, la tasa de espermatozoides normales en su morfología fue mayor en Arequipa (8%;5-12 vs 4%;4-5; p<0.05).

Conclusiones: La motilidad progresiva fue el único parámetro similar entre los pacientes de Arequipa y Trujillo. En la altura se observó un menor volumen, concentración espermática, motilidad total y viabilidad. Por el contrario, la morfología normal y espermatozoides con ADN no fragmentado fueron superiores en altura.

### **TRANSPORTE TERRESTRE DE OVOCITOS DONADOS VITRIFICADOS, DESARROLLO EMBRIONARIO Y TRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO: RESULTADOS PRELIMINARES ENTRE CIUDADES DE PERÚ.**

(Road transportation of vitrified donated oocytes, embryo development and single embryo transfer: preliminary results between cities in Peru)

Portella JR1,2, Alvarado A2, Chacha D2, Contreras SS2, Hermenegildo BN2, Mendoza MD1, Benavides VD1, Rojas JC2.

1 Instituto de Medicina Reproductiva Clínica Ricardo Palma. Lima, Perú.

2 Fertilita. Genética y Reproducción In Vitro. Trujillo, Perú.

Objetivo: Evaluar la sobrevida ovocitaria, desarrollo embrionario y tasa acumulativa de embarazo usando ovocitos vitrificados donados transportados vía terrestre por 12 horas en tanques de vapor de nitrógeno líquido.

Materiales y métodos: Se revisaron retrospectivamente los primeros 10 casos de ovocitos donados transportados por vía terrestre durante 12 horas en tanques de vapor de nitrógeno líquido, durante agosto 2018 y junio 2019. La vitrificación se realizó con el kit Cryotech (Reprolife, Japón) en el Instituto de Medicina Reproductiva Clínica

Ricardo Palma (Lima, Perú). La desvitrificación fue con el medio Kitazato (Kitazato, Japón) en el Centro Fértilita (Trujillo, Perú). El cultivo de los embriones se realizó en medio Global Total LP (CooperFertility, Canadá) bajo aceite mineral a 37 °C y un ambiente de 5% O<sub>2</sub>, 7% CO<sub>2</sub> y 88 % N<sub>2</sub>. Todas las transferencias de embriones fueron de embrión único. En 9 casos la transferencia de embriones fue realizada en el día 5 o 6 de desarrollo, mientras que en un caso la transferencia embrionaria y vitrificación fue realizada en el día 4. Los datos se expresan como porcentaje, promedio y desviación estándar.

Resultados: Se desvitrificaron 92 ovocitos para 10 pacientes (9.2±1.5 ovocitos/paciente). La tasa de sobrevivencia ovocitaria y fecundación fueron 96.7% (92/89) y 65.2% (58/89), respectivamente. La tasa de formación a blastocisto y blastocistos de buena calidad fueron 62% (31/50) y 77.8% (19/31). Los pacientes vitrificaron en promedio 2.6 (±2.2) blastocistos. De las 10 pacientes transferidas se obtuvieron 8 embarazos clínicos. En una de las pacientes se realizó una segunda transferencia con resultado positivo. Por lo tanto, la tasa de embarazo clínico acumulado fue de 90%.

Conclusiones: Estos resultados preliminares nos indican que el uso ovocitos donados vitrificados transportados vía terrestre por 12 horas no afecta el desarrollo embrionario ni la tasa de embarazo en Técnicas de Reproducción Asistida.

**ROL DE LOS CANALES DE Ca<sup>2+</sup> DEPENDIENTE DE VOLTAJE DE TIPO L EN LA ACTIVACIÓN DE LA MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDEOS DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).** (Role of the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel type L in the activation of sperm motility of atlantic salmon (*Salmo salar*)).

1Beltrán Lissabet, JF; 1Herrera Belén, L; 2-3J Risopatrón; 4I Valdebenito; 1-3Farías, JG.

1Departamento de Ingeniería Química. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

2Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

3Centro de Excelencia en Biotecnología en Reproducción (CEBIOR-BIOREN). Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

4Laboratorio de Biotecnología Acuícola. Universidad Católica de Temuco. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

La producción de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) constituye una actividad de gran peso para la economía de Chile. La motilidad espermática es uno de los mecanismos menos explorados desde el punto de vista molecular en *Salmo salar*, y una mejor comprensión de estos, pudiera tener un impacto directo en el desarrollo de nuevas tecnologías enfocadas en el aumento de la producción de esta especie. El Ca<sup>2+</sup> juega un papel clave en la motilidad espermática, sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan este proceso en *Salmo salar* permanecen prácticamente inexplorados. Se ha reportado que los canales de de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje de tipo L (CavL) son claves en la activación de espermatozoides en algunas especies de peces.

Objetivo: El objetivo del presente estudio fue evaluar la relevancia del canal dependiente de voltaje de tipo L en la motilidad espermática de *Salmo salar*.

Materiales y Métodos: Se realizaron análisis in silico (Modelación por homología, acoplamiento molecular, y dinámica molecular del CavL) e in vitro (Ensayo de inhibición de la motilidad espermática con verapamilo).

Resultados: Los análisis in silico revelaron que el verapamilo tiene su sitio de unión en el centro del poro del canal, donde se une con una elevada afinidad (-7,5 kcal/mol), probablemente impidiendo el influjo de iones Ca<sup>2+</sup>. El ensayo in vitro de inhibición demostró que el verapamilo (bloqueador de CavL) inhibe significativamente la motilidad espermática en *Salmo salar* (p<0,05).

Conclusiones: El canal de Ca<sup>2+</sup> dependiente de voltaje de tipo L juega un papel clave en la activación de la motilidad espermática de *Salmo salar*.

Agradecimientos: Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular Aplicada (Universidad de La Frontera), Universidad Católica de Temuco (Laboratorio de Biotecnología Acuícola) y la Empresa (Hendrix Genetics Chile). Financiamiento: proyecto FONDECYT N0 1180387 (Dr. Jorge G. Farías).

**TERATOZOOSPERMIA ASOCIADA A HIPERCOLESTEROLEMIA ALIMENTARIA: MECANISMOS SUBYACENTES.** (Teratozoospermia associated to dietary hypercholesterolemia: underlying mechanisms).

Fornes M.1,2, Funes A.1, Colombo R.1, Monclus MA.1,2, Boarelli P. 3, Ituarte L.2, Fernández M.2, Crescitelli J.2 Saez Lancellotti E.1,2.

1 Laboratorio de Investigaciones Andrológicas de Mendoza (LIAM), IHEM. Fac. Cs. Médicas – UNCuyo; CCT CONICET Mendoza. 2 Fac. Cs. Médicas. - UDA. 3 Laboratorio de Enfermedades Metabólicas (LEM) – UJAM. Mendoza, Argentina.

La hipercolesterolemia es un marcador de enfermedades crónicas no transmisibles del adulto (ECNT), que involucran patologías metabólicas y vasculares que impactan en corazón y cerebro, y; aunque menos conocido, también en testículo. La afección de túbulos seminíferos, motivo de este trabajo, puede dar una perspectiva sobre el efecto en etapas celulares como mitosis/meiosis o diferenciación celular. Utilizando un modelo (traslacional) de conejos adultos estudiamos el impacto de una dieta enriquecida en grasa sobre semen y espermatozoides. Utilizando alimento balanceado estándar solo o con 14% de grasa bovina, se conformaron el grupo control y experimental. En ambos se obtuvo: a. sangre quincenalmente para determinar colesterol, triglicéridos, glucemia y metil glicoxal; b. la presión arterial (PA) mediante esfigmomanómetro para conejos; y c. luego de 3, 6, 9 y 12 meses, muestras de testículo e hígado para realizar microscopía óptica y electrónica (con el fin de analizar estructura, ultraestructura y eficiencia testicular) y células de la espermatogénesis para detectar por inmunofluorescencia (IFI) los componentes del citoesqueleto. En conejos bajo dieta grasa se detectó: a. incremento de colesterolemia, sin aumento significativo de triglicéridos o glucemia, aunque el metilglicoxal – marcador de efectos negativos del incremento de glucemia y los productos de glicación – sí se incrementó; b. aumento de la PA; y c. una caída de la eficiencia tubular e incremento de apoptosis que llevan a ineficiencia tubular e hipospermia; asociada a una alteración estructural del complejo arosomaacroplaxoma-manchette que explica la teratozoospermia. Las fallas en la espermiogénesis causantes de anomalías morfológicas estarían relacionadas con deficiencias en la interacción de microdominios de membrana con actina-tubulina. Mayores esfuerzos estamos realizando en el control de la hipercolesterolemia mediante aceite de oliva virgen extra y dietas reducidas en grasa, así como análisis molecular de la regulación intracelular de colesterol via SREBP para conocer las bases de los defectos descritos.

**LA EXPOSICIÓN PRENATAL A UN EXCESO DE TESTOSTERONA ALTERA LA MORFOLOGÍA DE LOS TEJIDOS INSULINO-SENSIBLES EN MACHOS OVINOS POSTPUBERALES ENTEROS Y CASTRADOS.** (Prenatal exposure to a testosterone excess alters the morphology of insulin-sensitive tissues in intact and castrated post-pubertal male sheep)

Carrasco A1, Rojas-García P1, Rojas D1, Fuenzalida J1, Sanhueza-Vega J1, Caurapán-Montero A1, Sir-Petermann T2, Recabarren SE1.

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

2Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo, División Occidente, Escuela de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

La exposición prenatal a un exceso de testosterona (EPT) no sólo afecta a las hembras, sino también a los machos, siendo un factor que desviaría la trayectoria normal del desarrollo fetal de estos individuos. La consecuencia de esto es un aumento en la predisposición a padecer hipertensión, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo II (DMII). Asimismo, en machos adultos el hipogonadismo también se ha asociado con una disminución de la sensibilidad a la insulina y DMII. Estudios previos del laboratorio, han demostrado que la EPT en machos no alteraría la sensibilidad periférica a la glucosa. El objetivo fue evaluar el efecto de la EPT en los tejidos insulino-sensibles en machos ovinos post-puberales enteros y castrados. Ovejas gestantes fueron separadas en dos grupos, uno de ellos fue tratado con 30 y 40mg de testosterona entre los días 30-89 y 90-120 de gestación, respectivamente. Otro grupo de hembras sólo recibió el vehículo en el que se diluyó la testosterona. A las 24 semanas algunos machos fueron castrados (T/C-males y T/Corq-males). A las 38 semanas, se evaluó las características histológicas del músculo esquelético (ME), grasa visceral (GV) y grasa subcutánea (GS). El área y perímetro de la GV fue menor en el grupo tratado, en cambio ambos parámetros disminuyen en Corq-males y aumentan en Torq-males; en la GS el área y perímetro disminuye en los Torq-males. En T-males el área de las fibras-lentas aumenta y el de las fibras-rápidas disminuye, en Torq-males la proporción de fibras-lentas aumenta y disminuye el de las fibras-rápidas. La EPT en machos altera la morfología de los adipocitos de la GV y de las fibras-rápidas y lentas del ME lo que podría incidir en la sensibilidad de estos tejidos a la insulina y aumentaría el riesgo de padecer resistencia posteriormente a esta hormona.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT# 1140433.

**REDUCED GERM CELL NUMBER DUE TO A DISRUPTION IN THE EXPRESSION OF GENES RELATED TO LACTATE PRODUCTION AND TRANSPORT IN SERTOLI CELLS IN MALES PRENATALLY EXPOSED TO AN EXCESS OF TESTOSTERONE.**

Rojas-García PP1, Maliqueo M2, Echiburú B2, Sir-Peterman T2, Carrasco A1, Recabarren SE1, Sharbati S3, Einspanier R3.

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

2Laboratorio de Endocrinología y Metabolismos, División Occidente, Escuela de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

3 Institute of Veterinary Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany.

Less attention has been placed to the male offspring, and particularly to the male gonadal tissue, which can be a sensitive target to the reprogramming effects of testosterone (T) during prenatal development. During the past years our research group has focused on the testicular response to prenatal exposure to testosterone in the sheep model of the PCOS. We have demonstrated that male lambs born to dams receiving T (T male) during pregnancy have reduced number of germ cells but an increased number of Sertoli cells. After puberty, these animals yield a reduced amount of sperm and ejaculate volume and show an altered expression pattern of some genes that are critical in displaying a correct testicular function. These findings nurture a need to put attention to the male offspring of women bearing PCOS, and to its animal models. Our objective is to focus on the Sertoli cells, which regulate actively the fate of the germ cells by supplying a variety of factors included energetic substrates, like lactate. Lactate is utilized as an energetic substrate by germ cells, particularly spermatocytes and spermatids. The aim was to evaluate the gene expression of glucose transports, monocarboxylate transports and lactate dehydrogenase enzyme in testicular tissue derived from prepubertal male sheep at 24 weeks of age prenatally exposed to an excess of T. The gene expression of SCL2A8, SLC16A1, LDHA1 and LDHC1 were lower in the T males in compared to C males. These results indicate that a possible origin of these Sertoli-germ cells defective interaction that we have observed could be due to a disruption in the expression of genes related to lactate production and transport in the Sertoli cells and, therefore, the reduced germ cell number could be related to defects in energy metabolism at postnatal stage.

Supported by Fondecyt grant 1140433 and Freie Universität Berlin.

**EL ANTIOXIDANTE PENICILAMINA PROTEGE A ESPERMATOZOIDES HUMANOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO IN VITRO.** (The antioxidant penicillamine protects human sperm cells from in vitro-induced oxidative stress.)

Meriño J1, Zambrano F1,2, Schulz M1,2, Pezo F1, Sánchez R1,2 and Uribe P1,3\*.

Centro de Excelencia en Medicina Traslacional (CEMT - BIOREN)(1), Departamento de Ciencias Preclínicas(2), Departamento de Medicina Interna(3), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

\*Correspondencia a autor: pamela.uribe@ufrontera.cl

El estrés oxidativo (EO) desempeña un papel crítico en la etiología de la infertilidad masculina, ya que causa alteraciones en lípidos, proteínas y DNA, disminuyendo la capacidad funcional del espermatozoide. Diversos estudios han establecido el efecto protector de antioxidantes sobre parámetros seminales y el antioxidante penicilamina ha demostrado efectos beneficiosos, sin embargo, su efecto protector en espermatozoides humanos expuestos a EO no se ha reportado. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de penicilamina en espermatozoides humanos expuestos in vitro a EO. Primero, se evaluó el efecto individual de penicilamina sobre espermatozoides de donantes normozoospermicos. Luego, se analizó su efecto sobre espermatozoides expuestos a EO inducido tanto por ionomicina como por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En cada experimento se incluyó un control sin tratamiento y un control tratado solo con el inductor de EO. Se analizaron los niveles de EROs, la viabilidad, el potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la motilidad. Los resultados mostraron que penicilamina no afectó la viabilidad, el PMM ni la motilidad de espermatozoides humanos. Además, la adición de penicilamina al medio de incubación disminuyó significativamente los niveles EROs inducidos por ionomicina, lo que se asoció a una mejor preservación de la viabilidad, el PMM y la motilidad en comparación con el control tratado solo con ionomicina. De manera similar, en espermatozoides expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la adición de penicilamina resultó en menores niveles de EROs, mientras que el PMM y la motilidad se mantuvieron más altos

que en el control tratado solo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En conclusión, penicilamina ejerce un efecto protector sobre espermatozoides humanos sometidos in vitro a EO. La suplementación de los medios de incubación de espermatozoides con este antioxidante podría constituir una estrategia efectiva para preservar mejor la calidad espermática in vitro, sobretodo en muestras de semen con altos niveles de EROs.

Financiado por FONDECYT 11170758 y PAI-CONICYT 79160030

**SHORT-TERM STORAGE OF COHO SALMON SPERM (*Oncorhynchus kisutch*) AT 4 °C: EFFECT OF DILUTION ON SPERM FUNCTION.** (Almacenamiento a corto plazo de espermatozoides de Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) a 4 °C: Efecto de la dilución del semen sobre la función espermática).

Dumorné K1; Merino O1; Sandoval-Vargas L.Y2; Figueroa E3; Contreras P3; Valdebenito I3, Farías J4 Risopatrón J1,5.

1Center of Biotechnology in Reproduction (CEBIOR-BIOREN), La Frontera University, Temuco, Chile

2 Doctoral Program in Agricultural Sciences. Catholic University of Temuco, Temuco, Chile

3Temuco Catholic University, Faculty of Natural Resources, Temuco, Chile.

4Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and Science, La Frontera University, Temuco, Chile.

5Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

The selection of a proper medium is highly related to successful short-term storage of fish gametes. The main objective of this study was to evaluate the dilution effects on sperm function parameters to develop a short-term storage protocol for *Oncorhynchus kisutch* semen to facilitate artificial reproduction techniques. Undiluted semen samples (C: Control), diluted semen 1:2 (T1) and 1:3 (T2) in Storfish® medium were stored at 4 °C for 7 days. It was evaluated the sperm quality in terms of motility (MO), viability and integrity of plasma membrane (IMP), mitochondrial membrane potential (PMM) and superoxide anion production (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), these sperm parameters were evaluated at 0, 3 and 7 days of storage. The results showed that IMP and PMM were not affected during storage in all groups (P>0.05). Motility was no significantly affected in all the groups until 3 days (P>0.05), however, at day 7 significant differences were observed between T1, T2 compared to control: T1 (40 %), T2 (60 %), and Control (7.5 %) respectively (P>0.05). Regarding O<sub>2</sub><sup>-</sup> no significant differences were observed between all the groups for day 0 of storage (P>0.05), however, significant differences were observed at days 3 and 7: T1 (5.9 and 9.5 %), T2 (4.2 and 9.9%) and Control (5.07 and 11.3%), respectively (P<0.05). Short-term storage of sperm *O. kisutch* diluted 1:3 in Storfish® medium allows preserve the sperm quality for 7 days. This research provides new background on *O. kisutch* sperm quality with respect to short-term storage. The results of this research contribute to implementing the development of reproductive strategies not just *O. kisutch* sperm but also other marine and fresh water fish gametes in aquaculture industry where artificial insemination is performed usually.

Financial resources and Acknowledgments

This work was supported by La Frontera University/Postdoctoral (KD), National Fund Scientific and Technological Development (FONDECYT 1180387) and Center of Biotechnology in Reproduction (CEBIOR-BIOREN), Temuco, Chile. The authors are grateful to Marine Farm y Salmones Aysén S.A for the biological material provided.

**SHORT-TERM STORAGE SPERM OF COHO SALMON (*Oncorhynchus kisutch*) AT 4 °C: EFFECT OF ANTIOXIDANT BUTYL-HYDROXYTOLUENE (BHT) ON SPERM FUNCTION.** (Almacenamiento de espermatozoides de Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) a 4 °C: Efecto del antioxidante Butil-hidroxitolueno (BHT) sobre la función espermática).

Merino O1; Dumorné K1; Sandoval-Vargas L.Y2; Figueroa E3; Contreras P3; Valdebenito I3, Farías J4 Risopatrón J1-5.

1Center of Biotechnology in Reproduction (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

2Doctoral Program in Agricultural Sciences. Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile

3Research Center in Food Production, Department of Agricultural and Aquaculture Sciences, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile

4Department of Chemical Engineering, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile

5Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Short-term storage of semen is a key procedure in artificial reproduction and reproductive management in fish, it allows maximizing the use of gametes. However, sperm quality decreases during storage time, one of the factors that have been associated with this failure, is the oxidative stress (OE) generated by the high reactive oxygen species production (ROS). The objective of the present study was to evaluate the effect of Butyl-hydroxytoluene (BHT) antioxidant on the sperm function of *Oncorhynchus kisutch* sperm stored at 4 °C for 7 days. The sperm were diluted (Control) in Storfish® extender containing 1.0 (T1), and 2.0 mM BHT (T2) and subsequently stored at 4 °C for 7 days. Sperm parameters motility (MO), viability and integrity of plasma membrane (IMP), mitochondrial membrane potential (PMM) and superoxide anion production (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) were evaluated at 0, 3 and 7 days. The IMP remained > 75% during storage in all groups. PMM was significantly higher in groups T1 and T2 (P<0.05) at days 0 and 3 compared to the Control, tendency that remains at day 7 (P>0.05). Besides, O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in T1 and T2 were significantly less at days 0 and 3 than the Control (P<0.05), tendency that remained at day 7 (P>0.05). The MO (0 day= ≥ 90%) was significantly affected by storage time (P<0.05). MO were not different between the groups until day 3 (75%), however, it decreased in the T1 and Control at day 7 (65±9.5% and 60 ± 7.6%, respectively) compared with T2 (70 ± 3.7%) (P<0.05). Conclusion, BHT decreases production of ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), preserves high levels of PMM and MO during short-term storage of *Oncorhynchus kisutch* sperm. Supplementation of BHT 2.0 mM to the diluents, protects the function and cellular structure of *Oncorhynchus kisutch* sperm cells during short-term storage.

#### Financial resources and Acknowledgments

This work was funded by the National Fund for Scientific and Technological Development (FONDECYT 1180387), Temuco, Chile, Universidad de la Frontera Postdoctorate 2019 (KD), Temuco, Chile. Center of Biotechnology in Reproduction (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Our thanks to the companies Marine Farm and Salmones Aysén S.A for the biological material provided.

#### **EFFECTS OF DIFFERENT CRYOPROTECTANTS AND MEMBRANE STABILIZERS ON THE CRYOPRESERVATION OF COHO SALMON (*Oncorhynchus kisutch*) SPERM.** (Efecto de diferentes crioprotectores y estabilizantes de membrana en la criopreservación de espermatozoides de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*)).

Sandoval L1; Risopatrón J2-3; Dumorné K2; Merino O2; Figueroa E4; Farias J2-5 Valdebenito I6.

1Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

2 Centro de Excelencia de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

3Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

4Departamento de Ciencias Biológicas y Químicas. Universidad Católica de Temuco, Rudecindo Ortega 02950, Temuco, Chile.

5Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco Chile.

6Núcleo de Investigación en Producción Alimentaria, Departamento de Ciencias Agropecuarias y Acuícolas, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

Sperm cryopreservation is a useful tool for reproductive management. The aim of this study was to evaluate the effect of 36 cryomedium composed of two intracellular cryoprotectants (DMSO 8 and 10% and methanol, MeOH 9 and 12%), three extracellular cryoprotectants (0.18-M fructose, 0.18-M glucose and 0.14-M trehalose) and three membrane stabilizers (whole liquid milk 10%, hen egg yolk 10% and BSA 1%) on sperm quality post-thaw of *O. kisutch*. Semen from 32 males was evaluated in a series of equilibrium and cryopreservation experiments until the selection of best cryomedium. Semen was diluted in a 1:3 ratio in each cryomedium, loaded in 0.5 mL straws, equilibrated for 8 min at 4 °C and frozen at a ratio of 70 °C/s, and subsequently immersed in N2L until the evaluation. After thawing (40 °C, 10 s), the success of sperm cryopreservation was initially assessed by sperm motility while in the 5 better cryomedium were evaluated the fertility (9 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/egg ratio), viability, mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_{mit}$ ) and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production by flow cytometry. The equilibrium time for 5 to 60 min had not negative effect on the percentage of sperm motility in the 36 diluents. There was post-thaw motility in nearly all the treatments evaluated, nevertheless the preliminary results show higher motility (16.73 ± 11.02 and 24.08 ± 13.10 %), viability (21.88 ± 13.64 and 39.94 ± 5.26 %),  $\Delta\Psi_{mit}$  (13.56 ± 3.3 and 14.66 ± 0.77 %) and fertility (35 ± 13.23 and 31.67 ± 10.41 %) were yielded with DMSO 8 and 10%, respectively combined in both cases with glucose + egg yolk; with only significant differences for viability.

Neither was differences among O<sub>2</sub>- production ( $19.54 \pm 7.40$  and  $19.18 \pm 2.27$  %). In conclusion, DMSO in combination with glucose and egg yolk is the most suitable cryomedium for cryopreserves the sperm quality of *O. kisutch*.

Acknowledgements: The authors would like to acknowledge to the companies Marine Farm and Salmones Aysén S.A by provided the biological material. This study was supported by: the research project 4136-2018 funded by Temuco Catholic University, the National Fund Scientific and Technological Development (FONDECYT 1180387), the Center of Biotechnology in Reproduction (CEBIOR-BIOREN) and the Aquaculture Biotechnology Unit (BIOACUI), Temuco, Chile.

### **ROLE OF AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE (AMPK) IN MOTILITY OF FRESH AND CRYOPRESERVED SPERMATOOZOA FROM ATLANTIC SALMON (*Salmo salar*).**

Lee-Estevez M.1,2, Herrera L.1, Díaz R.1,2, Beltrán J.F.1,2, Figueroa E.3,4, Dumorné K.1,2, Ulloa-Rodríguez P.1,2, Short S.1,2, Risopatrón J.2, Valdebenito I.3 and Farías J.1,2.

1Department of Chemical Engineering. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

2Center of Biotechnology of Reproduction (CEBIOR), Bioresources Research Nucleus (BIOREN). Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

3School of Aquaculture. Catholic University of Temuco. Temuco, Chile.

4Laboratorio de Biotecnología. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Sperm motility in external fertilization fish lasts for short time, being important for reproduction efficiency in aquaculture. However, gametes preservation techniques, such as cryopreservation, reduce motility and fertilization rate. Since very few studies have addressed cryodamage from energetic and cell signaling approaches, the objective of this study was to determine the activity of AMP-activated protein kinase (AMPK) in fresh and cryopreserved spermatozoa of Atlantic salmon (*Salmo salar*); and to analyse its possible relation with motility. Reports indicate that AMPK is involved in sperm motility of mammalian and avian spermatozoa; and activation of the enzyme improves sperm function and antioxidant defenses after cryopreservation. AMPK quantity and activity were measured by ELISA, while motility and plasma membrane integrity were measured by CASA system and flow cytometry respectively. Results were expressed as mean  $\pm$  SD; Wilcoxon and Friedman's non-parametric tests were used for comparisons with significance level of  $P < 0.05$ . Results showed significant decrease of membrane integrity and motility in post-thawed spermatozoa compared to fresh samples, however, about 30% of cells had intact plasma membrane but did not activated motility. AMPK activity in fresh samples increased after motility activation in a time-dependent manner, positively correlating with AMP concentration. In cryopreserved spermatozoa, however, AMPK activity significantly decreased after cryopreservation, which might be related to the loss of motility. Moreover, AMPK activity positively correlated with motility and plasma membrane integrity, and inhibition of the enzyme using BML-275 decreased motility in dose-dependent manner. Activation using A-766992, though, did not show statistically significant effect on sperm motility. Although AMPK is reported in fish muscle tissue, no report in fish spermatozoa have been found, making these results very interesting and worthy of further study, and may serve as base knowledge for optimization of cryopreservation procedures and development of biotechnological tools to improve reproduction efficiency in aquaculture industry. Acknowledgments: This work was supported by FONDECYT Regular Project No. 1180387 (FJ), FONDECYT. Post-doctoral project N°3160572 (DR), Universidad de La Frontera POSTDOCTORAL 2019 (DK) and CONICYT National Doctorate Scholarships No. 21150246 (LEM), 21170061 (HL) and 21150278 (SS).

### **CARACTERIZACIÓN DEL SEMEN DE ROBALO PATAGÓNICO (*Eleginops maclovinus*) DURANTE CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO *IN-VITRO* (Patagonian blenny (*eleginops maclovinus*) sperm characterization during *in-vitro* storage conditions)**

<sup>1</sup>Ulloa Rodríguez, PH; <sup>2-3</sup>Risopatrón, J; <sup>4</sup>Valdebenito, I; <sup>1-3</sup>Farías, JG.

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Química. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

<sup>3</sup>Centro de Excelencia en Biotecnología en Reproducción (CEBIOR-BIOREN). Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

<sup>4</sup>Laboratorio de Biotecnología Acuícola. Universidad Católica de Temuco. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

El róbalo Patagónico (*Eleginops maclovinus*) es una especie marina potencialmente cultivable. Mantener sus gametos *in-vitro* es un aspecto clave para iniciar programas de propagación artificial de esta especie. Objetivo: Caracterizar el semen de róbalo Patagónico y estudiar sus parámetros de calidad durante el almacenamiento a 4°C. Materiales y Métodos: Las muestras fueron obtenidas de machos maduros (2 años de edad, N=30) mediante masaje abdominal, seleccionadas y dispuestas en un pool para ser almacenadas a 4°C. Muestras frescas fueron procesadas para ser analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM). Se extrajo plasma seminal para analizar su pH y osmolaridad. Muestras almacenadas por 14 días fueron procesadas para evaluar estimadores de calidad. Resultados: Se describió la organización de los espermatozoides analizados (longitud total=  $40,08 \pm 2,30 \mu\text{m}$ ), el pH ( $7,5 \pm 0,1$ ) y osmolaridad ( $346 \pm 14 \text{ mOsm/kg}$ ) del plasma seminal. Se observó daño severo de la membrana plasmática desde el séptimo día de almacenamiento. Durante las primeras horas de almacenamiento se observó un  $81,1 \pm 9,2\%$  de espermatozoides (spz) motiles,  $88,0 \pm 8,5\%$  de spz con alta integridad de membrana,  $81,8 \pm 4,2\%$  de spz con alto potencial de membrana mitocondrial,  $35,5 \pm 23,0\%$  de spz con altos niveles de anión superóxido, conteniendo  $10,56 \pm 2,34 \text{ nmoles ATP } 10^{-9} \text{ spz}$ . La pérdida de calidad durante su almacenamiento fue significativa ( $P < 0,05$ ) hasta perder total viabilidad posterior al día 14. Conclusiones: La organización espermática, el pH y osmolaridad del plasma seminal de róbalo Patagónico es acorde a los atributos de los espermatozoides de teleosteos modernos de fecundidad externa. Los métodos utilizados en este trabajo para la evaluación de los estimadores de calidad probaron ser útiles para determinar asertivamente la calidad pre-fecundación de los espermatozoides.

Agradecimientos: Universidad Católica de Temuco (Laboratorio de Biotecnología Acuícola) y al Centro Experimental Quillaipe (Fundación Chile). Financiamiento: Beca Doctorado Nacional Conicyt 2014 N° 2114082 y FONDECYT N° 1180387 (Dr. Jorge G. Farías).

#### **LOCALIZACIÓN Y PARTICIPACIÓN DE LA UBA1 DURANTE LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO.** (Location and participation of the UBA1 during human sperm capacitation)

Barón, L. 1-2, Rodríguez, C. I., Zapata-Carmona, H. I., Morales, P. 1-2

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

2Instituto Antofagasta. Universidad de Antofagasta. Antofagasta. Chile.

La capacitación espermática es un proceso que se desarrolla en el aparato reproductor femenino y es indispensable para la fecundación interna. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que la actividad del proteasoma es necesaria para el proceso de capacitación. La degradación de proteínas por el proteasoma requiere que estas sean previamente poliubiquitinadas. La primera enzima que participa en el proceso de ubiquitinación, es la enzima activadora de la ubiquitina E1 (UBA1). El objetivo de este trabajo fue evaluar la localización y participación de esta enzima durante el proceso de capacitación espermática. Con este propósito, espermatozoides humanos fueron seleccionados a través de una gradiente de percoll y, luego, incubados en medio capacitante (suplementado con 2,6% BSA y 25 mM bicarbonato). Alícuotas fueron incubadas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> por diferentes tiempos (0 y 300 minutos) en presencia y ausencia de Pyr-41 un inhibidor de la UBA1. Mediante la técnica de western blot se evaluó la presencia de UBA1 y el patrón de fosforilación de sustratos de PKA ( $\alpha$ -pPKAs). La localización de UBA1 fue evaluada mediante inmunofluorescencia y el porcentaje de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (Tyr-P) por citometría de flujo.

Los resultados indican que los espermatozoides humanos expresan dos isoformas de UBA1 de peso molecular aproximado 117 y 110 kDa. La localización de UBA1 es detectada en el flagelo, pieza de conexión y en el segmento ecuatorial. El tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pyr-41 cambia el patrón de fosforilación de  $\alpha$ -pPKAs y disminuye el porcentaje de Tyr-P durante los 300 min de capacitación.

En conclusión, la enzima UBA1 está presente en espermatozoides humanos y además contribuye en el proceso de capacitación.

Financiado por “Fondo Puente de Investigación de Excelencia” de la Universidad de Antofagasta.

## **THE INSULIN SENSITIZER MECHANISM OF MYO-INOSITOL IS ASSOCIATED TO AMPK ACTIVATION AND GLUT-4 EXPRESSION IN HUMAN ENDOMETRIAL CELLS EXPOSED TO A PCOS ENVIRONMENT.**

Oróstica L1,2, Cabrera-Cruz H1, Plaza-Parrochia F1, Torres-Pinto I1, Romero C1, Vega M1.

1Laboratorio Endocrinología y Biología de la Reproducción, Hospital Clínico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

2Laboratorio de Comunicaciones Celulares, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

The Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is an endocrine-metabolic prevalent disorder in women, characterized by hyperandrogenism and insulin resistance (IR), affecting their fertility. Since last decade, Myo-inositol (MYO), a cellular endogenous compound, has been studied as an insulin-sensitizer for PCOS patients. MYO enters the cells through a specific Sodium-Myo-inositol transporter (SMIT-1), increasing glucose uptake; SMIT-1 is decreased in endometrium from PCOS women with IR. However, MYO molecular mechanisms are unknown. The aim of this study was to evaluate MYO insulin-sensitizer mechanism in endometrial cells in PCOS conditions.

For this, we used an in-vitro model of human endometrial stromal cells (St-T1b cell line) to assess the effect of MYO under hyperandrogenic and hyperinsulinic conditions (HA/HI). Protein levels of SMIT-1, GLUT4 and phosphorylation rate of AMPK were evaluated. Also, we evaluated the role of SMIT-1 and of AMPK activation in MYO effect on endometrial cells.

The data indicate a negative effect of testosterone on SMIT-1 levels ( $p < 0.01$  vs Basal), being reverted by MYO-treatment. Under HA/HI, lower GLUT4 protein-levels were found, restored to basal levels with MYO treatment ( $p < 0.001$ ). The phosphorylation of AMPK significantly decreases in HI/HA conditions ( $p < 0.01$ ), whereas MYO restore these levels to basal condition. Interestingly, MYO effect on GLUT-4 levels it was not observed in presence of an inhibitor of SMIT-1 (Phloridzin) ( $p < 0.01$ ) or an inhibitor of AMPK activation (Dorsomorphin).

These findings indicate that MYO insulin-sensitizer mechanism in endometrial cells under PCOS conditions is dependent on SMIT-1 transporter and AMPK activation to re-establish GLUT-4 levels to a normal condition.

FONDECYT #1130053 (MV)

## **PREVENTIVE EFFECT OF MACA (*Lepidium meyenii* Walp.) ON REPRODUCTIVE ACTIVITY AND ESTRUS CYCLICITY OF RATS EXPOSED TO INTERMITTENT HYPDXIA (IH).**

Cikutovic M1\*, Cikutovic R2, Wulff C1, Farias J3.

1Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Antofagasta, Antofagasta, Chile.

2Laboratory Medical Research Center, University of Talca, Talca, Chile.

3Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and Chemistry, University of La Frontera, Temuco, Chile. \*email: decano.facs@uantof.cl

AIMS: 1. Determining, in rats Sprague Dawley exposed to IH, if the decreased number of live pups per litter previously observed by the authors, correlates with alterations in estrous cyclicity females. 2. Evaluate if the use of Maca flour as a food nutritional supplement, allows to reverse or mitigate the deleterious effects of IH on the reproductive activity of Sprague Dawley rats.

METHODS: We worked with rats Sprague Dawley at sea level and exposed to IH, fed with food supplemented with Maca flour in both conditions. Estrous cycle was evaluated by vaginal smears and optical microscopy. Finally, once the mating was made, the number of pregnant females and new borns per litter was counted. The differences between groups were calculated using one-way Anova analysis considering a  $p < 0.05$  statistically significant. Data are shown as mean  $\pm$  SE. All the procedures have been approved by the Ethical Committee for Animal Research (ECAR) of the University of Antofagasta-Chile (UA) and were carried out according to the determinations of the same organization.

RESULTS: IH causes a significant alteration in the number of pregnant females and the size of the litters being significantly diminished, compare to the Control group. Even the estrous cycle was altered, with most rats presenting an acyclicity and anovulation. All the alterations observed could be reversed through the use of 20% Maca flour, having a reproductive behavior like those of the Control group present at sea level.

**CONCLUSION:** In rats, supplemented with Maca flour, it is feasible to minimize the effects of altitude. The number of offspring gestated by mothers, submitted to IH, supplemented with Maca flour, is significantly higher than that corresponding to mothers not supplemented. The protective effect of Maca, on reproductive activity, is expressed by regulating the Estrous cyclicity and, consequently, the gestational process and the size of the litters of rats subjected to IH.

**ACKNOWLEDGMENT:** Financed from Network for extreme environment research (NEXER), ANT1756 MINEDUC, University of Antofagasta, Minera Escondida Ltda. (MEL), and Research Directory of University of Antofagasta.

**EXPRESIÓN DIFERENCIADA DE LIGANDOS DEL RECEPTOR DE ACTIVACION DE NATURAL KILLER EN ENDOMETRIOS DE MUJERES FERTILES E INFERTILES CON ENDOMETRIOSIS.** (Differential expression of ligands for natural killer activation receptor in endometria from fertile and infertile women with endometriosis).

Johnson MC1, Muñoz A1,3, Palacios V4, Mendoza T4, Vega MJ4, Torres M1, Fuentes A1, Ribeiro C2, Molina MC2.

1Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) y 2Prog Disciplinario de Inmunología (ICBM), 4Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 3Hospital San Borja Arriaran. Santiago, Chile.

La endometriosis es una patología ginecológica, invasiva benigna asociada con infertilidad. Defectos en el sistema inmune han sido involucrados en su etiología. El objetivo fue estudiar los ligandos MIC-A, MIC-B y ULBP-1, -2 y -3 del receptor de activación NKG2D de células natural killer (NK) en endometrios eutópicos de fases secretora media (SM) y tardía (ST) provenientes de mujeres fértiles (EF; n=8) e infértiles (EIF; n=12) con endometriosis y compararlos con endometrios de mujeres fértiles controles (CF; n=24). Los endometrios se obtuvieron con Pipelle durante la cirugía diagnóstica de endometriosis o salpingoligadura. Se analizaron las proteínas MIC-A, MIC-B y ULBP-1, -2 y -3 por inmunohistoquímica y se evaluó la intensidad de la densidad óptica (IOD) de la marca positiva de MIC-A y MIC-B. Se analizaron los datos con el test Kruskal Wallis seguido por test de Dunn ( $p < 0,05$ ). Marca positiva café fue detectada con diversa intensidad en los 3 grupos de endometrios mayor intensidad en el epitelio que en el estroma; ULBP-1 y ULBP-3 se encontraron también secretado en el lumen de algunas glándulas. MIC-A incrementó su marca en ST vs. SM en CF y EF, pero no en EIF; MIC-B no se modificó significativamente en ningún grupo. El IOD de MIC-A en EIF fue significativamente mayor comparado a CF (238%) y a EF (152%) durante la SM. Podemos concluir que el diferente patrón de MIC-A entre las fases SM y ST en CF sugiere una participación de esta proteína de activación de NK durante la implantación e invasión embrionaria. La similar expresión de MIC-A en CF y EF, pero muy elevada en las EIF sugiere que MIC-A estaría participando en la fertilidad más que en la etiología de la endometriosis.

FONDECYT 1120074 y Puente-ICBM 2018 (U de Chile)

**CARACTERIZACION SEMINAL DE PACIENTES BENEFICIARIOS DEL SISTEMA DE GARANTIAS EXPLICITAS DE SALUD (SIGES) POR CANCER TESTICULAR PREVIA CRIOPRESERVACION DE GAMETOS (2006-2019).** (Seminal characterization in explicit health guarantees law patients (SIGES) before gametes criopreservation (2006-2019).

Diaz Fontdevila M, Inostroza P.

Instituto de Investigaciones Materno Infantil Facultad de Medicina.

Universidad de Chile. Hospital clínico San Borja Arriarán.

**Objetivo:** realizar un análisis retrospectivo de los parámetros seminales de pacientes que acudieron al IDIMI entre los años 2006 a Julio del 2019, a criopreservar gametos como beneficiarios del Banco de Semen del Laboratorio Clínico de Andrología, dentro del marco de SIGES por cáncer testicular, para evaluar la calidad seminal de los mismos.

**Materiales y Métodos:** análisis de resultados de los parámetros seminales de 283 pacientes (OMS, 2010) que criopreservaron gametos por cáncer testicular.

**Resultados:** Los resultados se basaron en el análisis de 679 muestras, obtenidas entre los años 2006-2019. Un 42 % de los pacientes se tomaron 1 muestra, 36 % 2 muestras, 19 % 3 muestras y 3% 4 muestras, solo un paciente no pudo emitir muestra. Se registró un 3 % de pacientes fallecidos. El rango de edad va entre 15 y 47 años. Se determinó un 45 % de pacientes con recuento mayor de 15 millones/ml, mientras un 49 % presentó

oligozoospermia, y un 6 % azoospermia. Solo 25 % presento astenozoospermia mientras 52 % presentó hipospermia. Los testículos afectados correspondieron a: derecho en un 46%, izquierdo 40% y 7 % ambos testículos, se constató que un 7% no registró el testículo afectado. Respecto a la histología del cáncer testicular: en la mayoría de los casos, ya que muchos pacientes acuden de regiones, no tuvimos acceso al informe de la biopsia testicular al momento de la orquiectomía (42%) denominados No Registrados, sin embargo un 23 % correspondió a Seminoma, 18 % a No Seminoma y 17% fue Mixto.

Conclusiones: Los pacientes con histología Mixta y los No registrados presentan diferencias en su recuento respecto a los portadores de Seminoma o No Seminoma. Se registró menor volumen y recuento en pacientes que presentan afectados los 2 testículos. La motilidad progresiva fue menor en los pacientes oligospermicos.

### **MARIJUANA SMOKING IS NOT RELATED TO POSITIVE OR NEGATIVE CHANGES IN SEMINAL QUALITY OF SUBFERTILE SUBJECTS.**

Florez, M; Maldonado, G; Costa, S; Parada-Bustamante, A.

Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI); Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Marijuana consumption has increased in recent years, mainly in men of reproductive age. Previous studies have showed that the consumption of marijuana in subfertile subjects is related to a detriment in sperm quality. However, a recent study showed that its consumption also has positive impact on sperm concentration in this population of subjects. In this study, we evaluated whether marijuana and/or the frequency of its consumption is related to alterations in sperm parameters in a population of subfertile subjects in Chile.

We carried out a retrospective analysis of the semen data of men who approached our institute on infertility issue between 2017-2019, among them those who had consumed marijuana over the last three months at least (consumers) and those who had not consumed marijuana (non-consumers). The exclusion criteria were consumption of other drugs, cryptorchidism, smokers of more than 5 cigarettes of tobacco daily and consumption of antioxidants. The data were analyzed using the Kruskal Wallis test, followed by the Mann-Whitney test for the comparison of sperm parameters between consumers and non-consumers, and the Spearman test in order to correlate sperm parameters with the number of marijuana cigarettes smoked weekly. A total of 45 consumers and 248 non-consumers were included in this study. No significant differences were found in volume, sperm concentration, motility, vitality or percentage of sperm with morphological alterations in the ejaculate between the consumer and non-consumer subjects. The number of marijuana cigarettes consumed weekly only showed to be positively related to the number of round cells present in the ejaculate ( $R = 0.3077$ ;  $P = 0.0397$ ).

To conclude, our results show that marijuana consumption is not related to an evident improvement or worsening in the sperm quality of subfertile subjects in our population.

### **ADMINISTRACION DE ACETATO DE ULIPRISTAL (UPA) A MITAD DE CICLO SU EFECTO SOBRE LA EXPRESION GENICA ENDOMETRIAL.**

Jiménez Guerrero MP.1, Fava M.2, Baccaro L.2, Caille A.M3., Cuasnicú P.S4., Horcajadas, J.1, Cohen D.J.4, Cotán, D.1, Munuce M.J.3.

1Área de Genética, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-SINAE, Sevilla, España.

2Departamento de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Campinas, Brasil.

3Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

4Laboratorio de Medicina Reproductiva. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Argentina.

El objetivo fue estudiar el efecto del UPA sobre el perfil de expresión génica en endometrio de pacientes que recibieron UPA a mitad del ciclo.

Material y Métodos: Se analizaron 3 ciclos consecutivos mujeres fértiles, esterilizadas (n=4). Se monitorizó la ovulación y la fase lútea (LH y progesterona). La biopsia endometrial (BE) se tomó en el LH +6 a 8 en el primer ciclo (B), segundo ciclo (T) luego de la ingesta de UPA (30 mg) en día LH+2 y tercer ciclo 2 meses post-toma (PT). Se determinó la expresión génica por PCR cuantitativa de un panel de 192 genes relacionados con receptividad endometrial e inmunología. A partir de los Cqs normalizados con respecto a los genes

constitutivos se calculó el Fold-Change (FC) para determinar la expresión diferencial del ciclo T respecto a B y PT. Se realizó un análisis de ontología (GO) para determinar la función biológica de los genes representativos.

Resultados: El análisis de FC muestra una tendencia a la represión de los genes en T respecto de B. El análisis de componentes principales y discriminantes mostró que se debía a 11 genes la varianza entre B, T y PT donde el análisis canónico discriminante muestra que están bien diferenciados. Los términos GO más significativos muestran que en T hay genes reprimidos respecto a B asociados a la regulación del envejecimiento, respuesta a iones y procesamiento y maduración proteica, y genes con mayor expresión relacionados con la regulación de transporte de metales. La comparativa PT respecto T muestra menor expresión en genes de regulación potasio y desarrollo sistema nervioso y sobreexpresión en genes asociados a la interacción y fecundación.

Discusión: Esto sugeriría que la administración del UPA en mitad del ciclo tendría un efecto represivo sobre genes asociados a la receptividad uterina (mayormente involucrados en el transporte iónico) el cual podría revertirse.

Financiación: UNR, BIO 486 y BIO 565 a MJM.

### **ESTUDIO DE CASOS EN VARONES JÓVENES CON OBESIDAD MÓRBIDA: PERFIL HORMONAL TESTICULAR y CALIDAD SEMINAL.**

1Craia MC, 2Massoni C, 3Vicentin M, 3Grimoldi M, 4Martinelli RP, 1Caille AM, 3Tioni R, 3Marcolini A, 3Awruch D, 2Svetaz MJ, 5 Posadas M y 1Munuce MJ.

1Laboratorio de Medicina Reproductiva, Área Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

2Laboratorio de Endocrinología, Hospital Provincial del Centenario de Rosario.

3Unidad de Cirugía Bariátrica y Metabólica-Sanatorio Británico de Rosario

4Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

5Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

La obesidad es un problema de salud mundial, con particular incidencia en la población de hombres jóvenes, entre los que aumentó el número de consultas por infertilidad. Desde el punto de vista fisisiológico, el exceso de tejido adiposo produciría una mayor conversión de la testosterona en estradiol que llevaría a un hipogonadismo secundario con posible impacto en la espermatogénesis y la producción de hormonas testiculares (HT).

Objetivos: Evaluar el perfil de HT y la calidad seminal de pacientes obesos en edad reproductiva.

Metodología: Se incluyeron hombres que iban a cirugía bariátrica, menores de 45 años e Índice de masa corporal (IMC)>40 (n=8). El estudio seminal se realizó de acuerdo a normas OMS (2010) utilizando un sistema computarizado de análisis del movimiento. Se incluyó el estado de fragmentación del ADN (índice fragmentación, IF) y la inmadurez nuclear (IN). Se determinó por ECLIA el perfil de HT (FSH, LH, Testosterona total (TT) y libre (TL) y SHBG). Todos los pacientes firmaron consentimiento informado. Los datos se muestran como mediana y rango.

Resultados: La edad fue de 31,5 (21-37) años con un IMC de 46,75 (40-55,8).

Espermograma: Volumen: 3,5(1-7) ml, Concentración: 23,5 (9-136) mill/ml,

Progresivos: 53,7 (22,74-89,7) %, VCL: 57,6 (51,5-78,3)  $\mu$ m/s, VAP: 41,2 (35,1-48,2)  $\mu$ m/s, LIN 53,5 (41,7-66,5) %, Formas normales: 5,5 (2-8) %, IF: 19,5 (11-47) % y IN: 16 (9-35) %.

HT: FSH: 2,7 (0,5-5,1) mUI/ml, LH: 4,4 (2,5-6,7) mUI/ml, TT: 4,2 (2,5-8,3) ng/ml,

TL: 102, 5 (60, 3-124) pg/ml, SHBG: 27, 7 (15-64, 5) nmol/l.

Es de destacar que en 7 de 8 pacientes analizados el IF fue >15% (> 15 % moderado, > 30% severo).

Conclusión: Si bien los pacientes incluidos presentaban obesidad mórbida, esto no se ve reflejado en un impacto sobre el eje hipotálamo-hipofisis-gonadal, ya que las HT así como la calidad seminal se movieron dentro de valores esperados para una población joven. Sin embargo, el hallazgo de un IF >15% en la mayoría de los pacientes, sugiere incluir este parámetro dentro de la evaluación inicial para prevenir potenciales trastornos reproductivos en pacientes obesos.

Proyecto financiado por la Secretaria de Vinculación Tecnológica y desarrollo Productivo. Universidad Nacional de Rosario, Resolución CS 573/2018.

**LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS QUÍMICOS INDUCEN AUMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO Y ALTERACIONES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.** (Endocrine disruptor chemicals induce an increase in the production of reactive oxygen species and plasmatic membrane alterations in human spermatozoa)

Quilaqueo, N.1, 2, Bravo, A.2, Jofré, I.2, Villegas, J.V. 2, 3

1Magister en Ciencias mención Biología de La Reproducción, 2Laboratorio de Andrología Molecular y Celular, Centro de Excelencia en Biotecnología de la Reproducción, 3Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Los disruptores endocrinos químicos (DEQs) incluyen moléculas sintéticas utilizadas en la elaboración de diversos productos de uso común, como plásticos, insecticidas, herbicidas y productos de cuidado personal, entre otros. DEQs afectan la salud humana a nivel endocrino y reproductivo, alterando la fisiología celular. El objetivo de este trabajo es determinar las alteraciones inducidas por los DEQs: 4-octilfenol (4-OP), triclosan (TCS) y dibutil ftalato (DBP), sobre la membrana plasmática y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en espermatozoides humanos. Para esto, espermatozoides seleccionados por swim-up, se trataron con 4-OP, TCS y DBP. A continuación, se analizó la viabilidad celular con yoduro de propidio (PI), la permeabilidad de la membrana plasmática con YO-PRO-1 y los niveles de EROs con la sonda dihidroetidium (DHE). Los parámetros de motilidad se determinaron mediante CASA (Computer-Aided Sperm Analysis), utilizando el software ISAS (Integrated Sperm Analysis System). Los análisis de los métodos fluorescentes se realizaron por citometría de flujo. Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 6 y se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un test de comparación múltiple de Dunn. Los resultados muestran disminución de la viabilidad y de la motilidad, junto con aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y de la producción de EROs. Estos resultados sugieren un efecto negativo de los DEQs sobre la estructura de la membrana celular, lo que conlleva a la disminución de la viabilidad y a la pérdida de la motilidad. Todos estos efectos pueden asociarse al aumento en la producción de EROs, observada en los espermatozoides expuestos a DEQs.

Financiado por DI10-0021, Universidad de La Frontera.

**ANALYSIS OF FREE FATTY ACID-GPCRS EXPRESSION IN SPERMATOGENIC CELL LINES, GC-1spg AND GC-2spd(ts), POTENTIAL RECEPTORS FOR FREE FATTY ACIDS.**

Díaz-Astudillo Pamela<sup>1</sup>, Berrios Catalina Ignacia<sup>1</sup>, Osses Nelson<sup>1</sup>, Reyes Juan Guillermo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

Spermatogenesis takes place in the seminiferous tubules, where spermatogonia differentiate to haploid gametes. Sertoli cells are the somatic cells in the seminiferous tubule supporting spermatogenesis and there is a two-way conversation between them through an autocrine/paracrine regulated system. Sertoli cells have shown to release arachidonic acid (AA) in a FSH-dependent manner through activation of phospholipase A2 (PLA2). Paillamanque et al (2016 and 2017) showed that free fatty acids (FFAs) can increase cytosolic calcium in rat pachytene and round spermatids, most likely by binding to G protein coupled receptors. There is evidence showing that impairment in FFAs synthesis can cause infertility in murine models. Mice testis proteomics show the presence of PLC, Lysophospholipase-1 and Fatty acid-binding protein in the testicular fluid, suggesting a regulatory crosstalk between SCs and germ cells. Therefore, the present evidence suggests that AA and likely other FFAs are part of the regulatory network controlling the spermatogenesis in rodent seminiferous tubules and this regulation can be mediated by GPCR activation. In this work, Gc-1spg and Gc-2spd cell lines were used to evaluate the effect of temperature (37°C and 33°C) on free fatty acid-GPR expression. GPR120 and GPRB4 showed to be differentially regulated at 37°C and 33°C at the mRNA level and GPR40 and GPR120, both potential receptors for arachidonic acid, were detected by immunocytochemistry and western blots in both cell types. While GPR120 was reported in rat seminiferous tubules before, this is the first report of these receptors in a mouse germinal cell model. Moreover, GPR40 is a known receptor for docosahexanoic acid (DHA) and DHA supplementation can fully restore fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. These findings set the foundations to test the FFAs effect on in vitro GC1 and GC2 germ cell proliferation and differentiation at 33 and 37°C.

Funded by PUCV. DI -2A18-2019.

**EFFECTO DEL SOBREPESO/OBESIDAD PREGESTACIONAL SOBRE EL ÉXITO REPRODUCTIVO Y SUPERVIVENCIA NEONATAL EN GESTANTES ATENDIDAS EN EL HOSPITAL NACIONAL SANTA ROSA EN LA REGIÓN LIMA DURANTE EL PERÍODO 2012-2016: ESTUDIO COMPARATIVO.** (The effects of the pregestational BMI on reproduction and infants survival in a sea level population during 2012-2016).

Rojo Fleming C1, Valverde Bruffau V1, Gonzales GF1,2

1Laboratorio de Endocrinología y Reproducción, Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas, y Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID), 2Facultad de Ciencias y Filosofía e Instituto de Investigaciones de la Altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia

**Objetivos:** Determinar el efecto del IMC pregestacional sobre el éxito reproductivo materno, complicaciones durante el embarazo, así como la supervivencia y crecimiento del recién nacido, evaluando variables como abortos previos, preeclampsia y características antropométricas del recién nacido.

**Materiales y Métodos:** Estudio longitudinal de carácter retrospectivo. Las historias clínicas de mujeres gestantes durante los años 2012, 2013, 2014, 2015 y 2016, se recolectaron del Hospital Nacional Santa Rosa de Lima. Durante este periodo, 6798 mujeres se atendieron y concluyeron su embarazo en este centro de salud. Empleando la clasificación de Índice de Masa Corporal (IMC) de la Organización Mundial de Salud (OMS), se distribuyeron a las mujeres según los siguientes parámetros: <18.5 kg/m<sup>2</sup> bajo peso, 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup> normal, 25-29.9 kg/m<sup>2</sup> sobrepeso, >30 kg/m<sup>2</sup> obesa. Se evaluó la relación entre el IMC con diferentes variables reproductivas (abortos, preeclampsia) y físicas del neonato (talla, perímetro cefálico, peso). El análisis fue analizado con STATA 12 por análisis multivariados. Se considera significativo cuando  $P < 0.05$ .

**Resultados:** El IMC pregestacional muestra una correlación sobre la tasa de abortos, siendo las gestantes que ingresan con IMC de sobrepeso u obesidad al embarazo cuentan con mayor tasa de abortos ( $p < 0.05$ ). Igualmente se evaluó la relación entre el IMC pregestacional con la talla y el perímetro cefálico del recién nacido no se halló significancia ( $p > 0.05$ ) lo que indica que el tamaño del recién nacido no se ve influenciado por el IMC materno. Con respecto al peso del neonato sí se halló significativo ( $p < 0.05$ ), siendo los neonatos de madres obesas y con sobrepeso los que presentan menor peso al nacer.

**Conclusiones:** El IMC pregestacional tiene influencia significativa ( $p < 0.05$ ) sobre la tasa de abortos y el peso del neonato, mientras que para la talla y el perímetro cefálico no hay influencia significativa ( $p > 0.05$ ). Teniendo mejores valores de peso y menor tasa de abortos los grupos de IMC normal y bajo peso.

**DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO SEGÚN TÉCNICA DE AUTOTOMA EN UN GRUPO DE UNIVERSITARIAS.** (Detection of human papilloma virus according to self-sampling).

Manrique-Hinojos J1, Núñez-Teran M1, Pretel-Ydrogo L1, Sullcahuaman-Allende Y1, Roa-Meggo Y2, Juárez-Coello P2, Navarro-Egúsqiza S2.

1Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas Lima, Perú

2Universidad de San Martín de Porres, Facultad de Obstetricia y Enfermería, Lima, Perú

**Objetivo:** Determinar la frecuencia y genotipos del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) a través de la técnica de autotoma en un grupo de universitarias de Lima.

**Material y Métodos:** Investigación transversal. En este estudio, participaron 221 universitarias, durante el periodo de marzo a noviembre del 2016, se entregó un cuestionario autoadministrable y el kit para la autotoma de la muestra. Se detectó el ADN del VPH-AR con el método de reacción en cadena de la polimerasa PCR. Se obtuvo el consentimiento informado de todas las estudiantes.

**Resultados:** La frecuencia del VPH-AR en las universitarias del estudio fue de 43,4%; de este grupo se encontraron los genotipos VPH 16 en el 15,6% y VPH 18 en el 4,2% y otros VPH-AR en el 80,2%. El número de parejas sexuales sí se relacionó con el resultado negativo y positivo para el VPH-AR, presentó significancia estadística ( $p = 0.003$ ).

Conclusión: La frecuencia del VPH-AR es mayor en el grupo de universitarias de este estudio en comparación a investigaciones nacionales previas, es indispensable promover comportamientos sexuales saludables y un futuro tamizaje oportuno en esta población de riesgo.

Palabras clave: infecciones por papillomavirus, pruebas de ADN del papillomavirus humano, tamizaje masivo, estudiantes.

**MORFOMETRIA DE LA CABEZA DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS: COMPARACION ENTRE RAZA CHILENA Y CHILOTA CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA SEM-STEM.** (Stallion sperm head morphometry: Comparison of Chilean and Chilote breeds by electronic microscopy SEM-STEM).

Cabrera P1, Arias ME1,2, Felmer R1,2,3.

1Laboratorio de Reproducción, Centro de Biotecnología de la Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

2Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

3Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Los potros de raza chilena y chilota se diferencian en su tamaño corporal, siendo la raza chilota más pequeña de alzada (117 cm) en comparación con la raza chilena (142 cm). El semen de potros chilotes tiene una alta concentración de células espermáticas comparado con razas de mayor tamaño, no obstante, el volumen seminal es notoriamente inferior. Se han realizado estudios de características andrológicas del semen como pH, color, concentración y motilidad, pero no de evaluaciones morfométricas. El objetivo del presente estudio fue evaluar el tamaño de la cabeza de espermatozoides en ambas razas (largo y ancho) mediante microscopía electrónica.

Se recolectaron muestras de semen de tres de potros de raza chilena y chilote de 3 a 8 años de edad con una vagina artificial. El semen recolectado se filtró con gasa estéril y se diluyó 1:1 con medio Whitten para su transporte al laboratorio (~30 minutos de viaje). Se centrifugaron a 600g durante 5 minutos y el sedimento se reconstituyó para realizar el recuento de espermatozoides mediante fotómetro calibrado para equinos (SDM 1, Minitube). Las muestras se diluyeron a 200x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml y se fijaron con glutaraldehído al 2% para visualizarlos en microscopio electrónico de barrido (STEM-SU 3500-Hitachi). Se midió el largo y el ancho de la cabeza espermática en micras y los datos se expresaron como promedio y desviación estándar. Las imágenes fotográficas se analizaron con el programa ImageJ.

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre la raza chilena y chilota en el largo de la cabeza espermática ( $5,3 \pm 0,41$  y  $5,1 \pm 0,43$ , respectivamente), sin embargo, no se observaron diferencias en el ancho ( $2,32 \pm 0,31$  y  $2,31 \pm 0,31$ ). Los resultados del primer estudio morfométrico del semen de ambas razas permiten concluir que hay diferencias entre estas razas. Estudios posteriores se enfocarán en evaluar variables de calidad espermática en ambas razas.

Financiamiento: FONDECYT 1160467

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE SUCROSA Y TREHALOSA AL MEDIO DE CONGELACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE VERRACO CRIOPRESERVADOS.** (Effect of the addition of sucrose and trehalose to the freezing medium on the quality of cryopreserved boar sperm)

Pezo F1, Zambrano F1,2, Uribe P1,3, Moya C4, Risopatrón J2, Burgos RA5, Sánchez R1,2

1Laboratorio de Medicina Reproductiva y Endocrinología, Centro de Medicina Traslacional (CEMT-BIOREN).

2Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

3Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

4Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales,

5Instituto de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Introducción. Los disacáridos presentan propiedades bio-protectoras, con alta capacidad para conservar proteínas y membranas biológicas durante la criopreservación de espermatozoides.

**Objetivo.** Evaluar el efecto del reemplazo de lactosa por sucrosa (S) y trehalosa (T) en el medio de congelación de espermatozoides de verraco.

**Materiales y Método.** El medio de criopreservación está compuesto por un medio A [lactosa 0.25M(L)/20% yema de huevo (YH)] para equilibrio térmico de 17°C a 5°C y el B [lactosa 0.25M/yema de huevo 20%/glicerol 8% (G)] que se adiciona a los 5°C (proporción 3A:2B). Posteriormente, llene de pajuelas y congelación en equipo automatizado. Modelo experimental: 1) Control: A: L/YH(320mOsm), B: L/YH/G(1686mOsm); 2) S-1(0.2M): A: S-1/YH(281mOsm), B: S-1/YH/G(1485mOsm), 3) S-2(0.25M): A: S-2/YH(347mOsm), B: S-2/YH/G(1760mOsm), 4) T-1(0.2M): A: T-1/YH (254mOsm), B: T-1/YH/G(1379mOsm) y 5) T-2 (0.25M): A: T-2/YH(308mosm), B: T-2/YH/G(1630mOsm). Viabilidad celular, fluidez de membrana, integridad acrosomal, potencial de membrana mitocondrial (PMM), peroxidación lipídica, oxidación de grupos tioles, especies reactivas de oxígeno (EROs), peroxinitrito y anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) fueron determinados por citometría de flujo; movilidad total (MT), progresiva (MP) y parámetros cinéticos evaluados por ISAS en el tiempo (T0, T30 y T60).

**Resultados.** Los grupos S-2 y T-2 fueron significativamente mejores en viabilidad y fluidez de membrana, respectivamente, ambos con aumento significativo del PMM. La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y peroxinitrito fue menor en el grupo T-2 respecto al control (P<0.05). MT en T0 fue superior en el grupo T-2 (P<0.05). La cinética espermática se vio afectada por el tratamiento y el tiempo, siendo significativo al T60 en MT, MP y los distintos parámetros cinéticos con excepción de VCL y ALH.

**Conclusiones.** El uso de los disacáridos S y T en una concentración de 0.25 M mejora la calidad espermática y pueden ser utilizados como crioprotectores no penetrantes en medios de criopreservación de espermatozoides de verraco.

**Financiamiento.** Este trabajo fue financiado por FONDEYT-CONICYT, Grant 1180912, Chile.

**Agradecimientos.** Agrícola Pehuen ha facilitado las muestras para la realización de este estudio

#### **EFFECTOS DE ESTETROL EN ENDOMETRIOSIS.** (estetrol effects in endometriosis)

Patiño-García D1, Rojas A2, Orellana R2.

1. Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile
2. Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas, Facultad de Salud, Universidad Bernardo O'Higgins, Santiago, Chile.

Endometriosis es un desorden ginecológico benigno que afecta al 10-15% de mujeres en edad reproductiva. Se define como la presencia de tejido endometrial (epitelio y estroma) fuera del útero, causando implantes que crecen cíclicamente debido al estradiol (E2). Los síntomas más comunes son dismenorrea, dispareunia, disquesia, dolor pélvico e infertilidad, normalmente tratados con terapia hormonal y cirugía. Los progestágenos se asocian a una reducción sintomática. Según su tolerancia, estos pueden ser administrados solos, o en conjunto con un E2. No obstante, muchas pacientes desarrollan “resistencia a la progesterona”, asociada a una disminución global en los niveles de receptores de progesterona (PR), derivando en la reaparición de síntomas y nuevas cirugías. Estetrol (E4) es un estrógeno natural producido exclusivamente durante la gestación por el hígado fetal humano. Presenta una moderada, pero selectiva afinidad por los receptores de estrógeno (ERs) principalmente sobre el ER $\alpha$ . Esta molécula ha sido utilizada recientemente para terapia hormonal contraceptiva, sin embargo, sus efectos en endometriosis no se han descrito aún.

**Objetivo:** evaluar el efecto del E4 en la proliferación y los niveles de PR en líneas celulares de endometriosis.

**Materiales:** líneas celulares 11z y Hs832 (epitelio y estroma endometriótico), E4, E2 (Sigma, MO, USA) MTS (Promega, MD, USA), Anti PR (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Cámaras Boyden (B&D Biosciences, Heidelberg, GE).

**Resultados:** Para ambas líneas, el E4 indujo un leve incremento en la proliferación, sin efectos en la migración celular ni en la invasión. Los niveles de PR aumentaron tras 24h de exposición a E4 (10-8M), principalmente PR-A.

**Conclusiones:** El E4 se comporta como un estrógeno débil y aumenta los niveles proteicos de PR. Su uso en pacientes con endometriosis podría mantener las lesiones en baja proliferación y evitar el desarrollo de resistencia a la progesterona.

**Agradecimientos:** FONDECYT Inicio 11170603.

**ROLE OF VITAMIN E IN THE GONADAL DEVELOPMENT OF MOUSE EMBRYOS AND FETUSES TREATED WITH VALPROIC ACID: IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE HEDGEHOG FAMILY.** (Rol de la Vitamina E en el Desarrollo Gonadal de Embriones y Fetos tratados con Ácido Valproico: Estudio Inmunohistoquímico de la Familia Hedgehog)

Conei, D.1,2,3; Flores, L3.; Rojas, M2. & Risopatrón, J4,5

1Doctoral Program in Morphological Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

2Laboratory of Comparative Embryology, Anatomy and Developmental Biology Program, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Chile.

3Departament of Health Sciences, Universidad de Aysén, Coyhaique, Chile.

4Center of Biotechnology in Reproduction (CEBIOR-BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

5Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Introduction: Desert hedgehog (Dhh) and Indian hedgehog (Ihh) correspond to morphogens essential for the development of interstitial cells; granulosa and thecal cells, respectively. Teratogens cause variations in their expression, such as valproic acid (VPA), altering the reproductive system, since it increases the reactive oxygen species, and can be counteracted with vitamin E (VE).

Objective: To determinate the effect of VE on the expression of Dhh and Ihh in the gonadal development of mouse embryos and fetuses exposed to VPA.

Material and Method: Female *Mus musculus* BALB/c mice (n=40) were used distributed in 8 groups, according to orally administered treatment: groups 1 and 5= VPA 400 mg/kg; groups 2 and 6= VE 50 mg/kg; groups 3 and 7= VPA+VE; groups 4 and 8 (control)= 0.1 mL of physiological saline. At 12.5 days post-conception (dpc), groups 1 to 4 were euthanized, and 17.5 dpc groups 5 to 8 were euthanized. The gonads of embryo and fetuses were extracted and fixed in buffered formalin in PBS and included in paraplast. Serial cross sections were made. Hematoloxilin-eosin staining and immunohistochemical Dhh polyclonal antibodies (scbt, N-17, goat) and Ihh (scbt, C-15, goat), dilution 1:100 were performed. The morphology of the marked samples was described; the integrated optical density and percentage of immunoreactive area were measured.

Results: The 12.5 dpc samples were negative for antibodies. At 17.5 dpc, the groups treated with VPA had lower expression of Dhh in fetal interstitial cells as well as in the germinal line, in comparison to the other groups, like Ihh but in granular cells in primordial follicles, and it was observed greater number of atretic follicles, with significant differences ( $p \leq 0,0001$ ). There were no differences between the groups treated with VE and controls.

Conclusions: Vitamin E regulates the expression of Dhh and Ihh in the development of the gonadal system, attenuating the effects of VPA.

**AISLAMIENTO DE CÉLULAS GERMINALES DE TESTÍCULO DE SALMO SALAR MEDIANTE LA TÉCNICA DE CELL SORTER.** (Isolation of germinal cells of salmo salar testicle through the technique of cell sorter).

Rodríguez, R.1; Farías, J.G.1; Lee, M.1; Valdebenito, I.2; Risopatrón, J.3.

1Laboratorio de Ingeniería, Biotecnología y Bioquímica Aplicada, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.

2Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

3Centro de Excelencia de Biotecnología de la Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile

El estudio de los eventos moleculares que ocurren en las diferentes poblaciones de células germinales de *Salmo salar* es necesario para responder algunas interrogantes existentes sobre la espermatogénesis de esta especie. Muchas técnicas de purificación para aislar poblaciones específicas de células testiculares requieren grandes cantidades de muestra y/o solo pueden aislar algunos tipos de células; sin embargo, con la técnica de Cell Sorter se pueden separar espermatogonias, espermátocitos primarios, espermátidas y espermatozoides a partir de pequeñas porciones de testículos y obtener las poblaciones de células en cantidades adecuadas para realizar estudios moleculares posteriores. El objetivo de este trabajo fue separar las células germinales de *Salmo salar* a través de la técnica de Cell sorter. Se realizó un protocolo para la disgregación de las células de los testículos. Posteriormente estas fueron teñidas con Hoechst 34580 y separadas a través del Cell Sorter FaCS Aria Fusion. Se realizó la separación de cuatro poblaciones celulares (espermatogonias, espermátocitos

primarios, espermátidas) con el Cell Sorter FaCSaria Fusion luego de 45 minutos de incubación con Hoechst 34580. La población menos abundante fue la de espermatogonias (0,5-2,9 %) y la más abundante fue la de espermatozoides (21,0-36,7 %). Luego de separadas las poblaciones estas fueron analizadas nuevamente por el equipo para corroborar la pureza de las mismas. Las poblaciones con mayor porcentaje de pureza fueron la de espermatozoides (83,0 %) y la de espermatoцитos primarios (93,3 %). Con este estudio se puede concluir que a través del Cell Sorter Facsaria Fusion es posible identificar y separar las células germinales de Salmo salar de forma sencilla y eficaz.

Este estudio ha sido posible gracias a los fondos ofrecidos por el proyecto FONDECYT No. 1180387 (Dr. Jorge Farías) y a la Beca Doctorado Nacional 2017 Folio 21170788 (Roxana Rodríguez).

### **RELATIONSHIP BETWEEN MARIJUANA CONSUMPTION AND SPERM PARAMETERS IN A POPULATION OF CHILEAN VOLUNTEERS.**

Costa, S; Maldonado, G; Florez, M; Carrasco, J; Henchuman, E; Quintana, O; Parada-Bustamante, A. Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI); Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Marijuana consumption is increased in the last years worldwide. Studies indicate that marijuana consumption exert deleterious effects on sperm parameters, whereas other studies indicate that its consumption may even exert positive effects on these parameters. The aim of this study was to evaluate whether marijuana consumption in a healthy Chilean population is associated to deleterious effects on sperm parameters and whether frequency and years of consumption is correlated with sperm parameters.

Volunteers healthy men that consume marijuana at least in the last three months (consumers) or that do not consume marijuana (non-consumers) were invited to participate in this study through different social webpages (facebook, instagram, etc). Exclusion criteria were consumption of other drugs (cocaine, LSD, etc), cryptorchidism, chronic diseases, tobacco smokers of more than 5 cigarettes by day, consumption of more than 25 alcohol units and/or in hormonal treatment. A spermiogram was performed according to WHO guidelines. Data were analyzed by Kruskal Wallis test, followed by Mann-Whitney test to compare different sperm parameters between consumers and non-consumers and also and Spearman's correlation analysis was performed to correlate sperm parameters with frequency (number of joints weekly smoked) and years of Marijuana consumption in consumer group.

A total of 35 consumers and 28 non-consumers were recruited in this study. No significant differences were found in volume, concentration, motility, vitality and percentage of spermatozoa with morphological alterations in the ejaculated between consumers and non-consumers. However, a negative correlation was observed between the number of marijuana joints smoked weekly with total count of spermatozoa ( $R=-0.335$ ;  $P=0.049$ ) and the percentage of spermatozoa with normal morphology ( $R=-0.34$ ;  $P=0.046$ ) in the ejaculated. In summary, these preliminary results support the concept that marijuana consumption in healthy men seems to do not exert evident deleterious effects on sperm parameters, except when this is frequently consumed.

### **EFFECTO DEL FACTOR INHIBITORIO DE LEUCEMIA SOBRE EL SISTEMA COLINÉRGICO OVÁRICO DE RATA.** (Effect of leukemia inhibitory factor on cholinergic function in rat ovary)

Peña S. and Paredes A.H.

Laboratorio de Neurobioquímica, Centro de Estudios Neurobioquímicos de Enfermedades Endocrinas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago de Chile

El Factor Inhibitorio de Leucemia (LIF) es una citoquina proinflamatoria que participa en el desarrollo folicular y en el proceso de ovulación. A la fecha se desconoce como LIF regula localmente la función ovárica. Estudios in vitro han demostrado que LIF favorece la síntesis de acetilcolina (ACh), la expresión de colin acetiltransferasa (ChAT) y su actividad en ganglio cervical superior. En nuestro laboratorio se ha demostrado recientemente que el ovario posee un sistema colinérgico local, que participa en la regulación de la función ovárica. El estrés simpático e inhibidores de la acetil colinesterasa (AChE) aumentan los niveles de ACh intraovárico, favoreciendo la foliculogénesis y esteroidogénesis.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de LIF sobre el sistema colinérgico ovariano. Para esto se determinó la producción de ACh por fluorimetría y el contenido de mRNA de los genes que codifican para las enzimas ChAT y AChE en ovarios de ratas Sprague-Dawley de 3 meses de edad, incubados por 3 y 8 h con

100 ng/ml de LIF. Además, se determinó el contenido de ACh en el medio de incubación. Se utilizó un n=5 para condición experimental.

Los resultados muestran que LIF induce un aumento significativo de ACh (35 %) en el medio de incubación, sin observar cambios en los niveles de ACh ovárica. Por otro lado, disminuye significativamente el contenido de mRNA de las enzimas ChAT (40%) y AChE (50%) a las 3h de incubación. En cambio, en ovarios incubados por 8 h. LIF no afecta los niveles de ACh en el medio de incubación ni en ovario.

En base a estos resultados, se sugiere que LIF regula la función colinérgica ovárica en modelo ex vivo, quedando pendiente evaluar el efecto de LIF en ovario en modelo in vivo, y el tipo celular sobre el que actúa.

### **DESREGULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL ARRESTO FOLICULAR DEL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (PCOS).** (Angiogenesis deregulation in the follicular arrest of Polycystic Ovary Syndrome).

Henríquez S, Kohen P, Godoy A, Devoto L.

Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

La angiogénesis es un factor crítico durante el desarrollo folicular, la selección del folículo dominante y la ovulación. El Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS), se caracteriza por el arresto del desarrollo folicular que conduce a la anovulación crónica. El arresto folicular se asocia generalmente a elevados niveles plasmáticos de LH, andrógenos y hormona antimülleriana (AMH). También existe una reducida angiogénesis, observada mediante ecografía- Doppler, en los folículos de mujeres PCOS comparados con mujeres sanas.

Objetivo: En este trabajo, proponemos que alterados niveles de metabolitos de estradiol (ME) pro-angiogénicos estarían involucradas en la desregulación de la angiogénesis del arresto folicular del PCOS.

Se determinaron los niveles intrafoliculares de los ME pro-angiogénicos (16-ketoestradiol, 2-hidroxiestradiol y 4-hidroxiestrone), el factor angiogénico VEGF y AMH en mujeres normales y PCOS. Además, se estudió el efecto de 2-hidroxiestradiol sobre el potencial angiogénico de células de la granulosa humana (CG).

Material y métodos: Los niveles de ME, VEGF y AMH se determinaron en el líquido folicular (FF) de folículos pequeños y pre-ovulatorios de mujeres normales que solicitaron esterilización tubárica y en mujeres PCOS con indicación de drilling ovárico, mediante HPLC-MS y ELISA, respectivamente. El potencial angiogénico (PA) se evaluó mediante ensayos de angiogénesis in vitro de medios condicionados obtenidos de cultivo CG de mujeres normales y mujeres PCOS que participaron en el programa de fertilización in vitro.

Resultados: Se observaron reducidos niveles de ME y VEGF en FF pacientes con PCOS en comparación con normales ( $P < 0.05$ ) y elevados niveles de AMH en folículos PCOS. El 2-hidroxiestradiol incremento significativamente el PA de CG PCOS comparados con la condición basal ( $P < 0.05$ ).

Conclusiones: Estos datos sugieren que los reducidos niveles de ME pro-angiogénicos asociados a los bajos niveles de VEGF encontrados en FF de folículos pequeños PCOS podrían contribuir a la desregulación de la angiogénesis y al arresto folicular del PCOS.

### **EFFECT OF FREEZING MEDIUM ON ANTIFREEZE ACTIVITY IN APOPLASTIC EXTRACTS OF DESCHAMPSIA ANTARCTICA FOR THE CRYOPRESERVATION OF SALMO SALAR SPERMATOZOA.**

Short S.1,2, Díaz R.3, Bravo L.A.2 and Farías J.G.1.

Department of Chemical Engineering, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile1.

Department of Agronomical Sciences and Natural Resources, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile2.

Center of Biotechnology on Reproduction (CEBIOR), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile3.

The development of sperm cryopreservation techniques has led to radical changes in human and animal reproductive biotechnology. New methods using antifreeze proteins (AFPs) can improve the post-thaw sperm quality. *Deschampsia antarctica*, a freezing tolerant plant possesses apoplastic antifreeze activity, therefore being a potential source of AFP for improving post-thawing sperm quality. The objective of this work was to evaluate the effect of a standard freezing medium for fish spermatozoa cryopreservation on antifreeze activity in apoplastic extract of *D. antarctica* and its cryoprotective effect on the plasma membrane integrity (PMI) and the mitochondrial membrane potential (MMP) of Atlantic salmon spermatozoa. IRI, TH and ice crystal morphology were measured in a standard cryopreservation medium, apoplastic extracts and apoplastic extract

supplemented with freezing medium. *S. salar* spermatozoa were cryopreserved using standard cryoprotectant medium (C+) and three alternative media: C+ supplemented with apoplastic extracts (0.05 mg/mL, apoplastic extracts 0.05 mg/mL supplemented with 1.3 M dimethyl sulphoxide (DMSO) and 0.3 M glucose, and 0.05 mg/mL of apoplastic extracts only. Post-thaw plasma membrane integrity and mitochondrial membrane potential were measured using flow cytometry. The presence of cryoprotectants in the IRI, TH activities and the ice crystal morphology doesn't affect the antifreeze activity. Apoplastic extracts from D. Antarctica showed a cryoprotective effect on *S. salar* spermatozoa, showing a PMI similar to the control (C+). Moreover, a higher percentage of cells with high MMP were observed in samples cryopreserved in the presence of apoplastic extracts compared to the controls. Our results suggest that AFPs from apoplastic extracts could act as potential cryoprotectants, and may even replace external cryoprotectants in the freezing medium.

Author acknowledges the support of FONDECYT 1180387 (Jorge Farías). NEXER (NRX17-0002) (León Bravo). CONICYT Doctorate grants (Stefania Short).

### **EFFECTO DEL ZUMO DE *Citrullus lanatus* SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.**

Saldarriaga Monsalve, LJ, Cardona Maya, WD.

Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

**Objetivo:** El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del zumo de sandía sobre los parámetros seminales convencionales y funcionales in vitro e in vivo.

**Materiales y métodos:** Para los ensayos in vitro cinco muestras de espermatozoides puros fueron incubados con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5mM) y 0,45% de extracto de sandía y se determinó la movilidad espermática al tiempo 0, 30 y 60 minutos. En los ensayos in vivo se incluyeron 20 individuos a los cuales se les determinaron los parámetros espermáticos convencionales, funcionales y la capacidad antioxidante del plasma seminal por microscopía, citometría y espectrofotometría en los días 0, 7 y 15 después de iniciar el consumo diario de 16 onzas de zumo de sandía.

**Resultados:** El extracto de sandía protege a los espermatozoides del efecto deletéreo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la movilidad espermática. Adicionalmente, el consumo regular de jugo de sandía disminuye la lipoperoxidación de la membrana espermática (día 7, p<0,001; día 15, p<0,05), la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (día 7, p<0,05; día15, p<0,05), el índice de fragmentación del ADN el día 15 (p<0,05) y la capacidad antioxidante el día 7 y 15 (p<0,05).

**Conclusiones:** El extracto de sandía genera un efecto protector sobre los espermatozoides humanos in vitro, protegiendo su movilidad del efecto negativo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, si bien el consumo regular de zumo de sandía no mejora los parámetros seminales convencionales, si mejora algunos parámetros funcionales relacionados con el estrés oxidativo. Este es el primer reporte en el que se evidencia tanto in vitro como in vivo el efecto positivo del zumo de sandía sobre la fertilidad masculina.

**Fuentes de financiamiento:** Convocatoria Programática Convocatoria Salud 2017-2018, CODI, UdeA.

### **PREVALENCIA DE SÍNTOMAS DE PROSTATITIS EN ANTIOQUIA, COLOMBIA: FACTORES ASOCIADOS A UNA ENFERMEDAD ENIGMÁTICA.**

Puerta-Suarez J, Cardona-Maya WD.

Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

**Objetivo:** Describir los factores asociados a la aparición de los síntomas de prostatitis en hombres del Área Metropolitana del Valle de Aburrá, Antioquia.

**Materiales y métodos:** Se distribuyó una traducción del Índice de Síntomas de Prostatitis Crónica, una herramienta validada para determinar la prevalencia de síntomas de prostatitis en la población general. A los voluntarios seleccionados para los ensayos exploratorios se les solicitó tres muestras (orina, semen y suero) para detectar microorganismos responsables de infecciones urogenitales, evaluar algunos marcadores de la inflamación, el nivel de antígeno prostático y la calidad seminal empleando los parámetros seminales convencionales y funcionales.

Resultados: Se logró determinar una prevalencia de sintomatología severa de prostatitis crónica del 7.9% en una muestra de 2022 individuos que autodiligenciaron el formulario. Novescientos doce individuos respondieron afirmativamente cuando se les interrogó sobre el deseo de participar en futuros estudios con el propósito de identificar los factores asociados a la aparición de los síntomas de prostatitis. Los individuos con síntomas de prostatitis presentaron mayores niveles de lipoperoxidación de la membrana espermática ( $p < 0.001$ ), menor capacidad antioxidante del plasma seminal ( $p = 0.03$ ) y menores niveles de óxido nítrico en suero ( $p = 0.02$ ) con respecto al grupo control.

Conclusiones: Producto de este estudio se espera impactar en el conocimiento de una enfermedad crónica de alto impacto en la salud y en la calidad de vida de quienes la padecen, además recientes estudios han demostrado que la inflamación crónica de la próstata es precursor de otras enfermedades crónicas como la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata, éste último tuvo una alta tasa de mortalidad, por lo que impactar en la aparición de prostatitis en los adultos jóvenes puede evitar el desarrollo de otras enfermedades crónicas que tienen un alto costo para el sistema de salud.

### **SPARC INDUCES EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN PROSTATE CANCER CELLS THROUGH AN INTEGRIN AVB3 / ZEB1 SIGNALING PATHWAY.**

López-Moncada F1, Torres MJ1, Lavanderos B2, Cerda O2, Cerda J3, Montecinos VP3, Castellón EA1, Contreras HR1.

1Department of Basic and Clinical Oncology, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile

2Program of Cellular and Molecular Biology, ICBM, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile

3Department of Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is a matricellular protein highly expressed in bone tissue that acts as a chemo attractant factor promoting the arrival of prostate cancer (PCa) cells to the bone marrow. However, the contribution of SPARC during the early stages of tumor progression remains unclear. In this work we evaluated the cellular and molecular effects of tumor SPARC in PCa cells, focusing on the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Knock down and ectopic expression of SPARC was induced by viral transduction in PC3 and LNCaP cell lines. In these cells we assessed the expression of EMT markers and the migratory, invasive and proliferative capacities in vitro. Additionally, we assessed the capability of SPARC-knocked down cells to grow in vivo in a murine model. Finally, the involvement of integrin  $\alpha v \beta 3$  and ZEB1 in the SPARC-induced EMT was evaluated.

We found that SPARC is expressed in primary PCa tumor cells, mostly in intermediate and high Gleason tumors. In vitro, SPARC induces EMT in PCa cells and increases the expression of the EMT regulatory transcription factors Snail, Slug and Zeb1. Functionally, SPARC increases the migratory and invasive capacities of PCa cells and is necessary for tumor growth in vivo. Moreover, SPARC positively regulates integrin 3 subunit and ZEB1, and requires the expression and activity of both proteins to induce EMT and increase cell migration. These results indicate that SPARC, through Integrin  $\alpha v \beta 3$  and ZEB1, modifies cellular phenotype in cancer cells and regulates key events for tumor progression and PCa aggressiveness.

Acknowledgments: Fondecyt 1151214 and U Redes URC-007/17 (HRC), Fondecyt 1160518 and Millennium Nucleus of Ion Channels-Associated Diseases (MiNICAD) (OC), Fondecyt 1150397 (VPM) and Conicyt Scholarship 21160886 (FLM).

### **PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE HIPERANDROGENEMIA EN PACIENTES ADOLESCENTES CON DISFUNCIÓN OVULATORIA.** (Prevalence and characterization of hyperandrogenemia in adolescent girls with ovulatory dysfunction)

Del Río JP (1,2,3,4); Gutiérrez P (1,5); Parodi MP (1,5); Bernal Y (1); Vigil P (1,6).

1: Reproductive Health Research Institute, Santiago, Chile

2: Escuela de Posgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

3: Núcleo Milenio para Mejorar la Salud Mental de Adolescentes y Jóvenes, Imhay, Santiago, Chile.

4: Psiquislab Laboratorio de Psiquiatría Traslacional, Clínica Psiquiátrica Universitaria, Universidad de Chile

5: Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile

6: Vicerrectoría de Comunicaciones y Extensión, Pontificia Universidad Católica de Chile

**Introducción.** La etiología más frecuente de disfunción ovulatoria (DO) son las endocrinopatías. De éstas, la más prevalente es el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), el que se ha caracterizado como causa funcional de hiperandrogenemia. Para su diagnóstico habitualmente se utiliza testosterona sérica, pero se pueden considerar otros andrógenos. Dependiendo de los andrógenos utilizados variará la prevalencia de hiperandrogenemia.

**Objetivos.** Determinar la prevalencia de hiperandrogenemia en pacientes en edad reproductiva con DO en consulta en un centro de ginecología. Secundariamente, caracterizar la prevalencia de hiperandrogenemia dependiendo de los andrógenos considerados.

**Materiales y métodos.** Estudio de corte transversal analítico en mujeres de 12 a 21 años. Se realizó evaluación clínica y ecográfica asociadas a la medición de DHEA-S, Androstenediona, Testosterona total y libre calculada (según albúmina y SHBG) como parte del proceso diagnóstico. Se consideró DO si existía: ciclos irregulares (<24 o >36 días), fase lútea menor a 9 días, progesterona sérica <5ng/ml en el día 21 o anovulación ecográfica. Se definió hiperandrogenemia como cualquiera de: Androstenediona > 2,8 ng/ml, DHEAS >250 ug/dl, Testosterona total > 47ng/dl o Testosterona libre > 9 pg/ml. Para el análisis de datos se utilizaron métodos descriptivos.

**Resultados.** De 78 mujeres con DO y 4 tipos de andrógenos medidos la mediana de edad fue 17 años. Al considerar solo testosterona total 42,3% (33) presentó hiperandrogenemia. 52,56% (41) considerando Testosterona total y libre, y 64,1% (50) considerando Testosterona total, libre y DHEAS. 71,79% (56) presentó hiperandrogenemia al considerar cualquiera de los 4 andrógenos.

**Conclusiones.** La mayoría de las mujeres en edad reproductiva con DO presentó hiperandrogenemia considerando testosterona total y libre. Esta prevalencia aumenta hasta el 70% al considerar la medición de andrógenos anteriores en la ruta esteroideogénica. El diagnóstico de las diferentes formas de hiperandrogenemia y su impacto en la fisiopatología folicular ovárica deben ser consideradas en la atención de estas pacientes.

### **CARACTERIZACIÓN DE LAS CAUSAS DE DISFUNCIÓN OVULATORIA EN DOS COHORTES DE MUJERES EN EDAD REPRODUCTIVA.** (Characterization of causes of ovulatory dysfunction in two cohorts of reproductive age women).

Gutiérrez P (1,5); del Río JP (1,2,3,4); Parodi MP (1,5); Bernal Y (1); Vigil P (1,6).

1: Reproductive Health Research Institute, Santiago, Chile

2: Escuela de Posgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

3: Núcleo Milenio para Mejorar la Salud Mental de Adolescentes y Jóvenes, Imhay, Santiago, Chile.

4: Psiquislab Laboratorio de Psiquiatría Traslacional, Clínica Psiquiátrica Universitaria, Universidad de Chile

5: Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile

6: Vicerrectoría de Comunicaciones y Extensión, Pontificia Universidad Católica de Chile.

**Introducción.** La ovulación requiere de la coordinación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La causa más común de disfunción ovulatoria (DO) son endocrinopatías. Si bien las endocrinopatías que provocan DO son conocidas, no se cuenta con caracterizaciones de prevalencia en mujeres con síntomas asociados.

**Objetivos.** Caracterizar las causas de DO en pacientes en edad reproductiva consultantes en un centro de ginecología en Santiago, Chile.

**Materiales y métodos.** Estudio de corte transversal analítico en dos cohortes de mujeres: (A) entre 12 y 21 años y (B) entre 22 y 38. Se realizó evaluaciones clínicas y ecográficas asociadas a medición de FSH, TSH, Prolactina, Cortisol, DHEA-S, Androstenediona, Testosterona total y libre, SHBG, 17-OH-Progesterona, Test de tolerancia oral a la glucosa, Estradiol y Progesterona como parte del diagnóstico. Se consideró DO si existía: ciclos irregulares (<24 o >36 días), fase lútea menor a 9 días, progesterona sérica <5ng/ml en el día 21 o anovulación ecográfica. El diagnóstico sindromático se ajustó a guías clínicas actualizadas. Para el análisis de datos se utilizaron métodos descriptivos.

**Resultados.** De 197 mujeres totales los motivos de consulta fueron: irregularidad menstrual 75,8%, acné 35,8%, aumento de peso 31,7% y dismenorrea 26,7%. (A) se compone de 120 mujeres, con una mediana de edad de 17 años. De ellas, 84,17% presentó síndrome de ovario poliquístico (SOP) como diagnóstico principal; 12,3% Hiperprolactinemia; 2,7% desordenes tiroideos y 0,8% falla ovárica prematura. (B) se

compone de 78 mujeres y la mediana de edad fue 26 años. De estas 87.7% presentaron SOP, 7.7% hiperprolactinemia y 7% desordenes tiroideos. En (A,) 71% presentó insulino resistencia y 52.7% en (B).

Conclusiones. Los motivos de consulta principales fueron irregularidad menstrual, acné y aumento de peso. SOP es la principal causa de disfunción ovulatoria en mujeres en edad reproductiva. La prevalencia de trastornos tiroideos aumenta en la cohorte de mayor edad mientras que disminuye la insulino resistencia.

### **¿LA OBESIDAD ESTÁ ASOCIADA A LA ANEMIA EN MUJERES EMBARAZADAS A BAJA Y GRAN ALTURA? (Is obesity associated to anemia in pregnant women at low and high altitude?)**

Olavegoya P1,2, Gonzales GF1,2.

1Laboratorio de Endocrinología y Reproducción, Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas, y Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID), 2Facultad de Ciencias y Filosofía e Instituto de Investigaciones de la Altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia

Objetivo. Determinar si la obesidad pre-gestacional en mujeres embarazadas de poblaciones que viven a bajas y grandes altitudes se relaciona con la reducción de la Hb y si se observan cambios en cada uno de los trimestres del embarazo.

Métodos. Los datos son obtenidos de una base de 1'712,639 mujeres embarazadas pertenecientes a cada uno de los 24 departamentos del Perú obtenidas durante el período 2012 al 2017 otorgado por el Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (CENAN). Se determinó el peso pre gestacional y la talla para realizar el cálculo del IMC pregestacional; así mismo se registraron los datos sobre la ganancia de peso durante el embarazo, las mediciones de hemoglobina se obtuvieron mediante el equipo hemocue 201+. Los datos se presentan como la concentración de hemoglobina no corregida (g/dL) y la concentración de hemoglobina corregida por la altura (g/dL) según lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los datos se analizaron usando el Programa STATA 14 por análisis bivariados y multivariados. Se considera significativo cuando  $P < 0.05$ .

Resultados. El sobrepeso/obesidad pre-gestacional aumentó la concentración de hemoglobina (corregida y no corregida) ( $p < 0,0001$ ) mientras que la ganancia de peso durante el embarazo se reducía en forma de dosis-respuesta a medida que aumentaba el IMC ( $P < 0,0001$ ). Se encontraron diferencias significativas en la edad (años) y el IMC ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ) entre todos los grupos con respecto al trimestre ( $p < 0,0001$ ). Las mujeres con sobrepeso y obesidad no aumentan de peso en el primer trimestre del embarazo. La obesidad se asoció con un bajo aumento de peso en el segundo y tercer trimestre del embarazo. El mayor aumento de peso durante el embarazo se correlacionó con una menor concentración de hemoglobina ( $R^2 = 0.963$ ).

Conclusiones. El aumento de la Hb por el sobrepeso/obesidad sería un efecto de hemoconcentración que se asocia a menor aumento del peso corporal durante la gestación. Es necesario medir el volumen plasmático de las gestantes con la finalidad de evitar malinterpretaciones de la real concentración de hemoglobina en gestantes con obesidad y sobrepeso.

**EXPOSICIÓN A PM 2.5 SE ASOCIA A UN AUMENTO EN EL VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIA (VCM) Y ANEMIA Y A CAMBIOS LEUCOCITARIOS EN GESTANTES ATENDIDAS EN EL INSTITUTO NACIONAL MATERNO PERINATAL (INMP) (LIMA, PERÚ) DURANTE EL PERIODO 2018-2019.** (Pm 2.5 exposure is associated to an increase in mean corpuscular volume (MCV) and anaemia and leucocitary changes in pregnant women attended in the perinatal maternal national institute (INMP) (Lima, Peru) during 2018-2019).

Olavegoya P1,2, Gonzales GF1,2.

1Laboratorio de Endocrinología y Reproducción, Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas, y Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID), 2Facultad de Ciencias y Filosofía e Instituto de Investigaciones de la Altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Objetivos: Determinar la asociación de la exposición a PM2.5 sobre los parámetros hematológicos según los diferentes Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para el aire propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (10 ug/mm<sup>3</sup> media anual; 25 ug/m<sup>3</sup> media diaria) y por el Ministerio del Ambiente del Perú (MINAM) (25 ug/m<sup>3</sup> media anual; 50 ug/m<sup>3</sup> media diaria). Determinar la asociación de la exposición PM2.5 y la presencia de anemia ferropénica y la presencia de anemia por hemodilución.

Materiales y Métodos: Estudio longitudinal de carácter retrospectivo. Los hemogramas se recolectaron en el Instituto Nacional Materno Perinatal de Lima (INMP) en el periodo 2018-2019. Se definió anemia ferropénica cuando los valores de Hb<11 g/dL y VCM<84 fL, y anemia por hemodilución cuando lo valores de Hb<11 g/dL y VCM≥84 fL. Se obtuvo un total de 457 gestantes entre los tres trimestres. Los datos de PM2.5 fueron proporcionados por la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) y el Sistema Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI). Los datos se analizaron por STATA 14 por análisis bivariados y multivariados. Se considera significativo cuando P<0.05.

Resultados: El VCM muestra una correlación cuadrática aumentando los valores de VCM>100 fL asociado a PM2.5 >25 ug/m<sup>3</sup> (r=0.29; p<0.05). Los valores de VCM sobrepasan el ECA de la OMS (25 ug/m<sup>3</sup>). No se observaron gestantes asociadas a exposición >50 ug/m<sup>3</sup> (ECA- MINAM). Gestantes anémicas (hb<11) y con volumen corpuscular (>100 fl) poseen valores más altos de PM 2.5 tanto en el 2do como 3er trimestre (p<0.05).

El conteo de leucocitos, de neutrófilos y de monocitos se incrementó a medida que avanzaba la gestación del 1er al 3er trimestre. La exposición a PM2.5 >25 ug/m<sup>3</sup> se asocia a aumento en leucocitos totales al 2do trimestre de gestación y de neutrófilos al 1er y 2do trimestre de gestación. PM2.5>25 ug/m<sup>3</sup> modifica el patrón leucocitario gestacional al 3er trimestre donde se aprecia una disminución de leucocitos totales, neutrófilos y linfocitos comparados con el grupo expuesto a PM2.5 <25 ug/m<sup>3</sup>. Así en 3er trimestre, una exposición aumentada de PM2.5 (33.20 ug/m<sup>3</sup>) se asocia con anemia, VCM<84 fL y leucocitos bajos

Conclusiones: La exposición a valores altos de PM2.5 está asociada a inflamación y a VCM >100 fl, lo cual podría sugerir anemia por deficiencia de ácido fólico y/o vitamina B12 en gestantes del 2do y 3er trimestre. El consumo de ácido fólico puede reducir el impacto de la contaminación con PM2.5 actuando sobre la metilación del DNA.

---