

**Efectos del tratamiento con oxígeno  
hiperbárico sobre la proliferación de  
las células troncales intestinales y su  
relación con la vía mTORc1 en *Mus  
musculus***

Tesis  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
En cumplimiento parcial de los requisitos  
Para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

**Ignacio J. Casanova Maldonado**

Marzo 2019

Directora de Tesis Dra.:

**Verónica A. Palma Alvarado**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentado por el candidato.

**Ignacio J. Casanova Maldonado**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas Mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de enero del 2019

**Director de Tesis:**

**Dra. Verónica Palma Alvarado** .....

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dr. Alvaro Glavic** .....

**Dra. Daniela Sauma** .....

## Resumen Biográfico



Nací en la ciudad de Osorno un día de septiembre de 1993, durante la enseñanza básica y media conocí amigos que me acompañan hasta el día de hoy. En el año 2011 tuve que dejar mi ciudad para venir a estudiar a Santiago, una ciudad totalmente distinta a lo que estaba acostumbrado, muy saturada de gente, ruido y autos, además de un clima muy lejano al de mi agrado, con temperaturas muy altas en verano y muy poca lluvia en invierno. Aquí también pude encontrar nuevos amigos los cuales han sido de gran apoyo en los momentos difíciles y más aún cuando la familia se encuentra tan lejana. Dentro de las actividades recreativas que realizo se encuentra el rugby, ski, pesca deportiva, astronomía y el trekking principalmente, siendo esta ultima un gran aliado para esos momentos en los que se necesita un respiro de la sociedad.

## Agradecimientos

*“No conozco a la mitad de ustedes, ni la mitad de lo que querría, y lo que yo querría es menos de la mitad de lo que la mitad de ustedes merece”*

- Bilbo Baggins

Agradezco primero que todo a mi familia por el apoyo durante mi educación y formación, a mi papá por los conocimientos, mi mamá por el cariño y mi hermana por los momentos además de darme dos sobrinos, Joaquín y Rafaela. A mis amigos de Osorno, Álvarez mi gran amigo, Baldur, Brian y Chocho por tantos buenos momentos. Mis amigos de Santiago, Pancha, Seba, Cony, Viole, Javier, Copano que han hecho mi vida en esta ciudad más amena. Mi maestro (Jedi) Isaac del cual he podido aprender muchas cosas y he podido encontrar más que un colega, un amigo. Agradezco también a la Dra. Verónica Palma primero por la oportunidad y la confianza para llevar a cabo esta investigación, a Pablo Lois por los incontables consejos no solo en ciencia, sino que de la vida y al laboratorio en general por la ayuda, consejos y conversaciones. Finalmente quisiera agradecer tremendamente a Sci-Hub por tan noble misión.

## Índice

<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>Introducción</b>	5
Tratamiento con oxígeno hiperbárico (HBOT): orígenes y principio de acción	5
Impacto de HBOT a nivel del intestino	9
Células troncales intestinales (CTI)	11
Vía mTOR: un sensor metabólico clave	16
mTORc1 y su relación con el intestino delgado	18
Relación de mTOR con los niveles de oxígeno	19
Hipótesis	21
Objetivos	21
<b>Materiales y métodos</b>	22
Mantenimiento de los animales	22
Tratamiento con oxígeno hiperbárico	23
Obtención de órganos	25
Inyección intraperitoneal de Rapamicina	27
Inmunohistoquímica	27
Inmunofluorescencia	28
Microscopía y análisis de imágenes	29

Análisis de células BrdU+ por cripta intestinal	29
Mediciones de ancho y longitud de las criptas intestinales	30
Análisis enzimáticos para Citocromo C oxidasa y Citrato sintasa	31
Western-blots	31
Análisis estadísticos	32
<b>Resultados</b>	34
Identificación de CTI mediante inmunofluorescencias	34
Células BrdU+ por cripta	37
Efectos de HBOT sobre la proliferación de las CTI	38
Efectos de HBOT sobre la actividad enzimática de COX y CS	43
HBOT y su relación con la vía mTORc1	44
Efecto combinado de HBOT y Rapamicina sobre la proliferación de las CTI	48
Efecto de DMSO	51
Efectos de HBOT y Rapamicina sobre la longitud de las criptas	54
Efectos de Rapamicina sobre la proliferación celular	57
Efectos sobre otros órganos	59
<b>Discusión</b>	60
El aumento de la proliferación de las CTI ocurre de forma sincronizada entre las criptas	61
Otros casos de sincronización de la proliferación de CTI	63
HBOT no modifica la actividad enzimática de COX y CS	64
HBOT recupera la inhibición de Rapamicina sobre S6K1-P	67

Inhibición de la vía mTORc1	68
Administración de Rapamicina aumenta la proliferación de las CTI	69
El uso combinado de Rapamicina y HBOT no aumenta la proliferación de CTI	71
Efectos de Rapamicina sobre la longitud de las criptas intestinales	72
El aumento en longitud de las criptas es por hipertrofia	74
Modelo de acción de HBOT propuesto	75
Efectos de HBOT sobre la microbiota intestinal	76
DMSO provoca un cambio en la distribución de la proliferación de las CTI	80
Comentario general sobre plasticidad intestinal	81
<b>Conclusión</b>	83
<b>Proyecciones</b>	85
<b>Referencias</b>	87
<b>Material de referencia complementario</b>	105

## Índice de abreviaturas

4E-BP1	4E proteína de unión 1 (del inglés: 4E Binding Protein 1)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATA	Atmosferas Absolutas
ATM	Atmosfera (Presión)
ATP	Adenosíntrifosfato
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Suero de albumina bovina (del inglés: Bovine serum albumin)
CBC	Células de la base columnar de la cripta
CO	Monóxido de carbono
COX	Citocromo C oxidasa
CS	Citrato sintasa
CTI	Células Troncales Intestinales
CU	Colitis ulcerosa
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HBOT	Tratamiento con oxígeno hiperbárico (del inglés: Hyperbaric Oxygen Therapy)
HIF1- $\alpha$	Factor inducido por hipoxia 1- $\alpha$ (del inglés: Hypoxia induced factor 1- $\alpha$ )
ID	Intestino Delgado
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica



Lgr5	Proteína G con repetidos ricos en leucina acoplados al receptor 5 (del inglés: Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5)
mmHg	Milímetros de mercurio
mTOR	Diana de Rapamicina en mamíferos (del inglés: Mechanistic Target Of Rapamycin)
mTORc1	Complejo 1 de la diana de Rapamicina en mamíferos (del inglés: Mechanistic Target Of Rapamycin complex 1)
mTORc2	Complejo 2 de la diana de Rapamicina en mamíferos (del inglés: Mechanistic Target Of Rapamycin complex 2)
OCT	Temperatura de corte óptimo (del inglés: Optimal cutting temperature)
PBS	Buffer fosfato salino (del inglés: Phosphate buffered saline)
PBT	Buffer fosfato salino con Triton x-100 (del inglés: Phosphate buffered saline with triton)
PFA	Paraformaldehído al 4%
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa (del inglés: Phosphoinositol 3 Kinase)
PKC1	Proteína quinasa C1
RC	Restricción Calórica
S6K1	p70 S6 quinasa
S6K1-P	p70 S6 quinasa fosforilada (Thr389)
TBS-T	Buffer triton salino con tween 20 (del inglés: Triton buffered saline with tween 20)
TSC	Tuberous Sclerosis Complex

ZAT Zona de amplificación transitoria  
ZCD Zona común de diferenciación

## Índice de anticuerpos

<b>Anticuerpo</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Dilución</b>
Olfm4	Cell Signaling	Rabbit $\alpha$ mouse	1:1000
BrdU	Dako	Rabbit $\alpha$ mouse	1:100
S6K1-P	Cell Signaling	Rabbit $\alpha$ mouse	1:500
$\beta$ -Actina	Santa Cruz	Chicken $\alpha$ mouse	1:5000
DAPI	Invitrogen		1:10000
$\alpha$ -mouse Alexa 555	Life technologies	Goat $\alpha$ mouse	1:500
$\alpha$ -mouse Alexa 488	Life technologies	Goat $\alpha$ mouse	1:500
$\alpha$ -mouse HRP	RyD	Goat $\alpha$ mouse	1:5000
$\alpha$ -rabbit HRP	RyD	Mouse $\alpha$ rabbit	1:5000
S6K1	Cell Signaling	Rabbit $\alpha$ mouse	1:1000
Biotinylated universal antibody	R.T. U	Rabbit $\alpha$ mouse	1:1

## Índice de tablas y figuras

Figura 1. Esquema de la división asimétrica de una célula troncal intestinal	12
Figura 2. Esquema representativo de la conformación del epitelio intestinal	13
Figura 3. Imagen de la cámara hiperbárica experimental	23
Figura 4. Imagen representativa de procesamientos y preparación de los cortes de duodeno	26
Figura 5. Esquema descriptivo de las mediciones realizadas en las criptas intestinales	30
Figura 6. Imagen representativa del epitelio intestinal indicando ejes de cortes	34
Figura 7. Imagen de una inmunofluorescencia representativa de corte de intestino delgado	35
Figura 8. Imagen representativa de una cripta intestinal	36
Figura 9. Imagen representativa de inmunohistoquímica anti-BrdU en cripta de intestino delgado de ratón	38
Figura 10. Comparación de los promedios de las células proliferativas por cripta ante los distintos tratamientos	39
Figura 11. Distribución del número de células BrdU+ por cripta en el intestino delgado para cada tratamiento generado	40
Figura 12. Comparación agrupada de las distribuciones de proliferación para cada uno de los grupos experimentales	41

Figura 13. Comparación de los coeficientes de estabilización de los cuatro grupos experimentales	42
Figura 14. Imagen representativa de Western-Blot para la proteína S6K fosforilada (70 kDa) post tratamiento con Rapamicina	45
Figura 15. Western-Blot representativo para evaluar cambios en la expresión y/o actividad de S6K1	46
Figura 16. Histograma que muestra la cuantificación de la actividad de mTORc1	47
Figura 17. Imagen representativa de inmunohistoquímica anti -BrdU para cortes de intestino delgado de ratones post tratamiento Rapamicina y/o HBOT	49
Figura 18. Grafica ilustrativa de la comparación de los promedios de las células proliferativas por cripta entre los distintos tratamientos	49
Figura 19. Histograma de frecuencias absolutas de criptas intestinales indicando números de células BrdU+	50
Figura 20. Histograma de frecuencias absolutas de criptas intestinales con diferentes números de células Brdu+ ilustrando los efectos de DMSO de los efectos del DMSO	51
Figura 21. Histograma resumen de las distribuciones para cada uno de los grupos experimentales indicados en la figura 20	52
Figura 22. Comparación a pares de las distribuciones para los distintos grupos experimentales indicados en la figura 20	53

Figura 23. Comparación del largo de las criptas entre los grupos tratados con HBOT	55
Figura 24. Comparación de las longitudes de las criptas intestinales con Rapamicina y HBOT	56
Figura 25. Imagen representativa de la diferencia en la longitud de criptas	57
Figura 26. Comparación del número de células por área en la cripta intestinal	58
Figura 27. Modelo esquemático propuesto para ilustrar el efecto sobre la proliferación de las CTI por cripta provocado por el uso de HBOT	62
Figura 28. Comparación de las tasas metabólicas basales y normalizadas por peso del animal	67
Figura 29: Modelo de acción de HBOT propuesto	76
<b>Tablas</b>	
Tabla 1. Marcadores utilizados entre las distintas poblaciones de CTI	16
Tabla 2. Medición de actividad enzimática de enzimas claves luego de aplicar un tratamiento crónico con HBOT	43

## Resumen

Se ha demostrado que la terapia con oxígeno hiperbárico (HBOT) promueve la proliferación de células troncales somáticas *in vivo* en diversos modelos animales. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen este efecto no han sido estudiados en profundidad.

El intestino de mamíferos tiene un alto índice de recambio celular debido al desgaste que sufre en el ejercicio de las funciones de degradación, absorción de nutrientes y evacuación de los restos innecesarios. Es por ello que en este órgano hay un gran volumen de células troncales en constante división y diferenciación, convirtiendo al intestino en un modelo atractivo para evaluar el impacto de HBOT.

Mediante el uso de HBOT en esta tesis se logró modular gradualmente en el tiempo la proliferación y migración de las células troncales intestinales (CTI) murinas. La exposición a HBOT por veinte días promueve un aumento sincronizado de la proliferación de las CTI por cripta. Dado que la enzima metabólica mTORc1 modifica su actividad dependiendo de los niveles de oxígeno, en respuesta a factores intermediarios tales como HIF-1 $\alpha$  o REDD1, se ensayó a continuación si la vía mTORc1 está mediando los efectos de HBOT. Ratones inyectados con Rapamicina (inhibidor alostérico de mTORc1) aumentan la proliferación de las CTI, a similares niveles observados en animales sometidos a HBOT por 20 días. Rapamicina, en nuestro modelo, estaría provocando una respuesta similar a lo que se ha descrito previamente ante una restricción calórica (RC). Sin embargo, llama la atención que el uso combinado de HBOT con Rapamicina no genera dicho aumento en la proliferación de

las CTI. Se ha planteado que la RC pudo ser simulada por la administración de Rapamicina, esto último evaluado mediante la disminución en los niveles de fosforilación de una de las proteínas efectoras de la vía mTORc1, S6K1. No obstante, tratamientos de 20 días con uso combinado de HBOT y Rapamicina logran recuperar la fosforilación sobre de S6K1 a niveles controles. Se propone por tanto que el aparente efecto antagónico entre la inhibición por Rapamicina y una posible estabilización del complejo mTORc1 por parte de HBOT se traduciría en la anulación del aumento de la proliferación de las CTI, esto último sería por un mecanismo que aún se desconoce y que debería ser abordado en futuros estudios.

Se concluye que HBOT promueve la proliferación de las CTI y por tanto el funcionamiento del intestino. Extrapolando nuestros resultados, HBOT se podría utilizar como parte de un plan de tratamiento integral para tratar eficazmente afecciones intestinales, al ser administrado en conjunto con otras terapias y medicamentos que se adapten a las necesidades individuales del paciente.



## Abstract

It has been described that hyperbaric oxygen therapy (HBOT) promotes somatic stem cell proliferation *in vivo* in several animal models. However, the molecular mechanisms underlying this effect have not been studied in depth.

The mammalian intestinal epithelium has one of the highest cells turn-over rates due the constant attrition suffered due to its functions of degradation, absorption of nutrients and evacuation of unnecessary remains. As such, in this organ there is a large volume of stem cells in constant division and differentiation, making the intestine an attractive model to evaluate the impact of HBOT.

In this thesis we were able to modulate gradually murine intestinal stem cell (ISC) proliferation and migration using HBOT. Exposure to HBOT for twenty days in an experimental hyperbaric chamber promotes a synchronized increase in the proliferation of CTIs per crypt. Since the metabolic enzyme mTORc1 modifies its activity depending on oxygen levels, in response to intermediary factors such as HIF-1 $\alpha$  or REDD1, it was tested whether the mTORc1 pathway is mediating the effects of HBOT. Interestingly, mice injected with Rapamycin (an allosteric inhibitor of mTORc1) increased the proliferation of ISCs, at similar levels observed in animals submitted to HBOT for 20 days. However, it is striking that the combined use of HBOT with Rapamycin does not generate such an increase in the proliferation of ISC. Rapamycin effects can be explained due its ability to mimic a caloric restriction (CR). It has been suggested that CR could be simulated by the administration of Rapamycin, the latter evaluated by the decrease in phosphorylation levels of one of the

effector proteins of the mTORc1 pathway, S6K1. But, Rapamycin treatments in combination with HBOT recovers phosphorylation of S6K1.

It is therefore proposed that the apparent antagonistic effect between the inhibition by Rapamycin and a possible stabilization of the mTORc1 complex by HBOT would result in the cancellation of the increase in the proliferation of the ISC, this last would be by a mechanism that is still unknown and that should be addressed in future studies.

It is concluded that HBOT promotes the proliferation of ISC and therefore the correct functioning of the intestine. Extrapolating our results, HBOT could be used as part of a treatment plan to effectively treat intestinal conditions, when administered in conjunction with other therapies and medications that are tailored to the individual needs of the patient.

## **1. Introducción**

### *1.1 Tratamiento con oxígeno hiperbárico: Orígenes y principios de acción*

La oxigenoterapia es conocida desde hace casi 250 años, aunque solo se utiliza con propiedad desde hace medio siglo. Desde el descubrimiento y aislamiento del oxígeno en estado gaseoso en 1775-1777 (Carl Scheele y Joseph Priestley) pasaron casi 50 años para que se comenzaran a realizar tratamientos con aire hiperbárico por toda Europa. Se usó por los médicos de la época para tratar de manera paliativa enfermedades como el asma y otras patologías como tuberculosis, laringitis y tos convulsiva. Luego se comenzaron a realizar estudios de hiperoxia, los cuales, sin embargo, muchas veces conducían a la muerte de los individuos sometidos a tratamientos prolongados (proceso hoy conocido como intoxicación aguda por el oxígeno o efecto Paul Bert), razón por la que se descartó el uso de oxígeno como terapia (Instituto Español de Medicina Hiperbárica). Para finales del siglo XIX se volvió a considerar el oxígeno como insumo terapéutico en combinación con hiperbaria, llegándose incluso a la construcción de un hotel hiperbárico en 1928 en Estados Unidos. Este último funcionaba a una presión de 2 Atmósferas absoluta (ATA) y los pacientes/clientes podían comer, dormir, jugar, leer, etc. al interior de este hotel. El hotel, una gran estructura de acero, ubicado en Ohio, fue desmantelado en 1942 debido al ingreso de este país a la segunda guerra mundial.

Es así entonces como el uso de oxígeno para tratar enfermedades, tanto respiratorias como cardíacas, se remonta hace más de dos siglos (Berner et al; 2014) mientras que el uso de

oxígeno combinado con altas presiones es posterior. Actualmente a esta combinación se le denomina terapia con oxígeno hiperbárico (HBOT, de su sigla del inglés *Hyperbaric Oxygen Therapy*). La HBOT consiste en aumentar la presión dentro de una cámara presurizada a una presión superior a la presión atmosférica a nivel del mar, mientras los pacientes inhalan oxígeno puro (100%) por un período de una hora. Los pacientes pueden tener uno o dos sesiones por día, por hasta 20 días seguidos (Thom et al; 2011). Esta técnica combina el uso de presión y oxígeno puro, por lo que funciona bajo la ley de Henry que indica que la cantidad de gas disuelta en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial que el gas ejerce sobre el líquido. Además, se cambian las condiciones fisiológicas normales de un organismo, ya que a nivel del mar existe una presión de 760 mmHg, lo que se conoce como 1 atmósfera (ATM). Esta presión es ejercida por una combinación de gases que conforman la atmósfera terrestre, siendo principalmente nitrógeno (78%) y oxígeno (21%), por lo que de esos 760 mmHg el oxígeno solo aporta 53 mmHg (Berner et al; 2014). Sin embargo, el HBOT provoca un aumento en la tensión arterial de oxígeno que puede ir desde los 1000 a los 1600 mmHg (dependiendo del protocolo que se use al momento de realizar la sesión de HBOT), mientras que la tensión de oxígeno a nivel de tejido puede llegar hasta los 400 mmHg (Ambiru et al; 2008).

Hoy en día se sabe que la molécula de oxígeno, debido a sus características fisicoquímicas, es un agente oxidante, es decir, atrae electrones a su capa de valencia con mayor fuerza que otros elementos químicos. Esta propiedad es la que permite en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria generar el gradiente electroquímico necesario para la formación

de ATP (Rodríguez et al; 2001). Una de las enzimas involucrada en la fosforilación oxidativa que se relaciona directamente con el oxígeno es la Citocromo C Oxidasa (COX) presente en las mitocondrias, en tanto otra enzima, relacionada con el ciclo de Krebs, es la Citrato Sintasa (CS). Ambas enzimas han sido utilizadas para determinar la capacidad oxidativa máxima de distintos tejidos (Emmett & Hochachka; 1981; Liknes & Swanson; 2002; Liu et al; 2008 y Zheng et al; 2010). Se han observado cambios en la actividad de estas enzimas provocados por distintos factores, tales como el ejercicio (Hammond et al; 2000) y aclimatación térmica (Vittoria & Marsh; 1996) y, más recientemente, ante tratamiento con HBOT. En el último caso, se describe que el HBOT promueve la disociación del monóxido de carbono (CO) de la COX mitocondrial lo que normalizaría la fosforilación oxidativa y reduciría la producción de radicales libres en casos de envenenamiento con CO (Choudhury et al; 2018).

Esta terapia ha sido usada para el tratamiento de varias enfermedades, al igual que para recuperación de accidentes, como sucede con la intoxicación por CO (Weaver et al; 2002), reperfusión isquémica (Daniel et al; 2011), pie diabético (Faglia et al; 1996., & Karadurmus et al; 2010), entre otras más. En la actualidad la Sociedad de Medicina Hiperbárica (*Undersea and Hyperbaric Medicine Society*) señala que hay 14 indicaciones para HBOT como tratamiento terapéutico eficaz, incluido el embolismo por aire, envenenamiento por CO, heridas crónicas producidas por isquemia periférica (tales como heridas diabéticas), quemaduras, gangrena, absceso cerebral y lesión por radiación. Numerosos ensayos clínicos en fase I se están llevando a cabo en diferentes países, que incluyen tratamientos para patologías como injuria cerebral traumática, parálisis cerebral, síndrome de dolor crónico,

fibrosis, colitis ulcerosa, entre otras (véase *clinical trials.gov*). La medicina hiperbárica se ha convertido en una especialidad, siendo su aplicación recomendable en diversas patologías, y está muy desarrollada en Rusia, Noruega, Francia, Inglaterra, Italia, España, Grecia, Portugal, Finlandia, Alemania y Austria, mientras que en América Latina destacan países como Cuba, México y Argentina. En cuanto a Chile, a fines del año pasado fue instalada una cámara hiperbárica en el hospital público Barros Luco Trudeau, ubicado en la zona sur de Santiago, en donde hasta la fecha se han tratado 2105 pacientes para distintas afecciones, realizándose un total de 421 sesiones de HBOT en la cámara hiperbárica (Informe “Proyecto De Medicina Hiperbárica”, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2018, datos no publicados, gentileza del Dr. Yury Salinas).

Pese a que se ha descrito que terapias con HBOT son un complemento útil y seguro en el tratamiento de heridas, sus mecanismos de acción no se encuentran aun totalmente dilucidados. Recientemente se ha reportado que el uso de HBOT tiene efectos sobre la migración y movilización por sangre periférica de células troncales de medula ósea hacia sitios de injuria de forma tal de beneficiar la re-oxigenación y acelerar el proceso de cierre de heridas (Thom et al; 2006& 2009). Además, se ha mencionado la importancia de HBOT en la proliferación de células troncales neurales en ratones neonatos (Wang et al; 2007 & Zhang et al; 2011) al igual que en ratones adultos (Zhang et al; 2010), revelando cambios en la proliferación de células troncales neurales mediada por  $\beta$ -catenina a través de la vía WNT (Mu et al; 2011). Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos demostrado el efecto benéfico de HBOT, ya sea por si solo o en combinación con terapia celular, en el tratamiento de cierre

de heridas crónicas en un modelo de ratón diabético (Peña-Villalobos et al; 2018). Ante estas evidencias, es plausible plantear que los efectos de HBOT podrían extenderse a otras poblaciones de células troncales somáticas como lo son las células troncales intestinales.

### *1.2 Impacto de HBOT a nivel del intestino*

El uso del tratamiento con oxígeno hiperbárico sobre el intestino ha sido estudiado previamente en el estudio de patologías al sistema digestivo, como la enfermedad de Crohn, obteniendo resultados positivos en pacientes que son refractarios a los tratamientos farmacológicos convencionales. En este contexto se ha propuesto que el HBOT reduce los niveles de actividad de la óxido nítrico sintasa y la inhibición de citoquinas inflamatorias, generando una disminución en la inflamación (Iezzi et al; 2011). Por otra parte, en el caso de accidentes isquémicos intestinales-mesentéricos, se ha demostrado que ratones sometidos a HBOT antes y después de un accidente isquémico intestinal reducen las lesiones provocadas por la falta de oxígeno en los tejidos, teniendo una menor activación de la Caspasa-3, ergo, mayor viabilidad celular, en comparación con los ratones controles (Daniel et al; 2011). Además, se ha estudiado el uso de HBOT, en particular la distribución radial de oxígeno con el microbioma intestinal y como variaciones en estas concentraciones tienen efectos en la proliferación de ciertos tipos de bacterias sobre otras, como es el caso de los órdenes *Proteobacterias* y *Actinobacterias*, teniendo implicancias en enfermedades inflamatorias intestinales (Albenberg et al; 2014).

A pesar de esta evidencia auspiciosa sobre los efectos que genera HBOT, hoy en día existe un debate en la comunidad médica respecto al uso de esta terapia, ya que se propone que HBOT debe ser ocupado como tratamiento complementario para las enfermedades previamente mencionadas, en vez de ser un tratamiento formal en sí. Sin embargo, HBOT presenta ventajas importantes frente a otras terapias, como el de ser un tratamiento sistémico, no invasivo o que se puede realizar a más de un paciente a la vez (las cámaras utilizadas en hospitales tienen por lo general capacidad para 10-12 pacientes), entre otras. Los principales inconvenientes que presenta esta técnica son la falta de un protocolo estándar para realizar este tratamiento (Peña-Villalobos et al; 2018), en relación al número de sesiones y de presión a la que se realiza, además de temas relacionados a la seguridad, como sucede con los barotraumas principalmente (dolor en los senos craneales y dolor de dientes por variación en la presión) (Ambiru et al; 2008).

Las vías de señalización mediante el que HBOT finalmente ejerce un efecto no están del todo estudiadas. Pese a que ha existido un gran progreso en los años recientes sobre el entendimiento de los mecanismos fisiológicos que subyacen al HBOT y como estos afectan a las células y tejidos, quedan muchas dudas por responder. En particular, está muy poco documentado si es que HBOT modularía la dinámica de las células troncales somáticas.

Para poder estudiar los potenciales efectos del HBOT sobre la conducta de células troncales en un periodo acotado de tiempo (20 días, el máximo número de sesiones utilizadas en



tratamientos actualmente), es necesaria elegir una población de células troncales con alta tasa proliferativa como lo son las células troncales intestinales.

### *1.3 Células troncales intestinales*

El intestino es el tejido con la mayor tasa de recambio celular en mamíferos (Snippert et al; 2010), ocurriendo en ratones un recambio total del epitelio en 60 horas (Totafurno et al; 1987), mientras que, en humanos, este proceso sucede en el doble de tiempo (Williams et al; 2015). El intestino en vertebrados se divide en dos partes, intestino delgado e intestino grueso, los cuales a su vez se subdividen en otras porciones, en términos anatómicos y funcionales. Específicamente, el intestino delgado se divide en tres partes, distintas en longitud y grosor: la primera parte corresponde al duodeno, la sección más próxima al estómago por lo que soporta cambios de pH importantes. Luego está el yeyuno, que corresponde la parte intermedia del intestino delgado y finalmente el íleon, que es la zona más próxima al intestino grueso donde ocurre principalmente la absorción de agua y electrolitos (Mcneil et al; 1978).

El rápido recambio celular que posee este epitelio se debe al constante deterioro que sufren las células por distintos factores (aparte del proceso intrínseco de las células), tales como: movimientos de peristalsis (estrés mecánico), cambios de pH a lo largo del intestino (pH del estómago < pH fisiológico), contacto con enzimas catabólicas, exposición a agentes bacterianos y tóxicos, entre otros (Barker et al; 2014).

El recambio homeostático ocurre gracias a las células troncales intestinales (CTI), las cuales, como toda célula troncal somática, se caracterizan por autogenerarse mediante división simétrica o por generar linaje comprometido por una división asimétrica. La CTI al dividirse asimétricamente, genera dos células que no son iguales ya que una mantiene la característica de ser multipotente mientras que la otra se diferencia hacia su linaje en específico (Watt et al; 2000) (Figura 1).

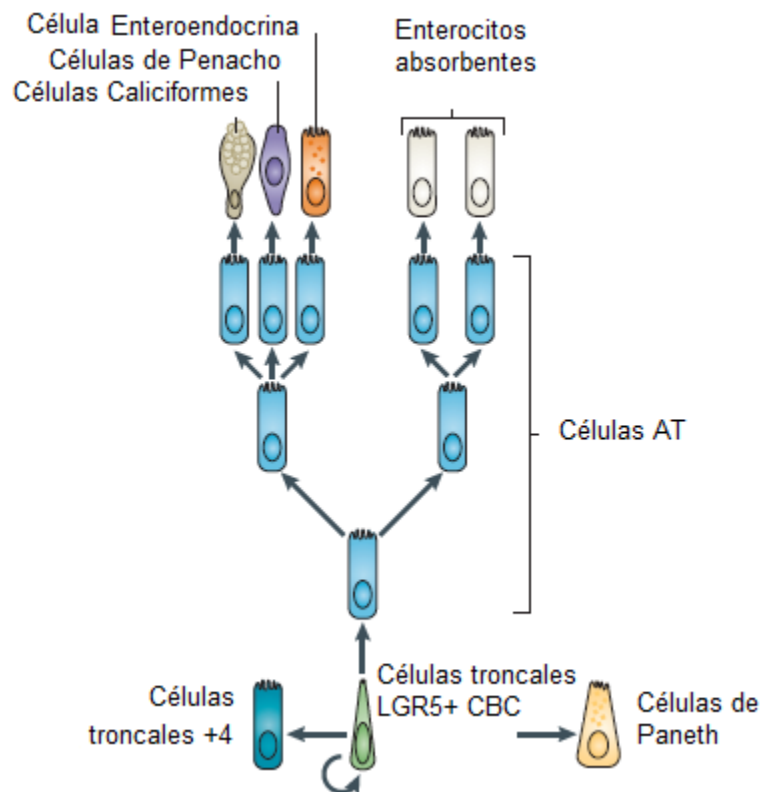


Figura 1: Esquema de la división asimétrica de una célula troncal intestinal y su progenie celular. La célula troncal LGR5+ o célula de la base de la cripta (CBC) da origen a otra población de células troncales, ubicadas en la posición +4 de la cripta. Además, da origen a los demás tipos de células que conforman el epitelio intestinal como son las células de Paneth y células progenitoras (azules) que luego se diferencian a células caliciformes, de penacho, enteroendocrinales o enterocitos absorbentes, las cuales maduran en la zona de amplificación transitoria (AT). (Imagen adaptada de Baker et al; 2013).

Las CTI se encuentran en la zona de las criptas de Liberkühn, las cuales se posicionan entre un vello y el otro (Figura 2). Es en la base de la cripta donde residen las CTI, por lo que se les denomina células de la base (CBC). Estas células también reciben el nombre de CTI Lgr5+ debido a que expresan la proteína LGR5 (Barker et al; 2007) (del inglés: *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5*). Mediante técnicas moleculares de marcaje éstas se pueden diferenciar de una segunda población de células troncales intestinales presentes en la cripta, denominadas células troncales intestinales quiescentes +4 (Potten et al; 1974 & Anderson-Rolf et al; 2017), las cuales reciben este nombre por su posición más alejadas de la base de la cripta.

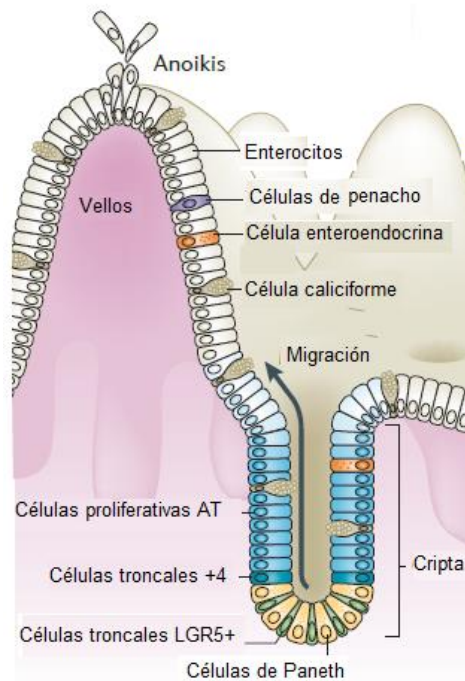


Figura 2: Esquema representativo de la conformación del epitelio intestinal de mamíferos. Se observan las vellosidades intestinales, las cuales a su vez están conformadas por distintos tipos celulares, como los enterocitos, caliciformes y enteroendocrinas. Todas estas células se originan en la cripta donde están las CTI Lgr5+ que comienzan su migración hacia la cima del vello, pasando por la zona de amplificación transiente. En la cima del vello las células diferenciadas se desprenden mediante el proceso de pérdida de adhesión celular (anoikis) (Imagen adaptada de Baker et al; 2013).

La población de células intestinales de las criptas, en particular su dinámica, ha sido muy estudiada y caracterizada. A partir de ello, se han denominado zonas dentro de la cripta para poder diferenciar los procesos que ocurren durante la formación del vello. En la base de la cripta se encuentran intercaladas las CTI Lgr5+ con las células de Paneth. Estas últimas, junto con sintetizar factores anti-bacteriales, también censan la disponibilidad de nutrientes y de esta forma van generando el nicho en el cual se desarrollan las CTI (Clevers et al; 2013 & Roper et al; 2017). No obstante, en los últimos años se ha demostrado que las CTI pueden generar un epitelio completo en ausencia de las células de Paneth, tal como ha sido reportado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Yin et al; 2014 y Durand et al; 2012, respectivamente). Inmediatamente a continuación se encuentra una zona muy acotada denominada zona común de diferenciación (ZCD); en este lugar se encuentra una población de CTI distinta a las CBC ya que éstas expresan proteínas distintas a las Lgr5+ pero mantienen su carácter de célula troncal multipotente (Grün et al; 2015). Además, se ha demostrado que son estas células las cuales responden ante estímulos como radiación o depleción farmacológica de vellos, y no así las CTI Lgr5+. Por lo que se ha propuesto actualmente que existe una jerarquía en la respuesta ante ciertos estímulos entre las CTI Lgr5+ con las CTI +4 (Potten et al; 1987 & 2002). Finalmente se encuentra la zona de amplificación transiente (AT) donde las células progenitoras secretorias dan origen a los

distintos tipos celulares (caliciforme, enteroendocrina, de penacho, etc.) las cuales luego migran a lo largo del vellos hasta la punta donde se desprenden y son eliminadas junto con la heces. Este proceso ha sido descrito que ocurre mediante un tipo de muerte celular programada llamada “Anoikis”, en donde por medio de una pérdida de adhesión celular con la matriz extracelular (células anexas y membrana basal), la célula se desprende del vello y muere (Grossmann et al; 2001 & Dufour et al; 2004).

Mediante el estudio de la dinámica de las poblaciones celulares de las criptas intestinales se han encontrado distintos marcadores específicos para cada población. Para el caso de las CBC se usan los siguientes marcadores: Lgr5 (Barker et al; 2007 & Carmon et al; 2012), Olfm4 (Van Der Flier et al; 2009), Ascl2 (Van Der Flier et al; 2009), Musashi-1 (O’Brien et al; 2007), entre otros. Mientras que para la otra población de células troncales (CTI+4) existe una población de marcadores que los diferencia de las CBC, como son: BMI1 (Sangiorgi et al; 2008, Yan et al; 2011 & Tian et al; 2011), Lrig (Powell et al; 2012 & Wong et al; 2012), HopX (Takeda et al; 2011) y mTERT (Montgomery et al; 2011) (Tabla 1). Por lo anterior, experimentalmente es posible caracterizar muy bien las poblaciones de CTI y así poder evaluar los efectos relacionados con la proliferación sobre cada una de estas poblaciones por separado.

	CTI LGR5+	CTI +4
Marcadores	Lgr5	Bmi1
	Olfm4	Lrig
	Ascl2	HopX
	Musashi-1	mTERT

Tabla 1: Marcadores utilizados entre las distintas poblaciones de CTI. En la columna izquierda están los marcadores utilizados para identificar las CTI Lgr5+ mientras que a la derecha se presentan los marcadores utilizados para identificar a las CTI +4. (Nefzger et al; 2016)

#### 1.4 Vía mTOR, un sensor metabólico clave

El intestino es el epitelio con mayor tasa de recambio celular en mamíferos. Este recambio está controlado por el blanco de Rapamicina en mamíferos, mTOR, (del inglés: *Mechanistic target of rapamycin*), una proteína serina/treonina quinasa. Esta quinasa regula el crecimiento celular, proliferación, motilidad y supervivencia celular a través de la regulación de la transcripción de genes y de la síntesis de proteínas en respuesta a hormonas, factores de crecimiento, nutrientes y oxígeno (Li et al; 2014 & Zarogoulidis et al; 2014).

La quinasa mTOR forma dos complejos distintos al conjugarse con efectos diferentes. Al interactuar con la proteína Raptor, forma el complejo mTORc1 (Kim et al; 2002), mientras que al hacerlo con la proteína Rictor forma el complejo mTORc2 (Sarbasov et al; 2004). Ambos complejos son multiproteicos, siendo Raptor y Rictor las proteínas principales. El equilibrio entre la formación de estos complejos está dado por una inhibición competitiva por mTOR entre las proteínas Raptor y Rictor, además de la cantidad y tipo de estímulo que estén censando las células en un determinado momento (Toschi et al; 2009). El complejo

mTORc1 está relacionado con el crecimiento y proliferación celular (Kim et al; 2013) mediante la regulación en la síntesis de proteínas, como la fosforilación e inactivación del represor de la traducción del ARNm, conocido como factor eucariótico de iniciación 4E de unión a proteínas (4E-BP1, del inglés: *4E binding protein 1*) o también por medio de la fosforilación y activación de la quinasa S6 (S6K1) (Hay et al; 2004), convirtiendo estas proteínas en blancos para analizar la vía de mTORc1. Mientras que el complejo mTORc2 se relaciona principalmente con la supervivencia celular (Gao et al; 2012) por medio de la remodelación del citoesqueleto a través de la proteína quinasa C1 (PKC1) (Sarbasov et al; 2004, Jacinto et al; 2004 & Anglikier et al; 2014).

Como su nombre lo indica, mTOR es sensible a Rapamicina. Esta droga es un tipo de macrólido inmunosupresor, producido por la bacteria llamada *Streptomyces hygroscopicus* (Vezina et al; 1975), cuyo descubrimiento fue realizado gracias a una muestra de suelo tomada en la isla de Rapa Nui (de ahí su nombre) en 1964. Pero no fue sino hasta 1994 que se descubrió que los efectos que provocaba la administración de Rapamicina eran causadas por la inhibición de mTOR (Saxton & Sabatini; 2017). La vía mTOR es conservada en el genoma de varios organismos, desde levaduras hasta mamíferos, conservando una estructura aminoacídica muy similar (42% de la secuencia es idéntica entre levaduras y mamíferos) (Hay et al; 2004). Razón por la cual ha sido estudiada en diversos modelos como lo son levaduras (Heitman et al; 1991), *D. melanogaster* (Bjedov et al; 2010), *C. elegans* (Long et al; 2002), *M. musculus* (Harrison et al; 2009, Spilman et al; 2010 y Zhai et al, 2018),

analizando su papel en diversos procesos como lo son el ciclo celular, crecimiento celular y senescencia celular, principalmente.

### *1.5 mTORc1 y su relación con el intestino delgado*

La vía mTORc1 en el epitelio intestinal se ha visto que es central en distintos procesos metabólicos. En cáncer gástrico se ha descrito una sobre activación de la vía de mTORc1, pero al ser inhibida con ortólogos de Rapamicina (como lo es everolimus) se evita la proliferación de las células cancerosas, al igual que la angiogénesis en el tumor mismo (Fujishita et al; 2008). Por otra parte, se ha estudiado esta vía en temas relacionados con la alimentación, proponiendo a mTORc1 como un sensor energético ante la disponibilidad de ciertos aminoácidos en la dieta, como lo es la arginina, promoviendo así la migración de las células intestinales (Rhoads et al; 2006). Sin embargo, ante una situación de restricción calórica (definida como la reducción de nutrientes en la dieta pero sin generar mal nutrición), el grupo de Yilmaz (2012) encontró que tratamientos que van desde las 6-24 semanas provocan una regulación por parte de las células de Paneth en la expresión de mTORc1, lo que lleva a la secreción de un factor paracrino denominado cDAPR, el cual impacta directamente en las CTI Lgr5+, generando un aumento en su replicación por sobre la diferenciación celular. Por otra parte, el grupo de Zhou (2016) demostró que la vía de mTORc1 regula la diferenciación celular en el epitelio intestinal, principalmente a las células de Paneth y caliciforme, provocando una disminución en la población de estas células ante un aumento en la actividad de mTORc1. Esto último se debería a la inactivación de TSC (del



inglés Tuberous Sclerosis Complex), una proteína necesaria para la expresión de un marcador de diferenciación celular específico para la formación de estas células.

### *1.6 Relación de mTOR con los niveles de oxígeno*

El complejo de mTOR, junto con censar niveles energéticos (disponibilidad de aminoácidos y de glucosa), también es capaz de censar niveles de oxígeno. Esto se observó por primera vez en el modelo de *D. melanogaster*. Al generar individuos mutantes que poseían niveles de concentración bajos de oxígeno (hipoxia) se documentó una reducción en la actividad de S6K1, pero no de PKB/Akt. Esta evidencia implica que la reducción en los niveles de oxígeno disponible por las células es censada por mTOR a través de distintos mecanismos, como la activación de la vía AMPK que inhibe directamente a mTORc1, además de la inducción de REDD1, la cual activa a TSC, un inhibidor indirecto de mTORc1 (Saxton & Sabatini: 2017), afectando río abajo de esta vía y no así río arriba (Reiling et al; 2004). El complejo de mTORc1 necesita además al complejo TSC1/2 para poder censar oxígeno. Este último complejo funciona de manera distinta ya que se activa mediante el factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , de sus siglas en inglés: *hipoxia induced factor 1 alpha*) y otros factores reguladores (Sarbasov et al; 2005). Por otra parte, también se ha estudiado la relación entre la disponibilidad de ATP con la actividad de mTORc1, demostrando *in vitro* que la actividad de este complejo determina la tasa de consumo basal de oxígeno y capacidad oxidativa de las células en mamífero, relacionándose estrechamente un aumento en la capacidad oxidativa con la formación del complejo mTOR-Raptor. Pero además se relaciona específicamente con

la actividad mitocondrial, por lo que al inhibir este complejo mediante Rapamicina se disminuye el consumo de oxígeno y la producción de ATP por parte de la mitocondria (Schieke et al; 2006). Este efecto también se logra al inhibir río arriba de la vía mTOR; al disminuir PI3K en líneas cancerígenas, se provoca una disminución en el consumo de oxígeno de estas células debido a la reducción en la síntesis de ATP por parte de las mitocondrias (Kelly et al; 2014).

Finalmente, varios estudios han demostrado que el uso de HBOT es capaz de aumentar los niveles de ATP en distintos tejidos (musculo, corazón, hígado, cerebro) de manera paulatina (Sanders et al, 1966 & Nylander et al, 1989), mientras que el grupo de Nagamine (2004) demostró que el uso de HBOT en ratones es capaz de aumentar los niveles de ATP en el hígado por hasta 50 horas después de la aplicación de HBOT.

Considerando los antecedentes planteados, el presente trabajo busca determinar si existe un efecto por parte de HBOT sobre la proliferación de las CTI, como lo sugieren trabajos previos con otras poblaciones de células troncales somáticas y se plantea en un solo trabajo con CTI realizado en nuestro laboratorio (véase Peña-Villalobos et al; 2018), y si éste guarda relación con la vía mTOR, particularmente con el complejo mTORc1.

## 2 Hipótesis

Dado que la vía mTORc1 es sensible a los niveles de oxígeno y esta vía es necesaria para la replicación celular, el uso del tratamiento con oxígeno hiperbárico provocaría un incremento en la proliferación de las células troncales intestinales.

### 2.1 *Objetivo general*

Describir y analizar los efectos que provoca el tratamiento con oxígeno hiperbárico sobre la proliferación de las células troncales intestinales en *Mus musculus*, además de relacionar el aumento en la tensión de oxígeno con la modulación de la actividad de la vía mTORc1.

### 2.2 *Objetivos específicos*

1. Describir los efectos que genera HBOT aplicado por 10 o 20 días consecutivos, sobre la proliferación de las células troncales intestinales, además de estudiar los cambios en la morfología del epitelio intestinal.
2. Analizar la actividad de enzimas indicadoras de la capacidad aeróbica y de producción de ATP de los tejidos, como lo son las enzimas Citocromo C Oxidasa y Citrato Sintasa, en el epitelio intestinal de individuos sometido a HBOT crónico.
3. Relacionar los efectos de HBOT sobre el epitelio intestinal con la vía de mTORc1 como efectora en los procesos de proliferación de células troncales y progenitoras intestinales.

### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 *Mantenimiento de los animales*

Para la realización de esta tesis fueron ocupados 58 ratones machos adultos (8-11 semanas) de la cepa BALB/c (Laboratorio Jackson). Estos animales fueron mantenidos en los bioterios de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Los individuos se mantuvieron en jaulas junto a los miembros de su misma camada (4 individuos  $\pm$  1), con acceso a sus fecas y con viruta comercial, esterilizada. La sala en la que fueron albergados se encontraba a una temperatura de 25°C ( $\pm$  2°C) con un ciclo controlado de día/noche de 12 horas. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con la legislación chilena y fueron aprobados por el comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Chile y CONICYT.

Los individuos fueron alimentados periódicamente con un pellet comercial para roedores de laboratorio (Prolab RMH 3000) y con agua *ad libitum*.

Se generaron cuatro grupos para la determinación de los efectos de HBOT por 10 o 20 días consecutivos, siendo éstos: Control 10 días (C10D), HBOT 10 días (H10D), Control 20 días (C20D) y HBOT 20 días (H20D). Para la determinación de los efectos de Rapamicina se generó otros cuatro grupos: DMSO Ctrl, DMSO HBOT, Rapa Ctrl y Rapa HBOT. Todos los grupos fueron conformados por ratones que no pertenecían a la misma camada.

### 3.2 Tratamiento con oxígeno hiperbárico

Todas las sesiones fueron realizadas en una cámara experimental, construida en Chile (Osorio hermanos y Cia.) de un volumen de 19,56 L, con control de temperatura (sesiones realizadas a 25°C), luz interior, ventanillas de observación y cámara fotográfica integrada, además de sensores de presión, niveles de dióxido de carbono, oxígeno y humedad (Figura 3).



Figura 3: Imagen de la cámara hiperbárica experimental. Vista frontal de la cámara de HBOT en donde se realizaron las sesiones. Se observa el tablero de control en la parte frontal y las dimensiones de la máquina completa (150 cm x 90 cm). Cámara hiperbárica construida por empresa Osorio hermanos y Cia en colaboración con el laboratorio de la Dra. Palma.

En breve, se señala el desarrollo de las sesiones de HBOT: los ratones fueron colocados en cajas individuales dentro de una esclusa y posteriormente se procedió a cerrar la cámara para su presurización. El aire en su interior fue remplazado por oxígeno hasta llegar a una concentración del 100% y alcanzar una presión de 2 ATA (atmosferas absolutas) en un periodo de 15 minutos. Luego estas condiciones fueron mantenidas por un periodo de una hora, realizando un recambio de oxígeno transcurrido la primera media hora para evitar la acumulación de CO<sub>2</sub>, sin disminuir la presión. Terminada la hora de tratamiento con oxígeno hiperbárico, se procedió a la descompresión de la cámara, lo cual igual llevó un tiempo de 15 minutos para evitar problemas con la solubilidad de las burbujas de nitrógeno. Finalmente, los animales fueron retirados de la cámara hiperbárica y puestos de nuevo en la jaula junto a sus hermanos que permanecieron durante todo momento en normoxia y normobaria (grupo control). El grupo control fue transportado desde el bioterio hasta el lugar de la cámara, con el fin de ser sometidos a los mismos estímulos tanto olfatorios, visuales al igual que auditivos, con la salvedad de que no eran introducidos a la cámara hiperbárica.

Todas la sesiones se realizaron durante el periodo de menor actividad de los ratones (fotofase), entre las 11:00 AM-13:00 PM (UTC -4). El protocolo se siguió según Peña-Villalobos et al; 2018.

Durante las sesiones la cámara se mantuvo a 25°C ( $\pm 0,1$  °C) e iluminada con luz artificial puesto que la cámara cuenta con una ventana para observar a los ratones y permite la entrada de luz.

### *3.3 Obtención de órganos en ratones.*

Terminada la última sesión de HBOT se dio un pulso de BrdU (Dako, 20 mg/ml, inyección i.p de 80  $\mu$ l) de una hora, antes del sacrificio de los individuos. Inmediatamente después se pesaron los individuos para luego poder disectar los distintos órganos.

El tracto intestinal fue retirado del animal y se mantuvo en PBS frío. Se separó el intestino delgado (ID) del grueso, seguidamente se procedió a extraer el tejido mesentérico restante y el material en digestión del ID se removió mecánicamente, luego se procedió a pesar y medir el ID. Posteriormente se separó el primer tercio (duodeno) del ID y se cortó por la mitad, longitudinalmente. Una mitad se fijó en PFA 4% (Merck) por una hora en hielo y luego se lavó 3 veces con PBS para finalmente pasar a una solución de sucrosa 30% por 24 horas a 4°C. Luego el tejido fue montado en O.C.T (Tissue-Tek) de forma tal que la región más anterior quedó enrollada hacia el centro mientras que la región posterior quedó hacia el exterior (Figura 4). Las muestras fueron conservadas a -20°C. La mitad restante fue cortada transversalmente, una parte se guardó en viales (Nunc CryoTubeVials) y se pasó por nitrógeno líquido para luego ser almacenada a -80°C hasta su análisis. La parte restante fue homogenizada en sonicador (Omni-Ruptor 4000) en buffer de lisis con inhibidor de proteasas (10  $\mu$ l 100x por ml), luego fue alicuotada en fracciones de 200  $\mu$ l y guardada a -80 °C.

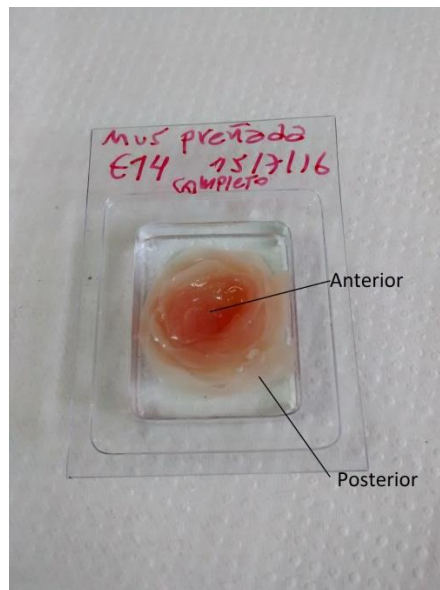


Figura 4: Imagen representativa de procesamiento y preparación de los cortes de duodeno murino. Después de ser fijados en PFA 4% y deshidratados en sucrosa al 30%, el intestino delgado se enrolló desde la porción anterior (más cercana al estómago) hacia el centro mientras que hacia la periferia se encuentra la porción posterior del duodeno.

El hígado fue retirado del animal y pesado inmediatamente. Luego de ser cortado por la mitad, una mitad fue guardada en viales y pasada por nitrógeno líquido antes de ser almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en tanto la otra mitad fue puesta en buffer de lisis con inhibidor de proteasas ( $5\ \mu\text{l}\ 100\text{x}$  en  $500\ \mu\text{l}$ ) y pasada por nitrógeno líquido antes de ser almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El músculo esquelético fue obtenido de la extremidad posterior del individuo (fémur) y puesto en buffer de lisis con inhibidor de proteasas ( $5\ \mu\text{l}\ 100\text{x}$  en  $500\ \mu\text{l}$ ) y congelada en nitrógeno líquido antes de ser almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Los demás órganos (Corazón, riñones, bazo, estómago y aparato reproductor) fueron removidos y pesados en balanza (Sartorius BP1215, d: 0,1 mg) para luego ser descartados junto con las carcasas de los individuos.

#### *3.4 Inyección Intraperitoneal de Rapamicina*

El stock de Rapamicina (Calbiochem) fue disuelto en dimetil-sulfoxido (DMSO) (5 mg/ 125  $\mu$ l) y luego diluido en PBS 1:100 v/v. El volumen total fue alicuotado en tubos de 1 ml y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La inyección intraperitoneal (i.p) fue administrada día por medio, alternando el lado de la inyección. Se inyectó 100  $\mu$ l de solución de forma tal que se administraba una dosis de Rapamicina de 2 mg/ kg. Se inyectó 10 veces a cada ratón en un periodo de 20 días (según Chen et al; 2009). La inyección fue administrada siempre antes de cada sesión de HBOT en el mismo horario ( $\pm 2$  horas) y por la misma persona.

#### *3.5 Inmunohistoquímica*

Las muestras de intestino montadas en O.C.T se cortaron en criostato (Tissue-Tek, Merck) de un grosor de 8 y 14  $\mu$ m, se almacenaron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización para inmunohistoquímica (tiempo menor a un año para su procesamiento).

Los portaobjetos fueron lavados 2 veces en PBT 1X por 5 minutos, luego se procedió a inhibir la peroxidasa endógena del tejido con peróxido de hidrogeno (0,3%) en metanol (1:100) por 5 minutos en oscuridad. Posteriormente se realizaron dos lavados rápidos (2-3 minutos) en

PBT para pasar al desenmascaramiento con buffer citrato + EDTA (0,3%) a 80°C por una hora. Transcurrido este tiempo se mantuvieron las muestras en PBT y se agregaron 200 µL de borohidruro de sodio por 2 minutos, luego se dejaron en HCl 2N (en PBT) a 37°C por media hora, se volvieron a lavar en PBT por 5 minutos y se procedió a dejar las muestras en borato de sodio por 10 minutos. Finalmente se procedió a bloquear las muestras usando suero del kit ABC (R.T.U. Vectastain Kit, Prolab) por una hora en cajas húmedas a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron las muestras y se dejó incubando el anticuerpo primario anti-BrdU (1:100, Dako) por toda la noche a 4°C en cajas húmedas.

Al día siguiente se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron las muestras en PBT, se agregó el anticuerpo secundario (R.T.U biotinylated universal antibody anti-rabbit/mouse IgG (H+L)) sobre el portaobjetos y se dejó por una hora, se lavó el anticuerpo secundario y se procedió a agregar el ABC reagent (Vectastain R.T.U. elite ABC reagent). Transcurrido 30 minutos se lavaron las muestras y se procedió a la revelación del marcador mediante DAB (1:10, Roche) por un tiempo de 1-2 minutos para pasar luego a la contra-tinción con hematoxilina (1:10, Merck). Las muestras pasaron por una batería de alcoholes en orden creciente de concentración hasta llegar al Xilol para finalmente ser montadas.

### *3.6 Inmunofluorescencia*

Se realizó el mismo protocolo que para la inmunohistoquímica (IHQ) con la salvedad que los cortes fueron de 14 µm para realizar imágenes 3D utilizando microscopia confocal (Zeiss 710). La incubación del primario para la detección de Olfactomedina 4 fue con anti-Olf4

rabbitmAb (1:400, Cell Signaling) y el secundario fue goat anti-rabbit Alexa 488. Para el caso de BrdU el primario fue el mismo que para IHQ (1:100, Dako) mientras que el secundario corresponde a goat anti-mouse Alexa 555 (1:500, Lifetechnologies). Para la tinción de núcleos se utilizó DAPI (1:10000, Invitrogen).

### *3.7 Microscopia y análisis de imágenes*

Para la observación de IHQ se utilizó un microscopio óptico (Olympus Bx51), con este se contó el número de células BrdU+ y se obtuvieron fotos con el objetivo 40X mediante el programa “MoticImage Plus 3.0”. Con este mismo programa se midió el largo y ancho de las criptas.

Para la observación de las IF se utilizó un microscopio confocal (Zeiss 710) usando el objetivo 40X y 63X, las fotos se obtuvieron mediante el programa Zeiss. Para la detección de BrdU (Alexa 555) se excitó con fluorescencia a 550 nm, Olfm4 (Alexa 488) se excitó con fluorescencia a 460 nm, mientras que DAPI se hizo con fluorescencia a 400 nm.

### *3.8 Análisis de células BrdU+ por cripta intestinal*

Las criptas de los individuos fueron contadas bajo microscopio (Olympus BX51), se contaron 36 criptas por individuo en cada tratamiento utilizando el mismo criterio de observación. Siendo consideradas criptas solo aquellas que se encontraban entre 2 vellosidades y/o que presentaban en la base de la cripta células con un contenido granular en su citoplasma (esto ya que todas las criptas que se observaron tenían esta característica). La zona que delimitaba el final de la cripta era considerada de donde comenzaba la vellosidad. Todas las células

BrdU+ que se contaron pertenecían a la cripta bajo estos criterios (Peña-Villalobos et al; 2018).

### 3.9 Mediciones de ancho y longitud de las criptas intestinales

Para analizar el largo y ancho de las criptas se utilizó el programa “MoticImage Plus 3.0” para poder trazar líneas desde la base de la cripta, desde el centro hasta la base del vello. El ancho se midió trazando líneas en la parte central de cripta. (Figura 5A).

Para poder analizar el número de células/área (densidad celular) se ocupó el programa “ImageJ”, en el cual se contabilizó cuantas células había en 30  $\mu\text{m}$ , desde la base hacia el vello (Figura 5B).

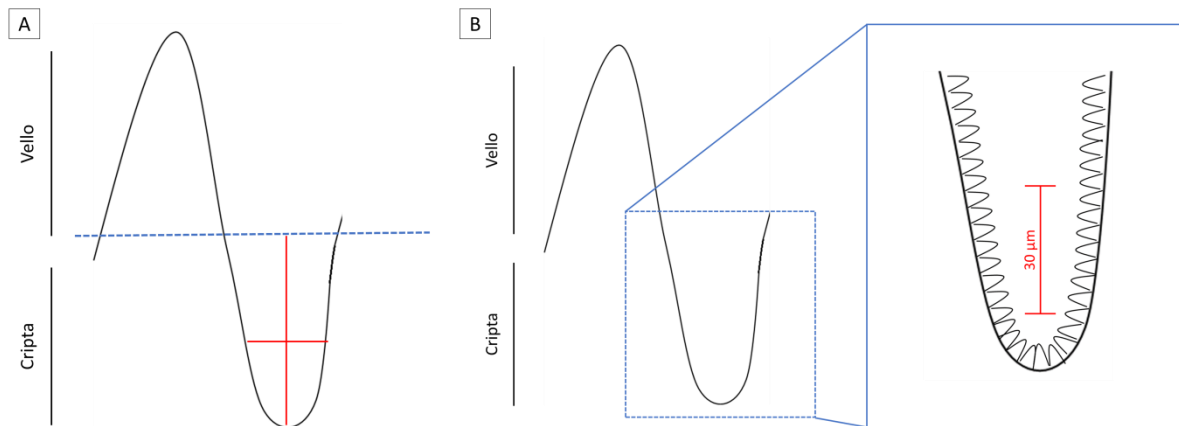


Figura 5: Esquema descriptivo de las mediciones realizadas en las criptas intestinales. A) Medición de la longitud y ancho de las criptas (líneas rojas) considerando la base del vello el término de la cripta (línea azul). B) Medición de la densidad celular en la cripta, considerando una distancia de 30  $\mu\text{m}$  desde la base hacia el vello.

### *3.10 Análisis enzimático para Citocromo C Oxidasa (COX) y Citrato Sintasa (CS)*

Las determinaciones de actividad enzimática afín se realizaron en homogenizados de tejido de intestino delgado, siguiendo los protocolos de Srere (1969), Drahota (2004), Wakshlag (2004) y Berner & Bessay (2006). Brevemente, el tejido intestinal fue homogenizado en medio líquido (1 ml de medio por cada gramo de tejido) (150 mM sacarosa, 2 mM EDTA, y 100mM Tris-HCL, pH 7,5) mediante un homogeneizador Ultra Turraxa velocidad máxima a 4°C. La actividad de CS fue determinada por espectrofotometría (Microplate readerAsysHiTech UVM340), registrando el cambio en la densidad óptica a 232 nm por unidad de tiempo, usando oxaloacetato como sustrato (0,16 mM) y acetyl Co-A (0,16 mM) en tampón de Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0). La actividad de la Citocromo C Oxidasa fue determinada por espectrofotometría (Microplate readerAsysHiTech UVM340), registrando el cambio en la densidad óptica a 550 nm por unidad de tiempo, en un medio con fosfato de potasio (100 mM), citocromo reducido (0,075 mM), ferricyanida de potasio (0,33% (p/v)). La reducción del citocromo fue llevada a cabo por la adición de ácido ascórbico (1,25 mg/mL), pH 7,5.

### *3.11 Western-Blots*

Las muestras homogenizadas de duodeno, guardadas a -80°C, tratadas con inhibidor de proteasas (Thermo) y pastillas de inhibidor de fosfatasas (Roche) fueron cargadas de manera homogénea (50 µg) en un gel de acrilamida post cuantificación según el método de Lowry con absorbancia a 550 nm (Tecan M200). Luego fueron transferidas a una membrana de

nitrocelulosa, se bloqueó con BSA 5% en TBS-T 0,1% por una hora y se incubó con el anticuerpo rabbit anti-Phospho p70 S6K1 (Thr389) (Cell Signaling Technology) o con rabbit anti-p70 S6K1 (Cell Signaling Technology) (según sea el caso) por 16 horas, el anticuerpo primario fue utilizado según las especificaciones del proveedor, 1:1000 en 5% BSA, TBS-T 0,1%. Seguidamente, se lavó la membrana 3 veces por 15 minutos y se incubó el anticuerpo secundario por una hora, mouse anti- rabbit HRP, 1:5000 (Santa Cruz). El revelado se realizó mediante fotodocumentador (Uvitec Cambridge). Para el control de carga se utilizó  $\beta$ -actina (42 kDa), para lo que se cortó la membrana luego del Ponceau por sobre la marca de los 55 kDa y se procedió a bloquear con leche por una hora, luego se incubó con el anticuerpo Mouse anti- $\beta$  actina, 1:5000 en 5% leche en TBS-T 0,1% por 1 hora, el secundario Rabbit anti- mouse HRP 1:5000 en leche en TBS-T 0,1% por 1 hora. El revelado fue realizado de la misma manera.

Además, se realizó una revelación mediante películas médicas de rayos-X (Super HR-U, Fujifilm), exponiendo la película por una hora en oscuridad para el caso de S6K1-P y S6K1, mientras que para  $\beta$ -actina la exposición fue de 10 segundos.

### *3.12 Análisis estadísticos*

Para comparar el número de células BrdU+ entre los distintos tratamientos con el objeto de determinar si existen diferencias entre ellos, se realizó una prueba de 10000 permutaciones con un máximo error de tipo I del 5% (p-valor = 0,05), ya que los datos fueron normales. Los

análisis fueron realizados mediante la utilización del programa “R”. En las comparaciones múltiples se aplicaron correcciones de Bonferroni correspondientes.

El análisis de las distribuciones de datos se realizó mediante la prueba de Kolgomorov-Smirnov mediante el programa en línea “KS-test Data Entry” de la Universidad de Saint Benedict Saint John’s. ([http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.n.plot\\_form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.n.plot_form.html)).

Para el cálculo del coeficiente de variación se utilizó el programa Excel 365 2016 mientras que para la construcción de gráficos de distribuciones se realizó con el programa SigmaPlot 10.0. Los gráficos de “Boxplot” se obtuvieron con el programa PrismGrphpad versión 8.0, las barras corresponden a los máximos y mínimos.

El análisis del largo, ancho y número de células (en 30  $\mu\text{m}$ ) por cripta se realizó mediante la prueba de 10000 permutaciones utilizando el programa “R”.

Para el análisis de la actividad de mTORc1, se utilizó el programa Prism Graphpad versión 8.0. Se analizó mediante ANOVA de una vía y además por permutaciones en el programa “R”

## 4 Resultados

Se ha demostrado que la terapia con HBOT promueve la proliferación de células troncales somáticas *in vivo* en diversos modelos animales (Thom et al; 2006 & 2009, Wang et al; 2007 & Zhang et al; 2011). Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen este efecto no han sido estudiados en profundidad. En este trabajo se propuso estudiar si la terapia con HBOT induce la activación de las CTI a través de una modulación en la señalización del eje mTORC1. Para ello, primeramente, nos propusimos identificar claramente la población celular a estudiar, las CTI de la base.

### 4.1 Identificación de CT mediante inmunofluorescencia

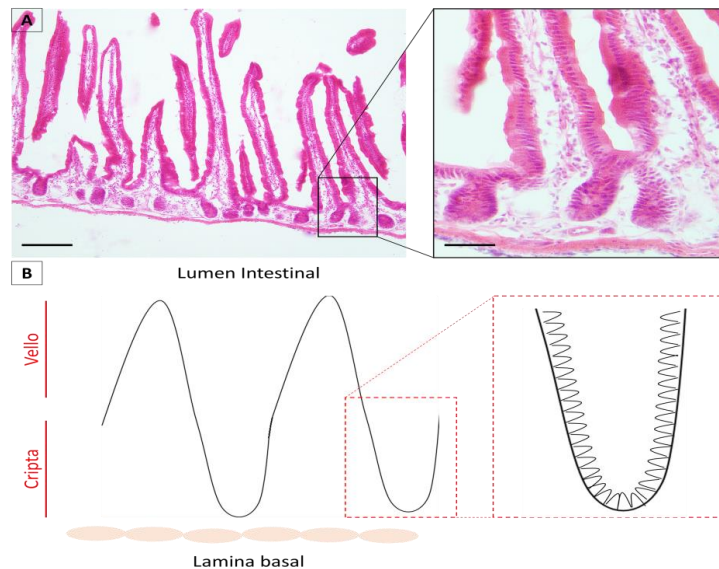


Figura 6: Imagen representativa del epitelio intestinal indicando ejes de los cortes. A) Imagen panorámica de un corte de duodeno murino. Se observan vellos y criptas, además de lámina basal. En el recuadro se amplifica la base del vello y la cripta intestinal. Tinción con Hematoxilina. Barra= 50  $\mu\text{m}$  (izquierda) y 20  $\mu\text{m}$  (derecha) B) Esquema de los cortes y fotografías de las criptas. Se muestra diferencia entre vello y cripta, al igual que se denota la posición con respecto a la lámina basal y el lumen. El recuadro muestra la distribución espacial de las CTI en los cortes de criptas.



El nicho de las células troncales en el intestino es heterogéneo y en él coexisten al menos dos subtipos de CTI: un grupo denominado CTI Lgr5+ /CBC, que expresan además Olfm4, y otro grupo de células troncales denominadas CTI +4. Se observó que el marcador de CTI, Olfm4, en concordancia con lo reportado en la literatura (Nefzger et al; 2016), tiene una distribución citoplasmática en las CBC, tal como se muestra en la figura 7.

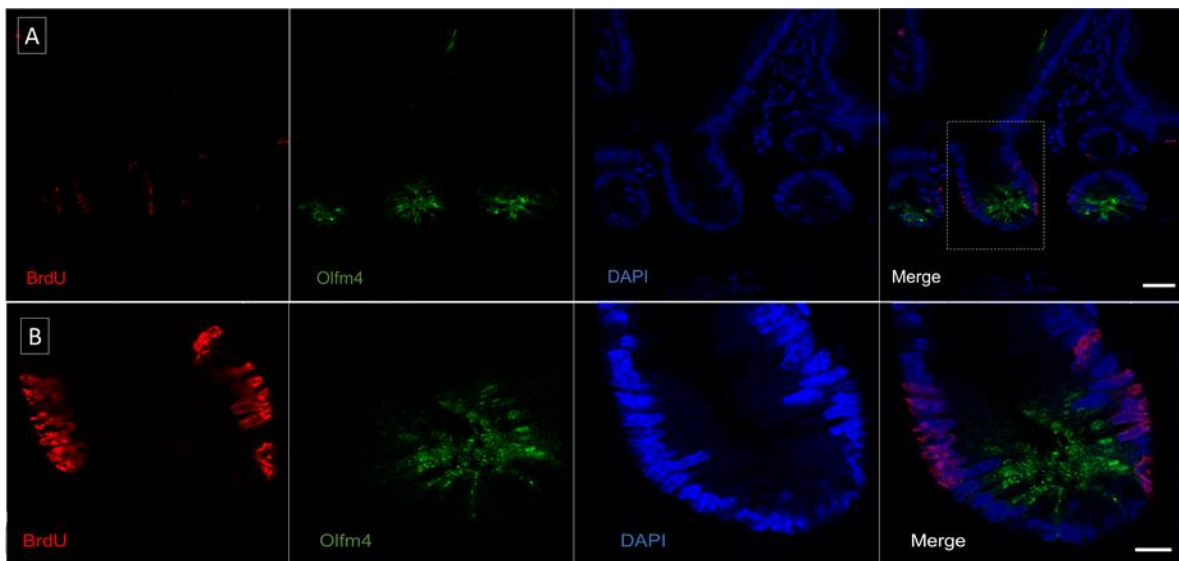


Figura 7: Imagen de una inmunofluorescencia representativa de un corte de intestino delgado. Fila A) se muestra las células en proliferación (BrdU+), las CTI de la base (Olf4+) y los núcleos de todas las células (DAPI). En la parte superior derecha se muestran las tres tinciones sobrepuestas (Merge). En esta imagen se observa junto al recuadro otras criptas, pero cortadas transversalmente, y se hace notar que éstas no fueron consideradas al momento de realizar el análisis de proliferación. Barra= 30  $\mu$ m. Fila B) se muestra la misma imagen ampliada del recuadro indicado en A, correspondiente a una sola cripta. Barra=15  $\mu$ m.

En la figura anterior se observa que la distribución del marcador de CTI de la base, Olfm4, se encuentra en el citoplasma de algunas células en la base de la cripta. El corte de esta imagen es de 14  $\mu$ m y es una reconstrucción del eje Z, por lo que no están todas las células en el mismo plano. En la figura 8, se muestra de forma ampliada y detallada el mismo corte.

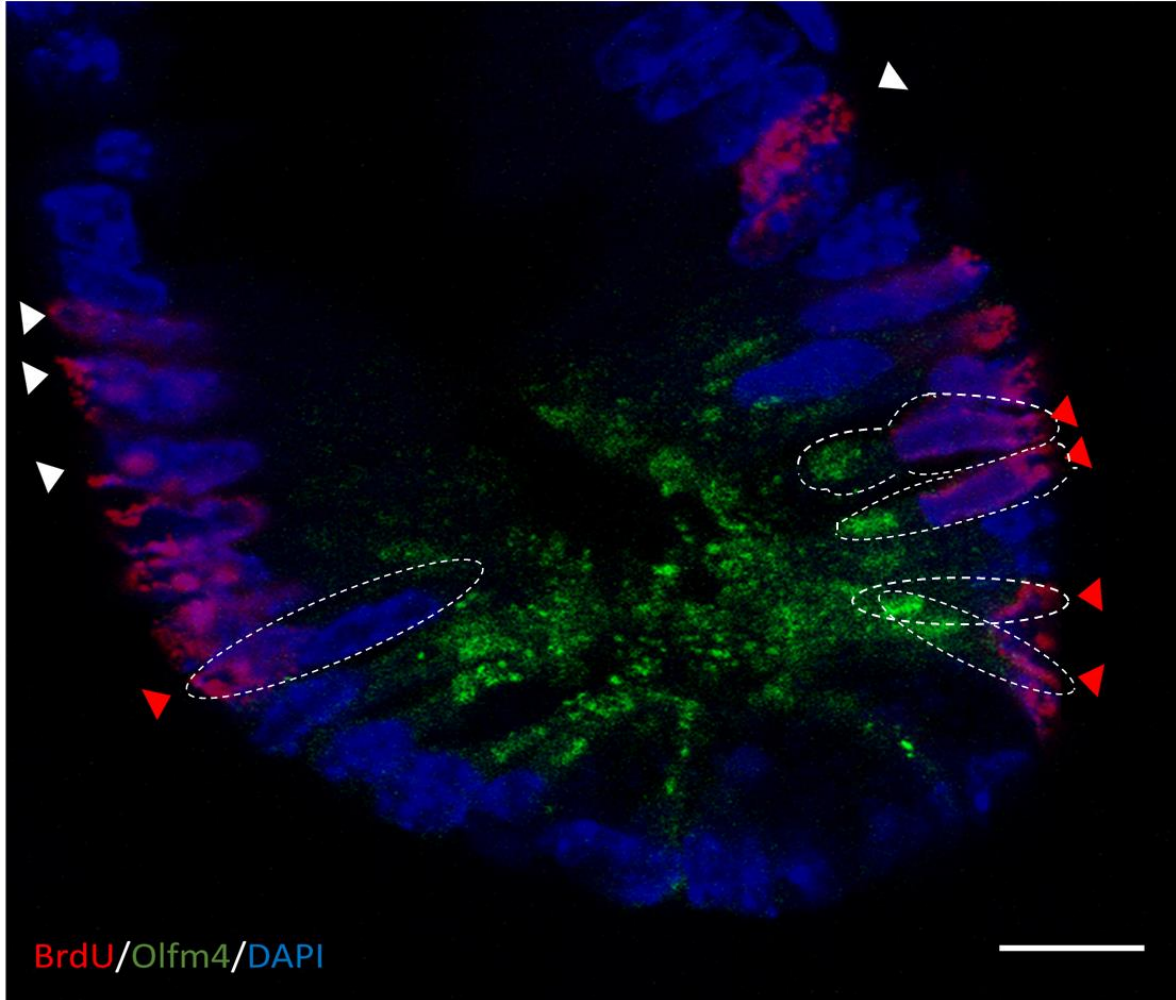


Figura 8: Imagen representativa de una cripta intestinal, ilustrando detalle de la base de la cripta. Imagen de una reconstrucción en Z, grosor de la muestra de 14  $\mu\text{m}$ . Las flechas rojas marca las células que luego de un pulso de BrdU de una hora co-distribuyen con la marca de Olfm4. (Interlineado marca el contorno celular) Nótese que hay células BrdU + que no presentan la marca Olfm4 (cabeza de flecha blanca). Barra= 15  $\mu\text{m}$ .

En la figura 8 se observa con mayor detalle la distribución de los distintos marcadores, en la zona de la base se observan células con los tres marcadores, indicando que son las CTI Lgr5+ las que mayoritariamente proliferaron durante este pulso de BrdU. Sin embargo, las flechas blancas muestran otras células que incorporaron la marca de BrdU, pero que no poseen señal

para el marcador Olfm4, por lo que no se puede descartar que sean progenitores celulares derivados de CTI Lgr5+ o inclusive, CTI +4.

#### *4.2 Células BrdU+ por cripta*

Una vez que se comprobó, en base al uso de marcadores, que las células que proliferan en la cripta son principalmente las CTI CBC, se procedió a realizar ensayos de inmunohistoquímica para realizar los análisis de comparación de promedios de células BrdU+ por cripta entre los distintos grupos por medio de análisis por permutaciones. Para ello se compararon los valores obtenidos de la medición de 36 criptas por individuo, con un n= 3 en cada grupo y además la comparación de la distribución de estos datos por medio del análisis de Kolmogorov-Smirnov. En la figura 9 se muestran imágenes representativas de cortes procesados para inmunohistoquímica, destacando en color café oscuro las células BrdU+, para los 4 grupos experimentales.

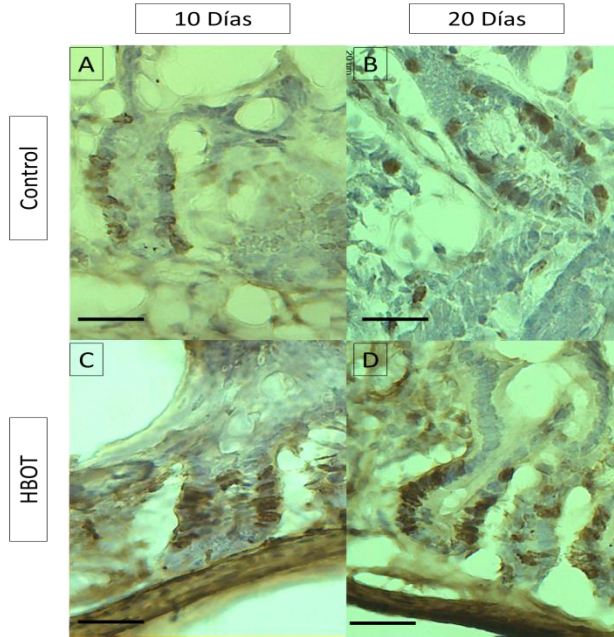


Figura 9: Imágenes representativas de inmunohistoquímica anti-BrdU en cripta de intestino delgado de ratón. A) Se muestra un corte representativo del grupo control 10 días B) corresponde a una sección del grupo control de 20 días, mientras que en C y D se muestran las imágenes correspondientes del grupo HBOT 10 días (C) junto a la del grupo HBOT 20 días (D). Tinción de Hematoxilina (morado) combinado con inmunohistoquímica para células BrdU+ (café). Barra= 20  $\mu$ m.

#### 4.3 Efectos del HBOT sobre la proliferación de las CTI.

Los resultados obtenidos, graficados en la figura 10, muestran que existe un aumento en la proliferación de las CTI provocado por el uso de HBOT. Cabe destacar que este efecto es significativo sólo en el grupo tratado con HBOT por 20 días (H20D), ya que éste difiere tanto de su control respectivo (C20D) como de los otros dos grupos (C10D y H10D) ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el grupo de H10D mostró tendencia hacia un aumento en la proliferación. Se compararon los cuatro grupos entre ellos mediante el análisis de permutaciones, siendo el grupo H20D el único que muestra diferencias significativas ( $p \ll 0,05$ ), incluso al realizar la

corrección de Bonferroni (ajustando el p-valor a un  $\alpha$ : 0,0125) éste sigue mostrando diferencias estadísticas.

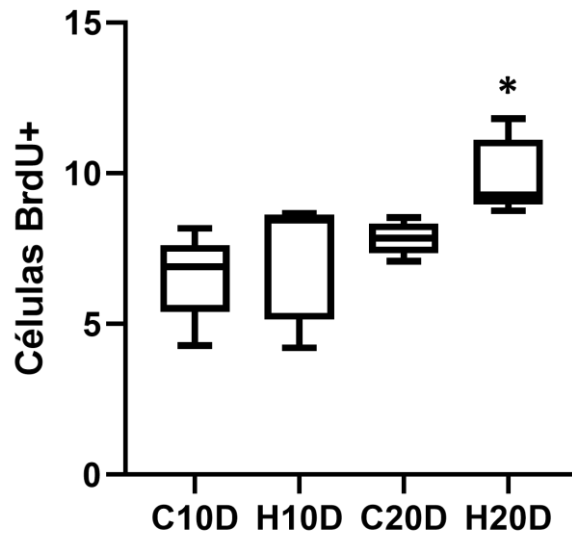


Figura 10: Comparación de los promedios de las células proliferativas por cripta ante los distintos tratamientos. Se indican los valores de la media y el promedio. Promedio de células proliferando por cripta del grupo H20D difiere C10D ( $p=0,0042$ ), H10D ( $p=0,0046$ ) y de C20D ( $p=0,0046$ ). Los demás grupos no presentan diferencias entre ellos. Corrección de Bonferroni ajusta el p: 0,05 a un  $\alpha$ : 0,0125. Análisis mediante permutaciones con programa R.  $n=3$ , 36 criptas analizadas por individuo.

Además, al analizar la distribución de los datos para cada grupo, se observó que el tratamiento provoca un cambio en la distribución de las células que se encuentran proliferando por cripta.

Esto queda en evidencia en la figura 11, donde se representan las distribuciones poblacionales de cada grupo por separado. En la figura 12 se muestran las cuatro distribuciones los grupos para observar y comparar los cambios provocados por el uso de HBOT.

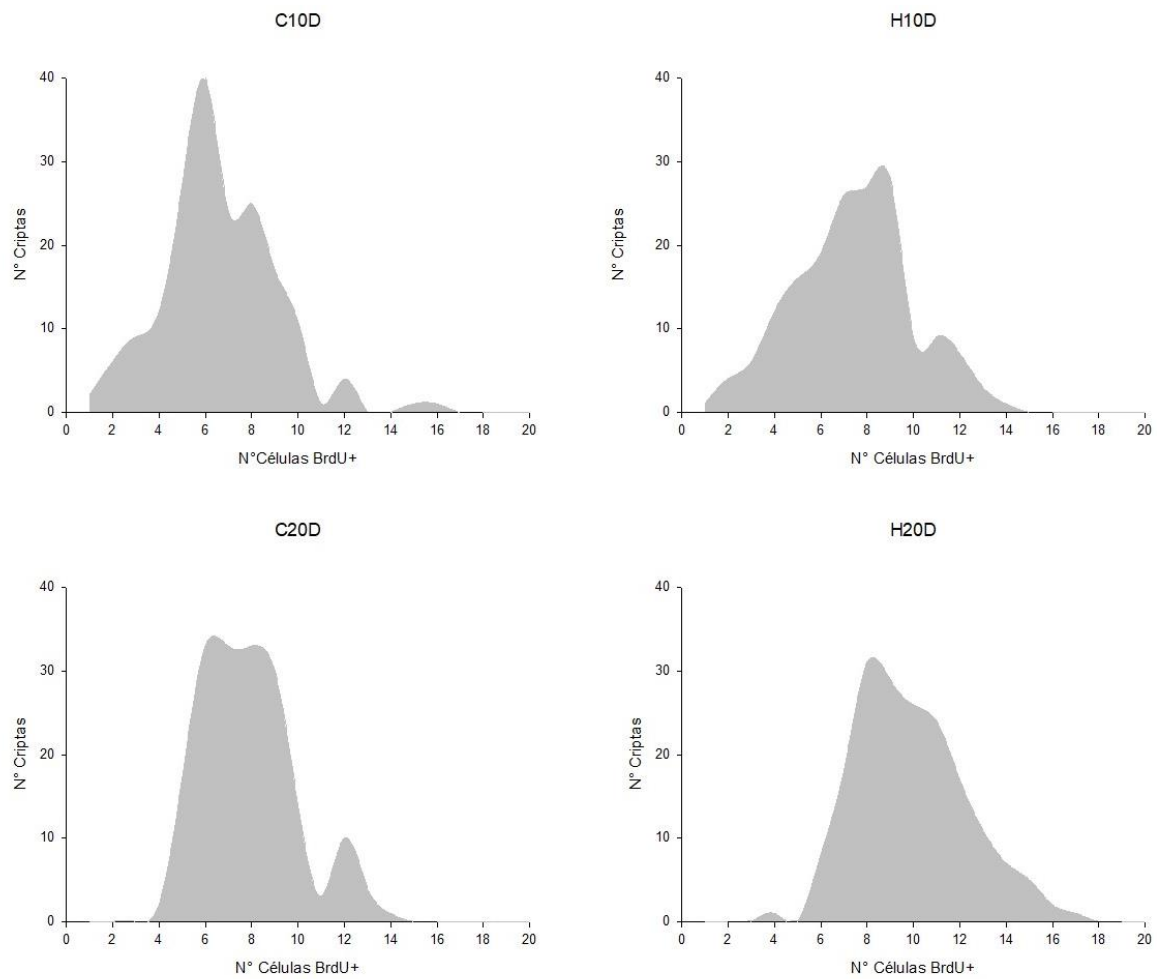


Figura 11: Distribución del número de células BrdU+ por cripta en el intestino delgado para cada tratamiento generado. En la parte superior se muestra la distribución para el grupo control 10 días (Izquierda) junto con la distribución para el grupo HBOT por 10 días (Derecha) mientras que en la parte inferior se muestra la distribución para el grupo control 20 días (Izquierda) junto a la distribución del grupo HBOT por 20 días (Derecha). n= 36 criptas por grupo.

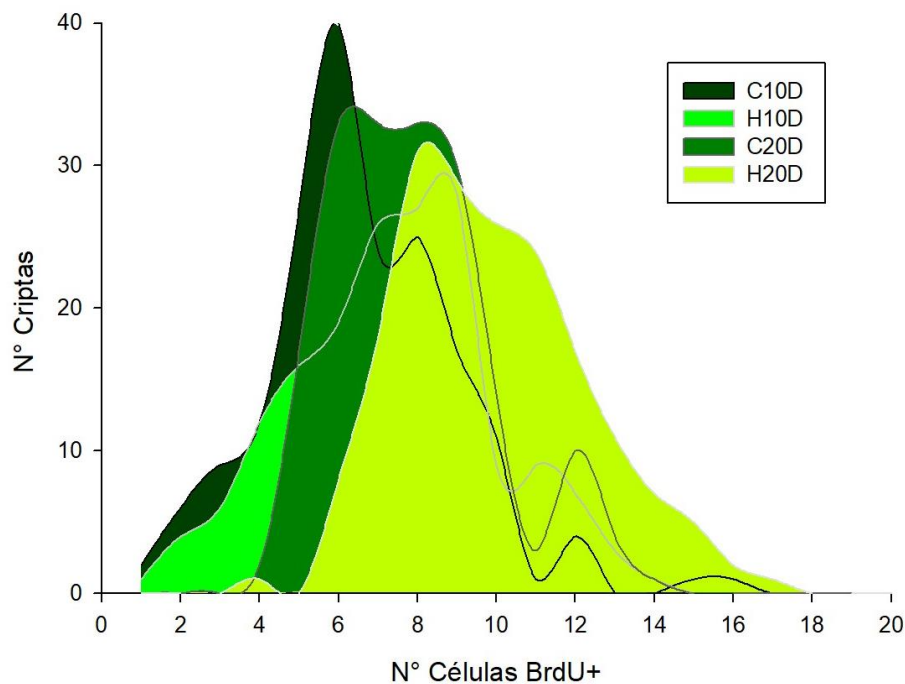


Figura 12: Comparación agrupada de las distribuciones de proliferación para cada uno de los grupos experimentales, comparando el número de células BrdU+ por cripta en el intestino delgado, demostrando el cambio en los promedios poblacionales, al igual que en las distribuciones de las curvas para cada grupo. n= 36 criptas por grupo.

La distribución de los grupos C10D y C20D no arroja diferencias entre ellos ( $p > 0,05$ ), sin embargo, las distribuciones del grupo H20D con su control y con H10D si difieren entre ellos ( $p < 0,0001$ , para ambos casos). Por otra parte, la distribución entre el grupo H10D con su control, C10D, igualmente presenta diferencias ( $p = 0,004$ ), aun cuando al comparar sus promedios no se encontraron diferencias.

Por último, se realizó un análisis del coeficiente de estabilización (Figura 13), el cual indica que tanto varían los datos entre sí, dentro del mismo grupo. Al comparar estos coeficientes entre los distintos grupos se obtuvo que el uso de HBOT por veinte días provoca que los

valores del coeficiente de estabilización sean más altos y diferentes a los controles de 10 y 20 días ( $p= 0,0237$  y  $p=0,022$ , respectivamente), al igual que con HBOT por 10 días ( $p= 0,008$ ).

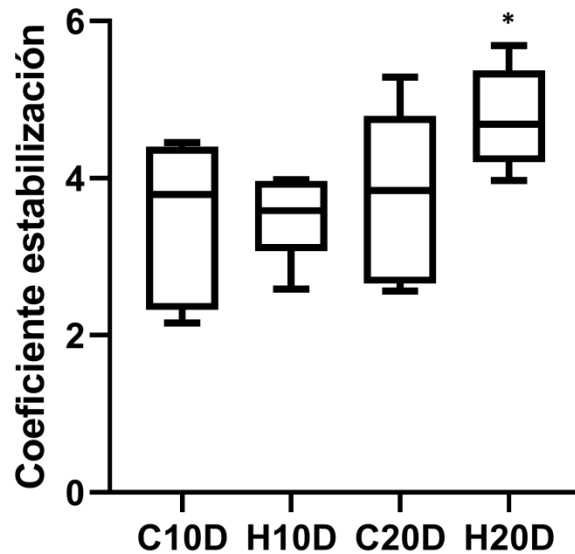


Figura 13: Comparación de los coeficientes de estabilización de los cuatro grupos experimentales. Mayores valores del coeficiente implican menor variación entre los datos. El grupo H20D es significativamente distinto con el grupo C10D ( $p=0,0237$ ), con el grupo C20D ( $p=0,022$ ), y con el grupo H10D ( $p=0,008$ ). Los demás grupos no presentan diferencias entre ellos ( $p>0,05$ )  $n= 36$  criptas por grupo

Con estos resultados, se puede concluir, que el uso de HBOT por veinte días tiene un efecto positivo sobre la proliferación de las células en la cripta, además de homogenizar esta proliferación a lo largo de las criptas del intestino delgado. Por otra parte, se observó que HBOT ya muestra efectos sobre la dinámica de proliferación desde el día 10 pero las diferencias no se hacen significativos en cuanto a proliferación *per se* sino hasta el día 20, indicando que se trata de un proceso paulatino.



#### 4.4 Efectos HBOT sobre la actividad enzimática de COX y CS

Para analizar si HBOT era capaz de provocar cambios en la actividad enzimática de enzimas claves en el metabolismo oxidativo, como lo son COX y CS, se analizó la actividad de estas enzimas en muestras de intestino delgado proveniente de animales de los cuatro grupos nombrados anteriormente. Brevemente, las muestras obtenidas fueron homogenizadas en frío y se siguió los protocolos establecidos por Srere et al; 1969, Drahota et al; 2004 & Wakshlag et al; 2004 para medir por espectrofotometría a diferentes longitudes de onda la actividad de cada enzima (CS 232 nm y COX 550 nm). Con esto se obtuvo como resultado principal que, al menos al evaluar al día 20 de tratamiento con oxígeno hiperbárico, no se detectan cambios en la actividad de ninguna de las dos enzimas. Como se aprecia en la tabla II, dicho resultado se mantiene, ya sea normalizando por enzima total (indicando que no cambio la expresión de esta), por proteína total en la muestra o por gramo de tejido utilizado.

COX			
	$\mu\text{mol}/\text{min}$	$\mu\text{mol}/\text{min g}$	$\mu\text{mol}/\text{min mg proteína}$
<b>p-value</b>	0,25083	0,8598	0,86065

CS			
	$\mu\text{mol}/\text{min}$	$\mu\text{mol}/\text{min g}$	$\mu\text{mol}/\text{min mg proteína}$
<b>p-value</b>	0,52579	0,29447	0,39402

Tabla 2: Medición de actividad enzimática de enzimas claves del metabolismo oxidativo luego de aplicar un tratamiento crónico con HBOT. Comparación mediante ANOVA de los cuatro grupos, control 10 días, control 20 días, HBOT 10 días y HBOT 20 días, mostrando que no hay diferencias entre estos grupos a nivel de actividad total ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), actividad por gramo de tejido ( $\mu\text{mol}/\text{min g}$ ) y actividad por mg de proteína total. n= 6 muestras por grupo.

De esta forma se obtiene que el uso del tratamiento con oxígeno hiperbárico por hasta 20 días consecutivos no se ve reflejado en un cambio en la actividad enzimática de enzimas

relacionadas con la obtención de energía aeróbicamente, como lo son la COX y la CS. Por lo que los cambios observados a nivel de proliferación celular, en principio, no se relacionarían con cambios en la producción de ATP mediados por cambios en la actividad de estas enzimas al momento de realizar el experimento.

#### *4.5 HBOT y su relación con la vía mTORc1*

La vía mTORc1 es una de las vías que regula el crecimiento y proliferación celular, pero a diferencia de otras vías metabólicas, ésta es capaz también de detectar la presencia de oxígeno. Por tanto, se analizó si el aumento en la proliferación celular de las CTI provocada por el uso de HBOT por 20 días se relacionaba con cambios en la vía mTOR. En particular, se quiso evaluar si mTORc1 es efector del HBOT. Para ello, se procedió a inhibir esta vía mediante la administración de Rapamicina. Se hicieron primeramente mediciones mediante Western-Blot para comprobar que el tratamiento con Rapamicina estuviese efectivamente inhibiendo la vía de mTORc1 en nuestro modelo experimental, como ha sido ya ampliamente descrito en la literatura. Se decidió realizar el análisis de una de las proteínas blanco de mTORc1 como lo es S6 quinasa 1 (S6K1), la cual es fosforilada en la treonina 389 (S6K1-P) por este complejo, según se reporta ampliamente en la literatura (Hara et al; 1998, Sarbassov et al, 2004 & 2005). La figura 14 muestra imagen representativa de la comparación entre una muestra del grupo control (DMSO Ctrl, inyectado con DMSO) con otra del grupo tratado con la droga (Rapa Ctrl), una vez realizado el tratamiento crónico con la droga en normoxia.

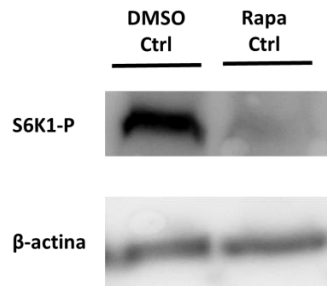


Figura 14: Imagen representativa de Western-Blot para la proteína S6K1 fosforilada (70 kDa) post tratamiento con Rapamicina, comparando niveles de expresión en muestra de grupo control (DMSO Ctrl) versus de muestra tratada con Rapamicina (Rapa Ctrl) de manera crónica en normoxia. En la parte inferior se muestra  $\beta$ -actina como control de carga (30  $\mu$ g). n=3.

Similar a lo reportado previamente (Tee et al; 2002, Nojima et al; 2003, Ballou et al; 2008 and Garelick et al; 2013), un tratamiento sostenido con Rapamicina reveló niveles reducidos de S6K1-P. Luego de comprobar que la vía mTORc1 es inhibida por Rapamicina en condiciones de normoxia se realizó un nuevo experimento, incluyendo cuatro condiciones experimentales. Se analizaron las muestras de los grupos Rapa HBOT y DMSO HBOT en comparación a las mismas muestras en normoxia, para poder evaluar los potenciales efectos generados por HBOT sobre la vía de señalización mTORc1. Cabe destacar que la evaluación se realizó al finalizar el experimento (Figura 15).

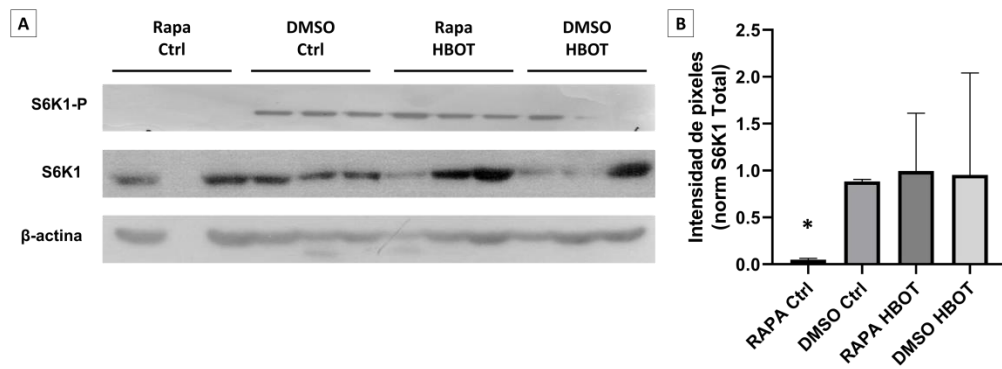


Figura 15: Western-Blot representativo para evaluar cambios en la expresión y/o actividad de S6K1. A) Se evalúa la proteína S6K1- fosforilada (72 kDa) y se normaliza contra S6K1 total (70kDa) en los distintos grupos experimentales indicados. Además, se muestra el control de carga correspondiente a β- actina (42 kDa). Cada carril se cargó con 50 μg. n= 3. B) Cuantificación del Western-Blot en A), reflejando de manera indirecta la actividad de mTORc1 ya que se normalizó S6K1-P contra S6K1 total. El grupo Rapa Ctrl es el único significativamente diferente (\*, p<0,05).

Ya que en el grafico anterior se observa una desviación muy amplia para la barra de DMSO HBOT, se procedió a normalizar contra un control de carga, en este caso β-actina, además se aumentó a un n=5, con muestras de otros Western-blot realizados, con lo que se obtuvo la figura 16.

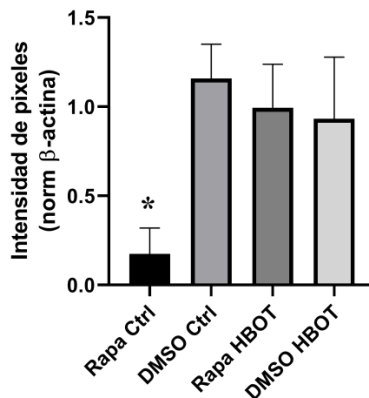


Figura 16: Histograma que muestra la cuantificación de la actividad de mTORc1, evaluada como fosforilación de proteína blanco S6K1, en los distintos tratamientos. El grupo Rapa Ctrl es el único que presenta diferencias significativas con los demás tratamientos (\*;  $p < 0,05$ ). Los datos fueron normalizados contra su control de carga, en este caso  $\beta$ -actina ( $n=5$ ).

Los resultados muestran que el uso de Rapamicina por si sola es capaz de inhibir la vía de mTORc1, pero que, al combinarlo con HBOT (Figura 15 y 16), se vuelve a los niveles controles de S6K1-P, ya sea al normalizar por S6K1 total en la muestra o contra el control de carga ( $\beta$ -actina). Esto sugiere que HBOT es capaz de rescatar la inhibición de la vía mTORc1 provocada por el uso de Rapamicina al usarse en combinación con esta, de alguna forma que se desconoce. Por otra parte, no aumentan los niveles de S6K1 fosforilada cuando se está solo en condición de HBOT, al compararla con la condición DMSO control. Por lo que HBOT no tendría un efecto sobre la actividad de mTORc1, al menos no al evaluar a largo plazo (20 días). Sin embargo, no se puede descartar la interacción del diluyente DMSO, (figura 20) ya que altera la dinámica de proliferación de las células en la cripta, pero sin alterar los promedios.

#### 4.6 Efecto combinado de HBOT y Rapamicina sobre la proliferación de las CTI

Desarrollamos un análisis comparativo de la distribución de las presencias de las células BrdU+ en las criptas en las diferentes condiciones (tal como se mencionó que se hizo en análisis para los grupos HBOT y Control por 10 y 20 días). En la figura 17 se resumen los resultados del tratamiento combinado de HBOT con la droga, en cuanto a la proliferación de las CTI. Se muestran imágenes representativas de criptas del duodeno, marcadas con BrdU, para las cuatro condiciones experimentales.

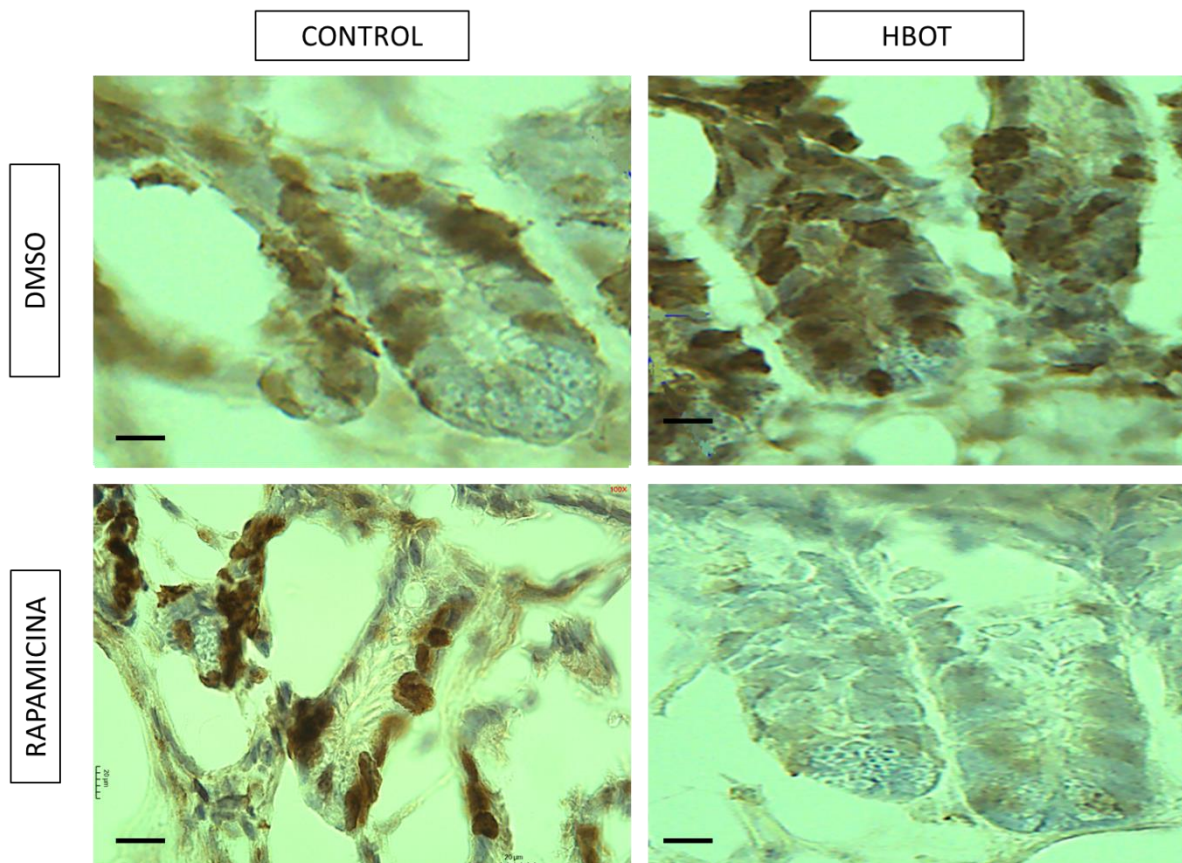


Figura 17: Imágenes representativas de inmunohistoquímica anti-BrdU para cortes de intestino delgado de ratones post tratamiento Rapamicina y/o HBOT, enfocando en las criptas intestinales; reacción de DAB para células BrdU+ (café). Las cuatro condiciones mostradas fueron procesadas en paralelo y reveladas al mismo tiempo. Todos los tratamientos son a 20 días. Barra= 20  $\mu$ m.

A continuación, se cuantificaron las células que se encontraban en proliferación, por cripta, entre los distintos grupos, obteniendo así las figuras 18 y 19, en donde se muestran los valores promedios de células proliferando por grupo, al igual que la distribución de estas poblaciones.

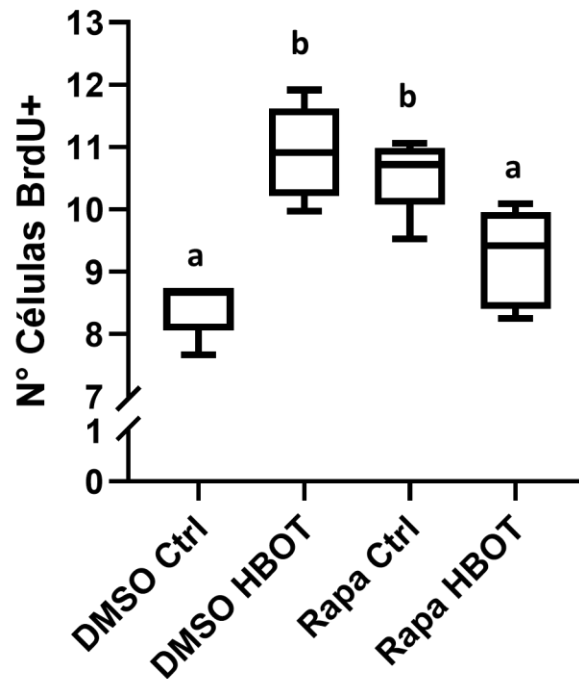


Figura 18: Gráfica ilustrativa de la comparación de los promedios de las células proliferativas por cripta entre los distintos tratamientos. Se muestran los valores de la media y el promedio en los gráficos. Promedio de las células proliferando por criptas del grupo DMSO HBOT difiere de DMSO Ctrl ( $p=0,0033$ ) y de Rapa HBOT ( $p=0,0093$ ), pero no difiere del grupo Rapa Ctrl ( $p=0,7856$ ), mientras que Rapa Ctrl difiere de Rapa HBOT ( $p=0,0131$ ) y de DMSO Ctrl ( $p=0,0037$ ). Análisis mediante permutaciones con programa R. 36 criptas se contaron por individuo de cada grupo,  $n= 3$  individuos por grupo.

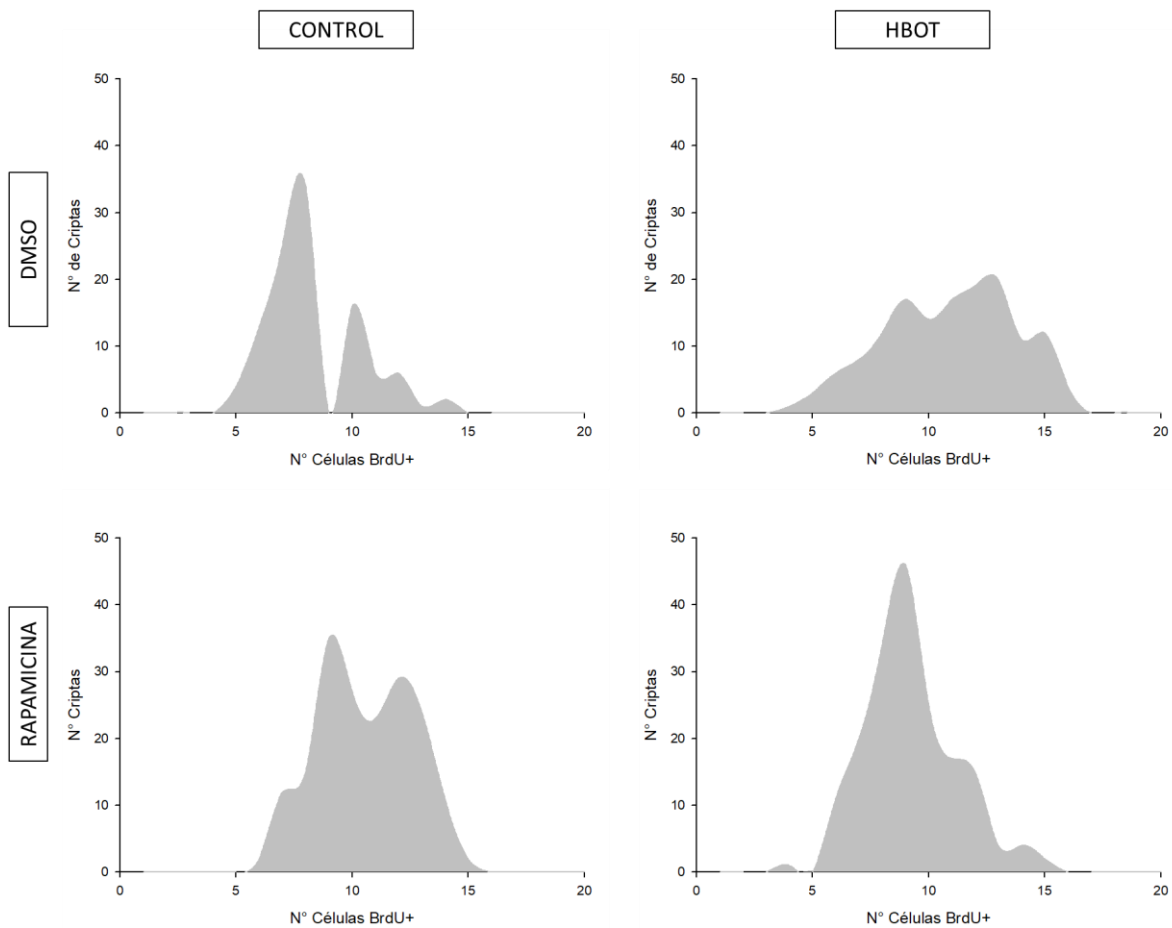


Figura 19: Histograma de frecuencias absolutas de criptas intestinales indicando números de células BrdU+ para cada tratamiento, según se indica.

Como se puede apreciar, la distribución no es similar en las distintas condiciones, aún entre aquellas que no presentan diferencia en los promedios (figura 16) como lo son DMSO HBOT con el grupo Rapa Ctrl o al comparar el grupo DMSO Ctrl con Rapa HBOT. La principal observación en los histogramas de la figura 19, es la presencia de tres máximos conservados en todos los grupos, que sin embargo se distribuyen de manera muy diferente.



#### 4.7 Efecto DMSO

Al comparar la distribución del grupo DMSO Ctrl con la distribución del grupo C20D (Figura 20) se observa que estas son diferentes entre ellas ( $p=0,023$ ), aunque al realizar un análisis de permutaciones del número de células proliferando por criptas éste no muestra diferencias ( $p>0,05$ ). Interesantemente, entre estos grupos la única diferencia fue la inyección del vehículo, por lo que este resultado permite inferir que el vehículo de la Rapamicina (DMSO) provoca en sí un efecto sobre la distribución de las células en proliferación, pero sin afectar los valores de los promedios poblacionales. Este mismo efecto se observa entre los grupos DMSO HBOT y H20D, en donde ambos grupos fueron sometidos al tratamiento con oxígeno hiperbárico con la salvedad de que el primer grupo fue inyectado con el vehículo de Rapamicina (figura 20). A nuestro entender este es la primera vez que se reporta un efecto *per se* de DMSO sobre la distribución de la proliferación de CTI.

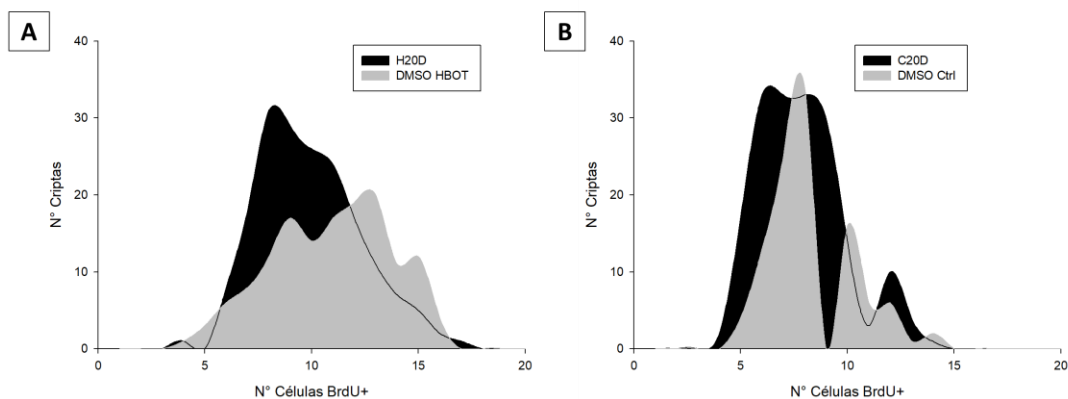


Figura 20: Histograma de frecuencias absolutas de criptas intestinales con diferentes números de células BrdU+ ilustrando los efectos de DMSO. A) Comparación de las distribuciones entre los grupos H20D con DMSO HBOT, sus promedios no difieren entre ellos ( $p>0,05$ ) pero sus distribuciones si lo hacen ( $p= 0,003$ ) B) Comparación de las distribuciones entre los grupos C20D con DMSO Ctrl. Difieren en sus distribuciones ( $p= 0,023$ ) mientras que no son significativamente diferentes los promedios de cada una ( $p>0,05$ ).

Para poder comparar de mejor manera el cambio en la distribución de los datos de proliferación provocados por Rapamicina, sola o en conjunto con HBOT, se generó la figura 21, donde se muestran las distribuciones agrupadas para los cuatro grupos.

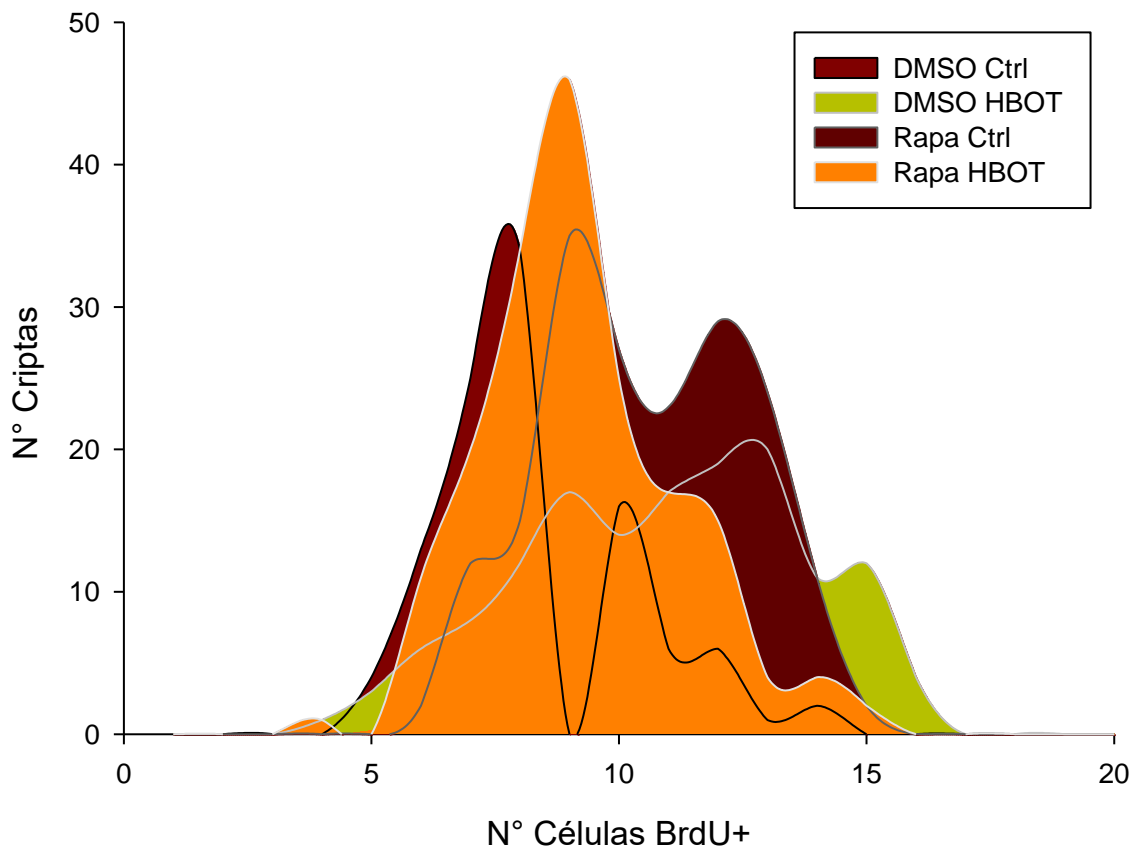


Figura 21: Histograma resumen de las distribuciones para cada uno de los grupos experimentales indicados en la figura 20, comparando el número de células BrdU+ por cripta en el intestino delgado. Se ilustra el cambio en los promedios al igual que en las distribuciones de las curvas para cada grupo.

Debido a que las variables a analizar son dos (HBOT y Rapamicina), se procedió a desglosar y comparar las distribuciones de a pares, obteniendo así la figura 22.

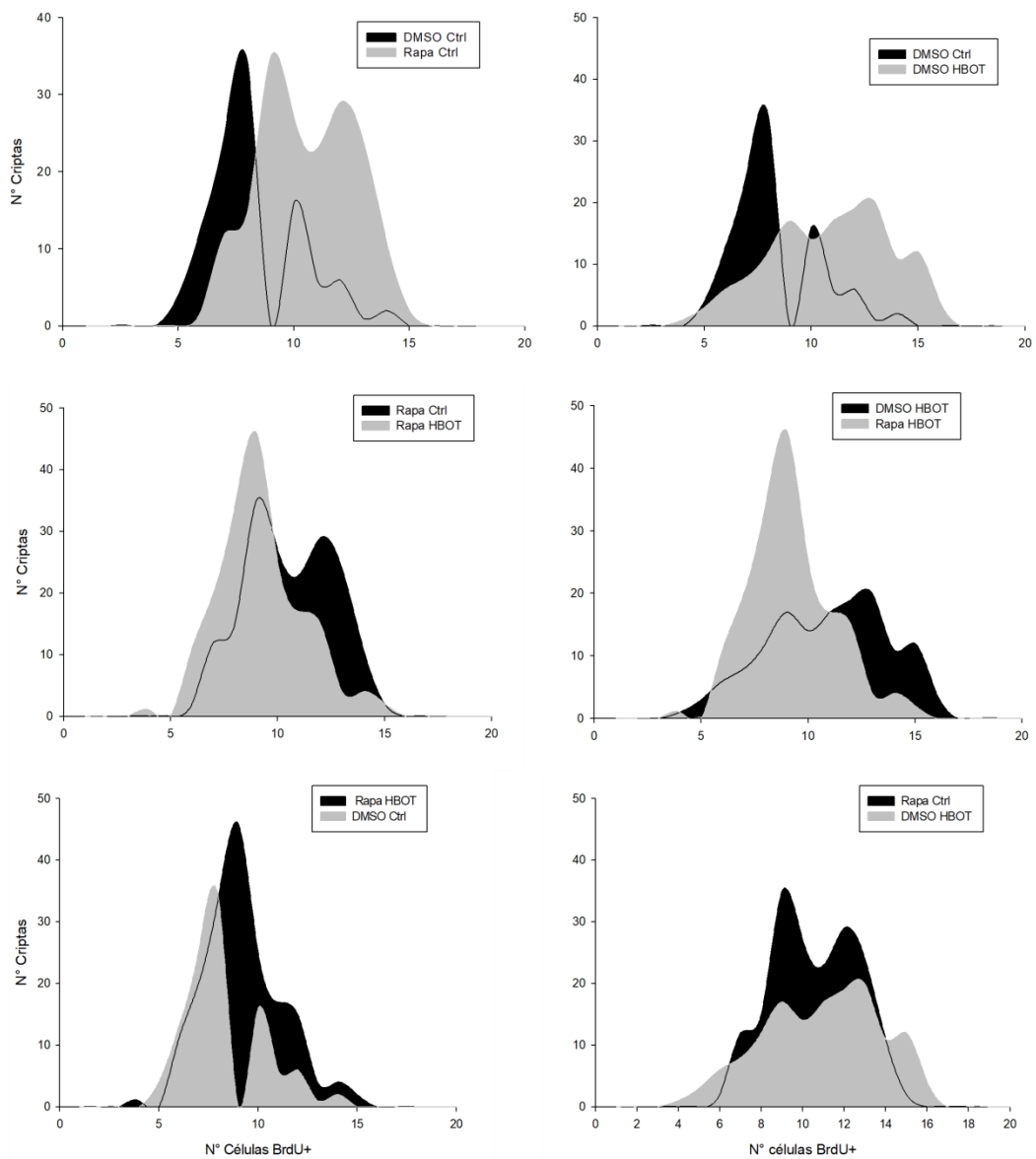


Figura 22: Comparación de a pares de las distribuciones para los distintos grupos experimentales indicados en la figura 20. En la parte superior se comparan las distribuciones de los grupos DMSO Ctrl con Rapa Ctrl ( $p < 0,05$ ) (Izquierda), a la derecha se comparan las distribuciones de los grupos DMSO Ctrl con DMSO HBOT ( $p < 0,05$ ). En la parte central se comparan las distribuciones de los grupos Rapa Ctrl con Rapa HBOT ( $p < 0,05$ ) (Izquierda) mientras que a la derecha se comparan las distribuciones de los grupos DMSO HBOT con Rapa HBOT ( $p < 0,05$ ). En la parte inferior se muestran las comparaciones entre las distribuciones del grupo Rapa HBOT con DMSO Ctrl además de la comparación con el grupo Rapa Ctrl con el grupo DMSO HBOT, ambas comparaciones no presentan diferencias tanto en las distribuciones ( $p > 0,05$ ) como en los promedios ( $p > 0,05$ ). Análisis de distribución de datos realizados mediante prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Al analizar en detalle los gráficos anteriores se constata que aún cuando el valor de los promedios de células proliferando por cripta no varié entre uno y otro grupo, sus distribuciones si lo hacen, como lo es la comparación de DMSO Ctrl con Rapa Ctrl por ejemplo.

Del análisis se desprende que hay una interacción entre los tratamientos, todos los grupos con HBOT tienden a desplazar sus curvas hacia la derecha, indicando un aumento en la proliferación por cripta con la salvedad de Rapa HBOT. Lo mismo hace el grupo tratado solo con Rapamicina.

#### *4.8 Efectos HBOT y Rapamicina sobre la longitud de las criptas*

Basado en una primera observación visual al microscopio, se decidió indagar respecto a posibles cambios en el largo de las criptas ante los diferentes tratamientos. Por tanto, se midió tanto largo como ancho de estas. No se obtuvo diferencias significativas para la variable ancho. Sin embargo, confirmando la observación visual, se constata diferencias en cuanto al largo. Los efectos sobre la longitud de las criptas intestinales se resumen en la figura 23.

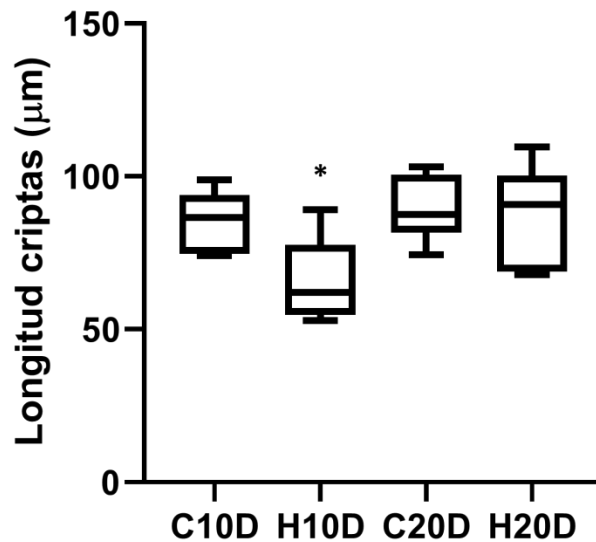


Figura 23: Comparación del largo de las criptas entre los grupos tratados con HBOT. Grupo H10D es diferente a los grupos C10D ( $p=0,0127$ ), C20D ( $p=0,0054$ ) y al grupo H20D ( $p=0,0149$ ), mientras que los demás grupos no difieren entre si ( $p>0,05$ ).  $n=5$

En los grupos experimentales HBOT se observó un efecto sobre el largo de la cripta intestinal solo en el grupo H10D, provocando una disminución en su tamaño del 25,4 %. Este efecto no se aprecia en el grupo H20D.

Al comparar los grupos experimentales Rapamicina (o su vehículo) por si sola o en conjunto con HBOT se observó un aumento en el largo de las criptas intestinales en los grupos Rapa Ctrl y Rapa HBOT del 11,4% y del 22,5% correspondientemente. La figura 24 muestra la variación en la longitud de las criptas del intestino delgado para estos grupos.

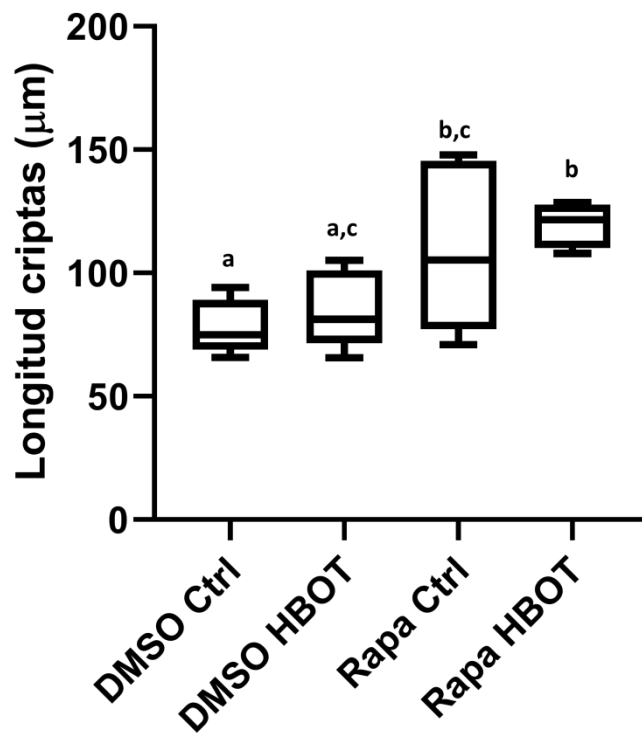


Figura 24: Comparación de las longitudes de las criptas intestinales con Rapamicina y HBOT. Grupo Rapa HBOT es significativamente distinto al grupo DMSO Ctrl ( $p=0,0007$ ) y al grupo DMSO HBOT ( $p=0,0009$ ), pero no difiere con el grupo Rapa Ctrl ( $p>0,05$ ). El grupo Rapa Ctrl difiere sin embargo con el grupo DMSO Ctrl ( $p=0,0278$ ) pero no con los demás grupos ( $p>0,05$ ).

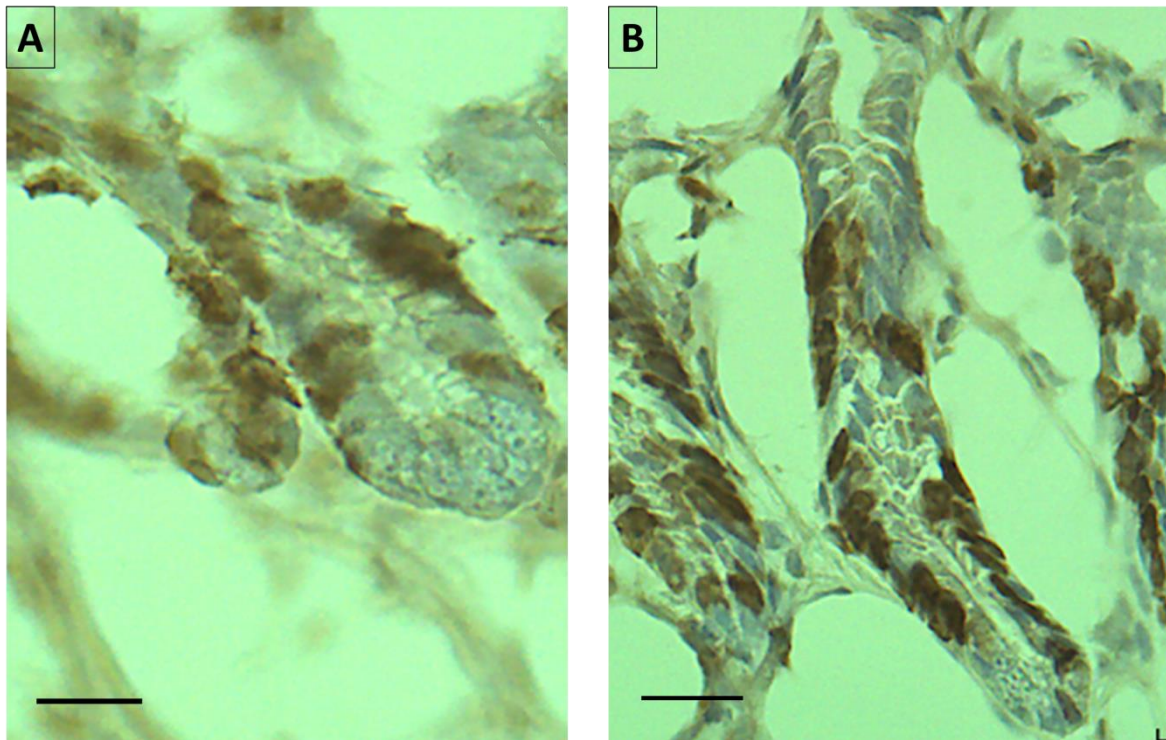


Figura 25: Imagen representativa de la diferencia en la longitud de las criptas entre grupos DMSO Ctrl y Rapa Ctrl. A) Inmunohistoquímica anti BrdU en criptas intestinales de ratón del grupo DMSO. B) Inmunohistoquímica anti BrdU en criptas intestinales de ratón del grupo Rapa. Se muestran las células BrdU+ (café) y el núcleo de las demás células (Hematoxilina). Barra= 20  $\mu$ m.

Esto sugiere que los grupos tratados con Rapamicina tienen un aumento en la longitud de las criptas en comparación a la de los individuos inyectados con el vehículo, además al combinar la administración de Rapamicina con HBOT se duplica esta extensión.

#### *4.9 Efectos de Rapamicina sobre la proliferación celular*

Para evaluar si este aumento en la longitud de las criptas era provocado por un aumento en la proliferación celular o se debe a un aumento en el tamaño de las células en las criptas, se procedió a analizar la densidad celular en esta zona.

En la figura 25 se muestra que los tratamientos con Rapamicina (Rapa Ctrl y Rapa HBOT) provocan un aumento en la longitud de las criptas intestinales del duodeno. Al analizar la densidad celular, contabilizando en los 30 primeros micrómetros desde la base de la cripta, y graficar los resultados se observa que no hay diferencias en la cantidad de células en la base de la cripta, entre los diferentes tratamientos (figura 26).

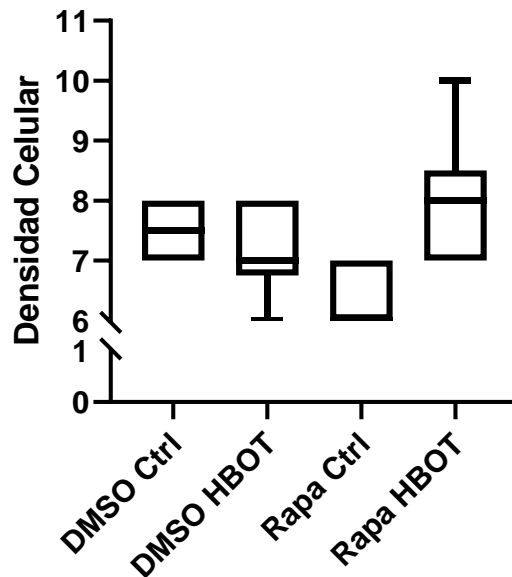


Figura 26: Comparación del número de células por área en la cripta intestinal. Se tienen los datos de 3 ratones por grupo contando el número de células presentes en los primeros 30 micrómetros desde la base de la cripta hacia el vello. No hay diferencias significativas entre los distintos grupos. ( $p > 0,05$ )



Tomando en consideración este último resultado se sugiere que el aumento en el tamaño de las criptas es generado por un aumento en el número de células, lo cual se debería a la proliferación y no por un aumento en el tamaño celular en las criptas.

#### *4.10 Efectos en otros órganos*

El uso de HBOT por 10 o 20 días no generaron efectos sobre la longitud ni masa húmeda del intestino (delgado y grueso), tampoco en la masa de los siguientes órganos: corazón, riñones, hígado, bazo ni aparato reproductor. Tampoco se observaron cambios en los tratamientos con Rapamicina por si sola ni en combinación con HBOT.

## 5 Discusión

Los tejidos del cuerpo necesitan un suministro adecuado de oxígeno para funcionar. Cuando un tejido se lesiona, necesita incluso más oxígeno para sobrevivir. Se ha planteado que un aumento del oxígeno sanguíneo, mediado por HBOT, podría restaurar temporalmente los niveles normales de gases en la sangre y la función tisular para promover la cicatrización y combatir las infecciones.

Por otra parte, muchas veces producto de una injuria, que puede tener diverso origen, las células troncales somáticas no son capaces de restaurar la homeostasis, ya sea porque ellas están afectadas o al encontrarse alterado el nicho en el que se encuentran. Por tanto, hoy en día la terapia celular persigue optimizar protocolos que aumenten la capacidad regenerativa que tendrían las células troncales. Una de las propuestas recientes ha sido usar HBOT, ya sea en combinación con terapia celular o para favorecer el accionar de células troncales propias del paciente (Peña-Villalobos et al; 2018 & Harch et al; 2015). Sin embargo, aún es escasa la literatura en cuanto a los potenciales mecanismos que podrían mediar un efecto terapéutico de las células troncales, sobre todo en lo que respecta a aumentar el potencial regenerativo de las células troncales endógenas.

En el presente trabajo se analizó el efecto del uso del tratamiento prolongado con oxígeno hiperbárico (hasta por 20 días) sobre la proliferación de las células troncales murinas del intestino delgado y la relación que tiene con la vía mTORc1. Reportándose un efecto previamente no descrito de HBOT sobre las CTI que afecta particularmente el potencial

proliferativo de estas células. Adicionalmente, se encontró que HBOT es capaz de contrarrestar la inhibición de la vía mTORc1 generada por la administración de Rapamicina.

### *5.1 El aumento de la proliferación de las CTI ocurre de forma sincronizada entre las criptas*

El uso de HBOT por 20 días promueve un aumento en la proliferación de las CTI, que se manifiesta en un cambio de un promedio de 6 células proliferando por cripta en animales controles a un promedio de 9 células por cripta en animales sometidos a HBOT (figura 10). Este tratamiento provoca además un cambio en la distribución de los datos de las células BrdU+ por cripta, como se muestra en las figuras 11 y 12, en donde se encontró que los grupos tratados con HBOT son diferentes de sus grupos control en la distribución de los datos de proliferación por cripta. De los resultados se desprende que el aumento en la cantidad de células proliferando que se observa al día 20 del tratamiento con HBOT, es a causa de un cambio paulatino en la dinámica de proliferación que se observa desde el día 10 de tratamiento. Por otra parte, la presencia de los picos en los histogramas puede interpretarse en términos de la dinámica de los tejidos, considerando que el crecimiento normal y el mantenimiento del tejido intestinal ocurre a través de la fisión de las criptas por bifurcación y trifurcación de las criptas parentales (ver Langlands et al., 2016). Así, el primer máximo cercano a cinco células por cripta representaría el proceso proliferativo normal u homeostático (figura 12), luego, los máximos alrededor de 8 y 12 podrían representar criptas en fisión por bifurcación y trifurcación, respectivamente.

Con lo anterior se observa que aún cuando algunos grupos no presentan diferencia al comparar los promedios de células proliferando por cripta, si pueden presentar diferencias en otras variables, como lo son las distribuciones poblacionales. Finalmente, al analizar el coeficiente de estabilización de los grupos (figura 13), se encontró que el grupo H20D (HBOT por 20 días) presenta valores mayores a los demás grupos, lo que se traduce como una menor variación de los datos dentro de este grupo. Es decir, el tratamiento con HBOT por 20 días provoca un aumento de manera más homogénea o sincronizada de la proliferación entre las criptas, mientras que en los otros grupos esta proliferación sucede de forma aleatoria. Esto se podría deber a que a los 20 días de tratamiento con HBOT se alcance un máximo de proliferación, por lo que entre los días 10 y 20 se estaría reclutando por cripta más CTI hacia la proliferación.

Resumiendo, el uso de HBOT por 20 días provoca un aumento en la proliferación de las células en distintas criptas, realizándose a ritmos similares entre una cripta y otras, mientras que en situaciones sin HBOT o con un tratamiento por menor tiempo, esta proliferación basal se realiza de forma aleatoria, como sugiere el esquema de la figura 27.



Figura 27: Modelo esquemático propuesto para ilustrar el efecto sobre la proliferación de las CTI por cripta provocado por el uso de HBOT. Las líneas negras simbolizan al epitelio intestinal (vellos y criptas intestinales), los puntos rojos simbolizan a las CTI proliferando por cripta. Se muestra como en la condición sin HBOT hay una mayor variación por cripta con respecto al número de células proliferando, mientras que en la condición con HBOT las células proliferando por cripta son más homogéneas entre una y otra.

### *5.1.1 Otros casos de sincronización de proliferación de CTI*

Este efecto observado por el uso de HBOT de sincronizar la proliferación de las CTI es similar a lo observado por una restricción calórica (RC) a corto plazo (20 días) en ratones (Peña-Villalobos et al; 2018), donde se aprecia una respuesta denominada paradójica. Esto ya que, según se plantea por el modelo de barril de Weiner (Weiner et al; 1992), la adquisición de energía a través de la alimentación se utiliza en tres componentes principales (en modelos endotermos homeotermos): la generación de calor, la producción de tejidos y la realización de trabajo (conducta). Entonces, un individuo que adquiere menor cantidad de alimento tendría en principio menor disponibilidad de energía que distribuir a cada uno de estos componentes. Se denomina paradójica la respuesta observada en los ratones sometidos a RC debido a que durante estos 20 días alargan sus intestinos delgados (invirtiendo energía en esto), observando un efecto de sincronizar la proliferación de las CTI por cripta intestinal a lo largo del intestino delgado. Este efecto no se observa en periodos de RC mayores a los 20 días. Durante el año 2012 el grupo de Yilmaz et al. puso en evidencia que ante una RC (prolongada, hasta 28 semanas) ocurre una modulación de la vía mTORc1 en las CTI, mediadas por las células de Paneth hacia las células Lgr5+, demostrando también la relevancia del nicho en el que las CTI se encuentran. Por otra parte, otro estudio en donde se eliminaron genéticamente las células de Paneth (Durand et al; 2012) muestra que la conformación del epitelio no difiere de uno en donde no se ha eliminado estas células. Pero, además, al ser sometidas a radiación, ambos epitelios vuelven a regenerarse por acción de las CTI, demostrando que para un correcto funcionamiento de las CTI de la base (Lgr5+) no es

necesaria la presencia de las células de Paneth. Estos dos trabajos generan controversias respecto a la relación que tiene el nicho de las CTI con estas mismas y las capacidades intrínsecas que poseen las células CTI Lgr5+ para poder regenerar el epitelio ante una situación de daño.

Para efectos de esta tesis, se escapa la observación de cómo esta sincronización de las CTI es afectada por el rol que juega el nicho, en particular las células de Paneth, en el ambiente hiperbárico. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que sea por acción de las células de Paneth que mediante comunicación paracrina regulen los procesos proliferativos de las CTI de la base de la cripta.

### *5.2 HBOT no modifica la actividad enzimática de COX y CS*

El oxígeno, debido a sus características fisicoquímicas, es utilizado por los organismos como un aceptor de electrones. En esta propiedad es precisamente que radica en la mitocondria el proceso de formación de ATP, en donde los electrones que generan el gradiente electroquímico son transportados por medio del oxígeno y así se utiliza esta energía para la formación de ATP. Ante esto, en 1966, el grupo de Sanders investigó sobre los efectos que generaba el uso de HBOT en presiones por sobre las 2 ATA hasta las 5 ATA, teniendo como resultado un aumento en la cantidad de ATP generado. Pero este aumento era dependiente del órgano analizado, se describía como tal en el hígado, mientras que en el cerebro esto no sucedía, es más, la producción de ATP en este último disminuía.

Tomando en consideración los datos de la literatura, en esta tesis se buscó determinar si el uso de HBOT a 2 ATA por un periodo de 20 días consecutivos producía un aumento en la actividad de las enzimas Citocromo C Oxidasa (complejo IV) y de la enzima Citrato Sintasa en el intestino delgado, que se encargan de reducir el oxígeno en el proceso de formación de ATP y de mediar la primera reacción en el ciclo de Krebs, respectivamente.

En la tabla 2 se muestran los resultados de la actividad de las enzimas Citrato Sintasa y Citocromo C Oxidasa, total, por gramo de tejido y por proteína total en la muestra. Solo una de estas comparaciones de a pares resultó ser estadísticamente significativa (mediante permutaciones), siendo la comparación Citrato Sintasa total entre el control por diez días y diez sesiones de HBOT. Sin embargo, al realizar la comparación grupal mediante ANOVA se obtuvo que no existen diferencias entre los distintos grupos.

Estos resultados se relacionan con lo obtenido por el grupo de Peña-Villalobos en 2018, en experimentos con HBOT en ratones machos Balb/c de la misma edad que los usados en esta tesis, donde se muestra que el tratamiento con HBOT por 20 días no tiene un efecto sobre la tasa metabólica basal de los individuos sometidos a experimentación, incluso al ser normalizados por la masa de cada uno (figura 28). Estos datos sugieren que en el individuo no hay un efecto que se prolongue en el tiempo debido al aumento de la presión y de la tensión de oxígeno, al evaluar a nivel de la fisiología del animal completo.

Entonces, como no se genera un efecto que se mantenga en el tiempo, al menos al evaluar a los 20 días, pero si hay un efecto a nivel de proliferación en el mismo tejido, se pueden sugerir

dos explicaciones. La primera es que este aumento en la proliferación (con el gasto energético que esto conlleva) se debe a la redistribución de energía disponible por el animal (según el modelo de Weiner, 1992), lo que puede llevar a compensaciones desde otros tejidos o efectos sobre la conducta (lo cual no fue analizado). O, alternativamente que, efectivamente exista un aumento en la actividad de estas enzimas, pero evidenciable sólo de manera aguda. Es decir, durante la sesión de HBOT a causa de que aumenta la concentración de oxígeno disponible, se podría provocar que la producción de ATP se vea maximizada, pero luego de terminar la sesión, estos niveles vuelvan rápidamente a los basales.

Para poder demostrar esto, sería necesario realizar estudios de consumo de  $O_2$  dentro de la cámara durante la sesión por animal, análisis que escapa del alcance de esta tesis.



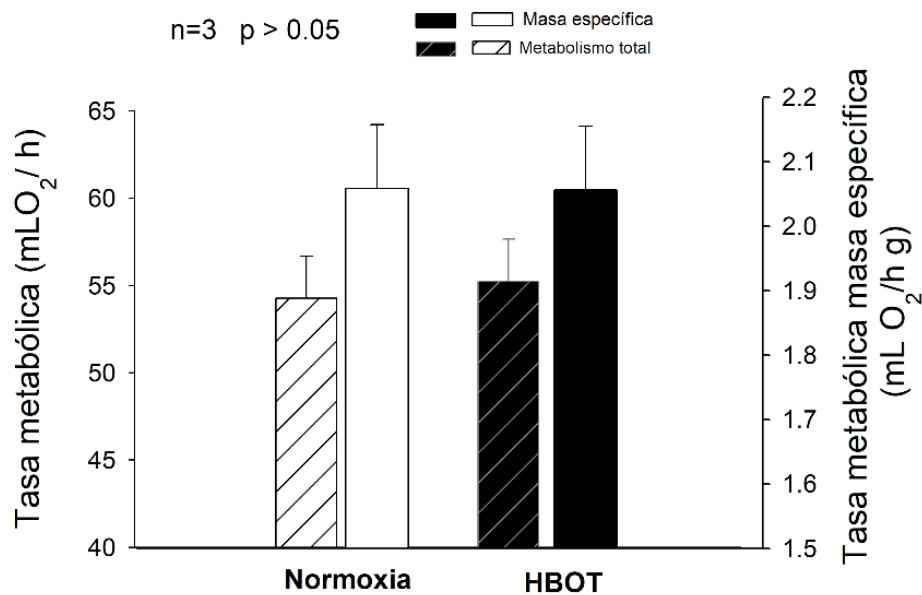


Figura 28: Comparación de las tasas metabólicas basales y normalizadas por peso del animal. Edad de 8-11 semanas. No hay diferencias significativas entre los grupos control con los HBOT (20 sesiones HBOT) (Imagen tomada de Peña-Villalobos et al; 2018).

### 5.3 HBOT recupera la inhibición de Rapamicina sobre S6K1-P

Se sabe que los mecanismos de regulación del ciclo celular determinan la tasa de proliferación celular, en donde participan distintas vías tales como la vía Hippo (Yu et al; 2013), en donde la tensión del citoesqueleto es una pieza clave para regular esta vía, siendo muy conservada entre distintos taxa, incluyendo mamíferos. También está la vía TGF- $\beta$ , la cual ha sido muy estudiada en relación con el cáncer (Markowitz et al; 1995, Gold et al; 1999 & Elliott et al; 2005), en donde desregulaciones de esta vía provocan un aumento descontrolado de la proliferación celular. También se describe un rol claro para la vía

canónica de mTOR, la cual se encuentra dentro de la vía AKT, la cual comprende una gran cantidad de intermediarios y puede regular muchas otras funciones, desde la proliferación celular, transcripción de genes y supervivencia celular, entre otras (Vivanco et al; 2002).

La vía mTOR, al igual que la de Hippo, es muy conservada y de suma importancia para la proliferación celular. El complejo mTORc1 posee actividad quinasa y fosforila sus proteínas blanco río abajo, teniendo como resultado la regulación de la proliferación celular (Sarbasov et al; 2005). A diferencia de las demás vías mencionadas, esta es la única en la que se ha reportado que censa niveles de oxígeno (Norrmen et al; 2013 & Rabanal-Ruiz et al; 2017) y que puede modular su actividad dependiendo de la concentración de este elemento por medio de vías como AMPK o REDD1, inhibiendo de manera directa para el caso de AMPK o de manera indirecta para REDD1, la cual activa al factor TSC el cual es un inhibidor de mTORc1, ya que no permite su activación por parte de Rheb. Ambos factores son activados en situación de hipoxia (Saxton & Sabatini; 2017).

### *5.3.1 Inhibición de la vía mTORc1*

La administración de Rapamicina provocó una disminución de los niveles de S6K1 fosforilada (figura 14 y 15) en situación sin HBOT, pero, al combinar la administración de Rapamicina con HBOT se recuperan la fosforilación de S6K1 (figura 15 y 16) a niveles comparables con el de los controles (DMSO Ctrl y HBOT Ctrl), sugiriendo que HBOT es capaz de recuperar la actividad de la vía mTORc1. Ahora, el mecanismo mediante el cual HBOT lo hace, aún no es comprendido. Por otra parte, el uso de HBOT por sí solo no aumenta

la cantidad de S6K1 fosforilada medida mediante ensayos de Western-Blots, lo que permite inducir que HBOT por 20 días no aumenta la actividad de mTORc1 a niveles superiores al de los controles, lo cual sugiere que el efecto observado de aumentar la proliferación de las CTI no se debe a un aumento en la expresión de esta enzima, pudiendo tener un aumento en la actividad en un periodo específico de tiempo, posiblemente durante las sesiones de HBOT, pero que no se conserva en el tiempo.

### *5.3.2 Administración de Rapamicina aumenta la proliferación de CTI.*

Como se muestra en la figura 18, tanto Rapamicina como HBOT por separado son capaces de aumentar la proliferación de las CTI. Con respecto a que HBOT aumenta la proliferación es lo que se había encontrado previamente pero que el grupo Rapa Ctrl igual generará un aumento en la proliferación fue un resultado contraintuitivo, ya que Rapamicina inhibe a mTORc1, el cual es un regulador clave para la proliferación. Sin embargo, al utilizar ambos tratamientos combinados, este efecto desaparece.

El efecto observado de aumentar la proliferación por cripta mediante la administración del fármaco podría ser explicado por el hecho de que Rapamicina ha sido ampliamente utilizado para simular a los efectos de una RC (Cox et al; 2009, Blagoskonny et al; 2010, Dai et al; 2014, Silva-Palacios et al; 2016), lo que provoca una regulación a nivel del nicho en el que se encuentran insertas las CTI, por medio de las células de Paneth. Estas células, ante una reducción en los niveles de mTORc1, secretan un factor paracrino hacia las CTI denominado cADPR, el cual lleva a las CTI hacia la proliferación en vez de la diferenciación, por medio

de señalización por iones de calcio (Yilmaz et al; 2012, Yue et al; 2009, Zhang et al; 2010 & Mu et al; 2013). Complementario a esto, en el trabajo previamente mencionado (Peña-Villalobos et al; 2018) se muestra que ante una situación de RC por 20 días en ratones de las mismas características de las aquí utilizadas (rango etario, sexo, alimento), se observa una respuesta paradójica donde ante la estocasticidad en la alimentación se genera una respuesta adaptativa fisiológica de aumentar el largo del intestino por medio de un aumento en la proliferación, pero a expensas de un cambio en la conducta exploratoria y termogénesis. Ante esto, lo que se estaría observando en la situación de Rapa Ctrl (figura 18) es una respuesta ante una simulación de una RC, provocando el aumento contraintuitivo de la proliferación en las criptas a pesar de estar inhibida la vía mTORc1.

Por otra parte, distintos trabajos han reportado que el uso de Rapamicina afecta de manera diferente a los blancos de mTORc1, S6K1 y 4E-BP1. Choo en 2008 demostró que el uso de Rapamicina inhibe durante todo el tratamiento la fosforilación de S6K1 mientras que la inhibición de 4E-BP1 se recupera luego de 6 horas de la inhibición. Esto se debería a diferencias en la afinidad de estas proteínas con el complejo mTORc1, ya que el sitio sensible a Rapamicina de S6K1 es una treonina (389) que está junto a fenilalanina, provocando un cambio conformacional después de la pérdida de la fosforilación (dominio hidrófobo), dificultando su re-fosforilación. De igual manera, 4E-BP1 sufre defosforilaciones por la administración de Rapamicina, pero estos sitios quedan accesibles a una nueva fosforilación, además de poseer mayor afinidad con mTORc1 (Choo & Blenis; 2009).

Esta recuperación en la actividad de 4E-BP1 significa que se inhibe eIF4E, el cual es un factor que permite la síntesis proteica para la proliferación celular, mientras que S6K1 fosforilada activa a 4eIFB, pero al no recuperar su actividad este factor tampoco puede realizar su actividad de comenzar la traducción dependiente de CAP. Sin embargo, se ha propuesto que otros factores, como eIF3, puedan mantener la proliferación en experimentos donde se inhibe S6K1 con un tratamiento crónico con Rapamicina. (Garelick et al; 2013).

Ante esto, el aumento en la proliferación observada por la inhibición de la vía mTORc1 mediante Rapamicina podría deberse a una regulación del nicho en donde se encuentran las CTI además de una compensación de otros factores que regulan la transcripción de ARNm dependiente de CAP.

### *5.3.3 El uso combinado de Rapamicina y HBOT no aumenta la proliferación de CTI*

Tanto el uso de HBOT como de Rapamicina por separado generan un aumento en la proliferación de las CTI (figura 18), pero, al combinar HBOT con Rapamicina se pierde el efecto que poseía cada uno de los tratamientos. Especulamos que esto se debe a efectos antagónicos generados por ambos tratamientos, ya que, como se muestra en la figura 15, el uso de HBOT es capaz de recuperar la actividad de mTORc1, lo que estaría imposibilitando que se genere el efecto de simular la RC que ejerce la droga, mientras que la administración de Rapamicina estaría inhibiendo la formación del complejo y por lo tanto su actividad, lo que provoca que ninguna de los dos tratamientos pueda generar el efecto que provocan por separado.

Finalmente, se muestra en la figura 18 que la proliferación de las CTI del grupo Rapa HBOT no es diferente a la del grupo control (DMSO Ctrl), además sus distribuciones tampoco varían entre ellas (figura 22). Por lo que se puede sugerir que la compensación de HBOT sobre la inhibición de la fosforilación de S6K1 causado por la administración de Rapamicina, provoca que los niveles de proliferación de las CTI sean comparables con los niveles normales de un ratón en situación control. Esto provocaría la pérdida de la respuesta de las CTI ante una modulación de su nicho. Pero algo más relevante es que de la comparación realizada en la figura 22 se obtiene que los grupos Rapa Ctrl y DMSO HBOT no presentan diferencias al comparar los promedios de células proliferando por cripta (figura 18) ni sus distribuciones, por lo que se podría decir que el uso de HBOT por 20 días genera el mismo efecto que una RC (simulada por Rapamicina) en cuanto a la proliferación de las células troncales presentes en la cripta intestinal.

#### *5.3.4 Efectos de Rapamicina sobre la longitud de las criptas intestinales*

La administración de Rapamicina provocó otro efecto que no había sido descrito previamente, cual es el aumento en la longitud de las criptas intestinales del duodeno. Cabe hacer notar que este efecto no se observa con el uso de HBOT a largo plazo.

Como se muestra en la figura 24, el uso de Rapamicina por si sola o en combinación con HBOT provoca que las criptas intestinales aumenten su tamaño considerablemente como se puede apreciar en la figura 25. Este efecto podría ser explicado por la inhibición del complejo mTORc1, ya que el grupo de Rhoads (2006), mediante la administración de arginina a

cultivos de células intestinales demostraron que al aumentar la actividad de mTORc1 se generaba un aumento en la migración de las células en el epitelio, mientras que al inhibir esta vía se genera una disminución en la migración celular. Por otra parte, ha sido descrito que la proliferación celular es la fuerza motriz para la migración celular, yendo desde la base de la cripta hacia el vello (Parker et al; 2016 & Potten et al; 1998). De esta forma, en este caso, en los grupos donde se administró Rapamicina (Rapa Ctrl y Rapa HBOT) se observa que hay un aumento en el tamaño de las criptas, llegando incluso hasta los 150  $\mu\text{m}$  de largo. Esto se podría deber a que, al estar inhibida la vía de mTORc1, la migración celular se ve disminuida, impidiendo que migren desde la base de la cripta hacia la punta del vello, provocando el aumento en el largo de las criptas. Por lo que aún faltaría comprobar, por medio de ensayos de migración, si esto es lo que sucede, quedando como una proyección de esta tesis.

Para el caso de Rapamicina en combinación con HBOT (Rapa HBOT), se observa igualmente un aumento en el tamaño de las criptas, pero en este caso con menor dispersión de los datos que la que se observa en la condición con solo Rapamicina (Rapa Ctrl) (figura 24). Esto se debe a que para el grupo Rapa Ctrl de los 5 animales analizados solo tres presentaron criptas más largas, mientras que los otros dos individuos presentaron criptas de longitud similar a las DMSO Ctrl o DMSO HBOT. Cabe señalar que en estos tres individuos que presentaban criptas más largas eran todas las criptas de mayor longitud y no sucedía que presentara un pool de estas que sean de mayor longitud.

De esta forma, en los grupos administrados con Rapamicina muestran criptas más largas, siendo muy variadas en la condición de solo Rapamicina. Como posible explicación para reconciliar estos resultados se plantea que al inhibir la formación del complejo mTORc1 se ve afectada posiblemente la migración celular, en cambio al combinarla con HBOT, se estaría favoreciendo la formación del complejo. Pero, al estar en constante presencia con Rapamicina se entraría en un juego entre la formación y desacople del complejo mTORc1.

### *5.3.5 Aumento en longitud de las criptas es por hipertrofia*

Este aumento en la longitud de las criptas podía deberse por un aumento en el tamaño de las células, por esto se analizó la densidad células de las criptas. Como se muestra en la figura 26, no hay un incremento en la densidad celular por cripta, lo que sugiere que este aumento observado se debe a un aumento en la proliferación de las CTI, pero como no pueden migrar debido a la inhibición de la formación del complejo mTORc1 por parte de Rapamicina, se provoca que las células queden atrapadas en la cripta, generando este alargamiento. Respecto a esto existen otros dos trabajos en donde se ha reportado un aumento en el tamaño de las criptas pero sin relacionarse con una inducción farmacológica, el primero corresponde al trabajo desarrollado por McGrath en la década de los 60, en donde observó que ratones sometidos a radiación de rayos X (500-10000 r) generaban un aumento en la longitud de las criptas 48-60 horas después de la exposición, proponiendo que se debía a una disminución en la migración hacia el vello desde la cripta, pero que este aumento de tamaño se debía a una hipertrofia de las células en vez de una hiperplasia. El segundo reporte corresponde a la



investigación del grupo de Adler en 2002, en la cual observaron a partir de biopsias de pacientes con pólipos intestinales la presencia de criptas más largas, sin embargo, no correlacionaba esta observación con un diagnóstico benigno o no.

#### *5.4 Modelo de acción de HBOT propuesto*

Con lo presentado anteriormente proponemos un modelo de acción mediante el cual HBOT provocaría los efectos observados. Como se muestra en la figura 29, ante una situación de hipoxia se activan distintas vías que llevan a la inhibición de mTORc1, de manera directa como lo hace la vía de AMPK (Schneider et al; 2008) y de manera indirecta como lo hace la inducción del factor REDD1, el cual activa a TSC, este último impide la unión de Rheb con mTORc1, impidiendo su activación (Brugarolas et al; 2004). Ante una situación de HBOT aumenta la concentración de oxígeno disponible en los tejidos, por lo que las señales ante hipoxia se verían inhibidas por este aumento en la concentración de oxígeno, lo que llevaría a un aumento en la estabilidad de mTORc1 (lo cual aún falta por analizar). Por su parte, se sabe que Rapamicina inhibe la actividad de mTORc1, evaluado por medio de la fosforilación de S6K1, pero como se pudo observar en esta tesis, HBOT es capaz de recuperar la fosforilación sobre S6K1, aunque se desconoce si lo hace por medio de algún factor que no se analizó o si interactúa de alguna forma con Rapamicina, provocando que no afecte al complejo mTORc1.

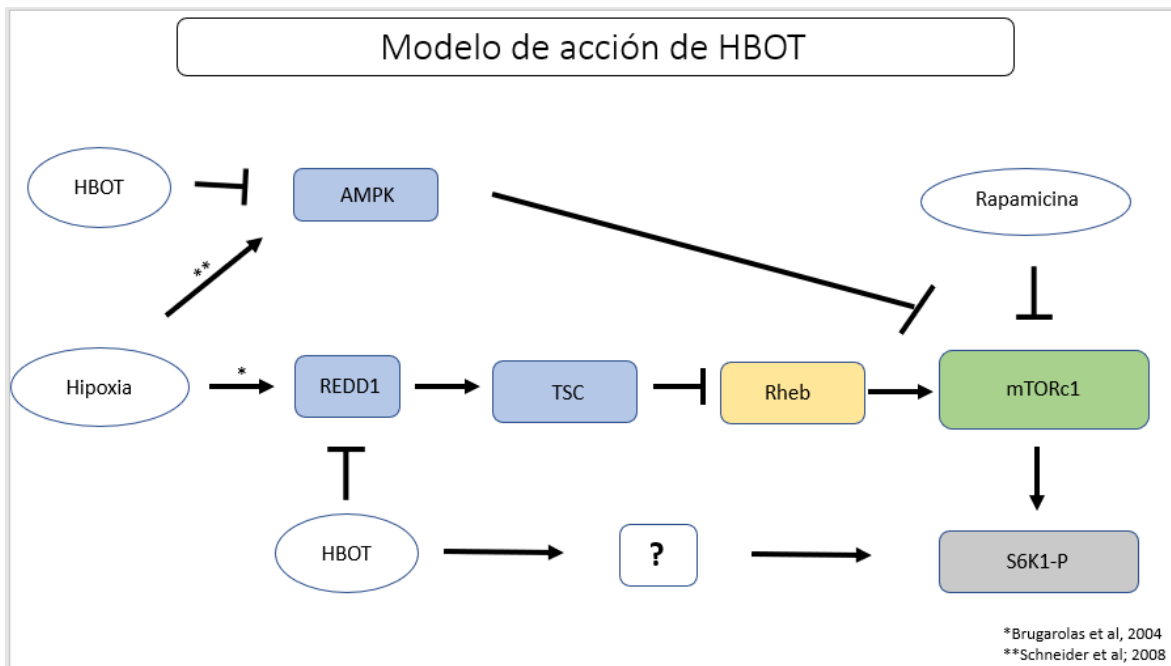


Figura 29: Modelo de acción de HBOT sobre la vía mTORc1. En azul se representan a factores o proteínas que inhiben a mTORc1. En café claro se muestra aquellos factores que activan a mTORc1. Óvalos representan los factores abióticos que regulan la actividad de mTORc1, mientras que en gris se muestra el blanco evaluado, en este caso S6K1. HBOT estaría inhibiendo las vías que se activan ante una respuesta a hipoxia que llevan hacia la inactivación del complejo mTORc1. Signo de interrogación corresponde a algún intermediario modulado por HBOT que provoca la recuperación de la fosforilación sobre S6K1, observada mediante Western-blot.

#### 5.4.1 Efectos sobre la microbiota intestinal.

El epitelio intestinal se encuentra principalmente bajo un estado hipóxico, denominado como una hipoxia fisiológica. Ante esto en el año 2014 el grupo de Allenberg mostró que existe además una diferencia radial en la composición de la microbiota localizada en el intestino, esto ya que va acompañada de un gradiente radial en la concentración de oxígeno, provocando que en el centro del intestino exista una menor concentración de oxígeno, mientras que hacia la periferia aumenta esta concentración.

En relación con lo anterior, estudios realizados sobre la composición de la microbiota en distintos modelos, como lo son pez cebra (Rawls et al; 2006), gorilas (Dethlefsen et al; 2008) y ratones (Matsumoto et al; 2012) han puesto en evidencia que existe una gran variedad en la composición de la microbiota que miembros de una misma especie pueden tener, dependiendo de la dieta, el estilo de vida y el lugar donde se desarrollaron. Sin embargo, se puede llevar a un pool básico común entre todos los miembros de una misma especie, para el caso de los ratones corresponde principalmente a *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Salzman et al; 2010, Gill et al; 2006 & Ley et al; 2008). Esta composición de bacterias ha sido estudiada mediante análisis de patrones moleculares asociados a patógenos, teniendo como resultados que los metabolitos liberados por la microbiota se pueden agrupar en distintos niveles, como lo es a nivel nutricional, en donde liberan ciertos aminoácidos o péptidos que son ingresados a la nutrición del animal. También a nivel de adaptación del sistema inmune como ocurre durante el periodo de lactancia (en mamíferos) en donde se pasa en el calostro (primera leche materna) una gran cantidad de anticuerpos. Estas bacterias, luego en compañía con la microbiota adquirida durante la ontogenia del individuo, generan un proceso llamado resistencia a la colonización, en donde las bacterias que colonizaron el tracto digestivo son reconocidas por el sistema inmune pero no son atacadas y luego ante la presencia de una nueva cepa colonizadora, liberan factores que evitan su proliferación. Finalmente existen además metabolitos relacionados a nivel de protección del hospedero (Bevins & Salzman; 2011). En relación a esto último, se ha estudiado como las células de Paneth cumplen un rol importante en esta relación microbiota-hospedero, ya que secretan factores antibacteriales

tanto hacia la cripta intestinal como hacia el lumen (Meyer-Hoffert et al; 2008). También se ha estudiado el efecto de ciertos metabolitos como lo es el butirato, el cual en cultivos de células provenientes del intestino se ha observado que tiene un efecto de inhibición de la proliferación, pero solo en aquellos casos donde la cripta no está presente como, sucede en pez cebra, o en modelos murinos donde se encuentra alterada mediante heridas. Sin embargo en situaciones de homeostasis el butirato es utilizado por las células del epitelio como fuente de energía en la fosforilación oxidativa para suplir los altos gastos energéticos que demanda este epitelio (Kaiko et al; 2016), proponiéndose que el efecto observado de retrasar la proliferación ante una situación de daño sería debido a una co-evolución entre la microbiota con el hospedero de forma tal de evitar que las células proliferativas alteren su comportamiento hacia una célula cancerosa.

Ante esto, se conoce que el uso de HBOT provoca un cambio en la tensión de oxígeno a nivel corporal completo mientras dura la sesión, por lo que es posible que a largo plazo haya alterado la composición de la microbiota intestinal de los individuos tratados (proceso denominado disbiosis), favoreciendo a aquellos que no son sensibles al oxígeno. Como sucede ante una situación de disbiosis se acompaña de síntomas como diarrea y baja de peso, lo cual no sucedió en este caso, sin embargo, no podemos descartar que alguno de los efectos observados en esta tesis puedan ser producto de algún cambio en la microbiota de los individuos tratados.

Cabe hacer notar que, en los individuos utilizados para la determinación de la relación de los efectos de HBOT con mTORc1, fue necesaria la administración de Rapamicina, un inmunosupresor, el cual altera tanto a la microbiota como al sistema inmune, lo cual pudo generar disbiosis y/o alteraciones en la respuesta inmune de los individuos, que hayan provocado alguno de los efectos observados como puede ser el alargamiento de las criptas.

Con respecto con la proliferación celular por cripta, se observa en la figura 18, que en el grupo Rapa HBOT no hay un aumento en la cantidad de células proliferando. Una alternativa explicación, distinta a la planteada anteriormente (figura 29) es que, en este caso, la administración de Rapamicina haya alterado la composición bacteriana de la microbiota, provocando que el efecto que posee HBOT a los 20 días no se observe debido a que algún factor secretado por la microbiota de los individuos tratados con HBOT, pero sin el inmunosupresor no se encuentre presente. Teniendo efectos sobre distintos procesos del sistema inmune (Chung et al; 2012) o incluso sobre el metabolismo propio del tejido (Chun et al, 2017).

Este tema representa una nueva área de interés para nuestro laboratorio ya que, como se mencionó anteriormente, HBOT potencialmente es capaz de regular muchas funciones, las cuales pueden ser enmascaradas por otras vías. Ante esto, queda como una de las principales proyecciones de este trabajo el análisis de la microbiota intestinal de ratones sometidos a HBOT para comparar si existe algún cambio a nivel de microbiota y así relacionar si es

posible que alguno de los efectos aquí mencionados pueda ser provocados por la microbiota directamente.

### *5.5 DMSO provoca un cambio en la distribución de la proliferación por cripta*

El vehículo de Rapamicina corresponde a DMSO, por lo que al grupo que no fue sometido a HBOT y que se mantuvo como control de Rapamicina se denominó DMSO Ctrl. Se esperaba que presentara un comportamiento similar al grupo C20D, no obstante, en la figura 20 se muestra que aún cuando los valores de los promedios de células proliferando por cripta no varían, sus distribuciones si lo hacen, ocurriendo lo mismo para el grupo DMSO HBOT con el grupo H20D.

Anteriormente había sido reportado por el grupo de Galvao en 2013 que el uso de dosis pequeñas de DMSO (<10%) provoca toxicidad celular debido a problemas con la formación de los poros de la membrana celular. Por otra parte, el grupo de Eter en 2002 reportó que DMSO era capaz de inhibir la proliferación de células endoteliales.

Ante esto, en el presente trabajo se presenta una nueva propiedad del solvente polar DMSO, poniendo en evidencia de que es capaz de alterar la proliferación de las CTI, provocando una disminución en la cantidad de criptas con altos números de células proliferando. Es decir, modula la dinámica de proliferación de las criptas, tendiendo hacia una distribución más acotada en situaciones de normoxia mientras que en HBOT provoca que la curva se acote a pocas criptas con un número mayor de células proliferando.

### *5.6 Comentario general sobre plasticidad intestinal*

El epitelio intestinal está en constante recambio dado el estrés al que es sometido a diario por movimientos de peristalsis, cambios de pH, entre varios más. En esta Tesis de Magíster se ha puesto en evidencia que además las CTI responden activamente ante el estímulo de oxígeno hiperbárico. Esta condición no es una mezcla que se encuentre en la naturaleza ya que un aumento en la presión se puede encontrar en las profundidades del océano donde los niveles de oxígeno son bajos, mientras que en alturas las presiones son menores pero los niveles de oxígeno igual son bajos. Una de las pocas condiciones en donde se puede encontrar esta mezcla es en los buzos que trabajan en las profundidades del océano al igual que en las presiones dentro de un submarino. No obstante, el uso de HBOT con fines terapéuticos hoy está cada vez más extendido. Nuestros resultados indican por primera vez que HBOT induce cambios a nivel de la dinámica de proliferación celular en las CTI. Por tanto, posiblemente HBOT podría influir también sobre otras poblaciones de células troncales somáticas, tales como las células troncales de la piel, las neurales, entre otras. Queda por dilucidar en futuros trabajos si este fenómeno es conservado en otros nichos de células troncales.

Otra de las situaciones en donde se tiene que compensar la presión y utilizar oxígeno es en los transbordadores y trajes espaciales, en donde además de soportar varias condiciones extremas como la falta de gravedad, exposición a la radiación, ciclos de día y noche (solo como referencia, la estación espacial internacional rota alrededor de la tierra 15 veces en un día, por lo que los astronautas ven 15 amaneceres y atardeceres en un solo día) y un régimen

de alimentación muy estricta. Por lo que los efectos sobre las células troncales observados en esta Tesis puede que ya se estén generando en aquellas personas que han tenido la suerte de poder contemplar los glaciares y desiertos al mismo tiempo desde afuera de la superficie de este planeta, en donde la vida ha sido capaz de desarrollarse en un sinnúmero de formas, cada una de estas con capacidades diferentes para auto replicarse y perpetuar su existencia como especie, dando paso a una modelación de su entorno que decidirá su futuro, convirtiendo esta investigación en relación con el ambiente hiperbárico en un tema relevante para la investigación espacial, más ahora que la humanidad activamente está conquistando distintos cuerpos estelares y prontamente la colonización de otro planeta como resulta con el planeta rojo, Marte.



## 6 Conclusión

En este estudio reportamos por primera vez que el uso de HBOT prolongado (similar al que se aplica en terapia a pacientes actualmente) provoca un aumento en la proliferación de las células troncales intestinales, que ocurre de una manera más sincronizada a lo largo del duodeno. Este efecto se genera sin modificar la tasa metabólica basal de los ratones y además sin modificar la actividad de enzimas relacionadas con generación de ATP, lo que sugiere que el aumento en la proliferación sería mediado por un aumento paulatino durante las sesiones de HBOT, sin generar un efecto sobre la vía mTORc1 que se conserve en el tiempo, sugiriendo que se debe a un aumento de la actividad de este complejo durante las sesiones de HBOT

La inhibición de la vía mTORc1 mediante la administración de Rapamicina generó un efecto paradójico debido a que aumentó el número de células proliferando por cripta. Esto se podría deber a que en el periodo de tiempo analizado (20 días) se genera una respuesta similar a una inducida por RC, pero a expensas de modificar la migración celular, lo que resulta en criptas más largas. Al combinar HBOT con Rapamicina se pierde la capacidad que tenían ambos por separado de aumentar la proliferación celular, posiblemente a un efecto competitivo entre la inhibición del complejo mTORc1 con una estabilización de este por parte de HBOT al inhibir las vías que se activan en hipoxia.

Los experimentos propuestos sentarán importantes bases moleculares para el diseño de terapias HBOT más eficientes que puedan promover la activación de las CTI *in vivo*, en la búsqueda de la regeneración tisular, en particular del tejido intestinal.

## 7 Proyecciones

- Ya que HBOT incrementa los niveles de oxígeno disponible a nivel tisular, es necesario evaluar los efectos que provoca sobre la microbiota intestinal, ya que muchas bacterias son sensibles a la presencia de esta molécula, lo cual puede provocar disbiosis, lo que genera efectos a nivel metabólico que podrían alterar la homeostasis celular.
- Es necesario medir los niveles de ATP durante la sesión de HBOT o inmediatamente después de una para poder comprobar que HBOT incide sobre la producción de ATP, que ayudaría a aumentar la proliferación de las CTI.
- El uso de Rapamicina por periodos prolongados de tiempo es capaz de inhibir el complejo mTORc2, por lo que es necesario evaluar los efectos sobre esta vía en los grupos sometidos a Rapamicina por veinte días.
- El aumento en la proliferación de las CTI generado por HBOT puede servir como terapia previa a intervenciones a nivel intestinal, como sucede ante una intervención quirúrgica, provocando que los tiempos de recuperación sean mucho menores a los actuales, favoreciendo así la calidad de vida y economía de los pacientes. Pero, además, como tratamiento posterior a otras intervenciones más severas como lo es la radiación por radioterapia o los efectos de la quimioterapia
- Aún queda por evaluar como HBOT se relaciona con patologías del aparato digestivo, por ejemplo, en modelos inducidos de colitis ulcerosa, como lo son los modelos

inducidos por DSS (Sulfato de sodio dextrano) (Novak et al; 2016), ya que serviría para evaluar posibles terapias para pacientes que sufran de estas enfermedades.

## 8 Referencias

ADLER, Douglas G., et al. Endoscopic identification and quantification of aberrant crypt foci in the human colon. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2002, vol. 56, no 5, p. 657-662.

ALBENBERG, Lindsey, et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*, 2014, vol. 147, no 5, p. 1055-1063. e8.

AMBIRU, Satoshi, et al. Analysis of risk factors associated with complications of hyperbaric oxygen therapy. *Journal of Critical Care*, 2008, vol. 23, no 3, p. 295-300.

ANDERSSON-ROLF, Amanda, et al. Stem cells in repair of gastrointestinal epithelia. *Physiology*, 2017, vol. 32, no 4, p. 278-289.

ANDERSON, J. L.; EDNEY, R. J.; WHELAN, K. Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2012, vol. 36, no 6, p. 503-516.

ANGLIKER, Nico; RÜEGG, Markus A. In vivo evidence for mTORC2-mediated actin cytoskeleton rearrangement in neurons. *Bioarchitecture*, 2013, vol. 3, no 4, p. 113-118.

BALLOU, Lisa M.; LIN, Richard Z. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *Journal of Chemical Biology*, 2008, vol. 1, no 1-4, p. 27-36.

BARKER, Nick, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 2007, vol. 449, no 7165, p. 1003.

BARKER, Nick. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, vol. 15, no 1, p. 19.

BERNER, Juan Enrique, et al. Uso de oxígeno hiperbárico para el manejo de heridas: bases físicas, biológicas y evidencia disponible. *Revista Médica de Chile*, 2014, vol. 142, no 12, p. 1575-1583.

BEVINS, Charles L.; SALZMAN, Nita H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, vol. 9, no 5, p. 356.

BJEDOV, Ivana, et al. Mechanism of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metabolism*, 2010, vol 11, no 1, p. 35-46

BLAGOSKLONNY, Mikhail V. Calorie restriction: decelerating mTOR-driven aging from cells to organisms (including humans). *Cell Cycle*, 2010, vol. 9, no 4, p. 683-688.

CARMON, Kendra S., et al. LGR5 interacts and co-internalizes with Wnt receptors to modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 2012, p. MCB. 00272-12.

BRUGAROLAS, James, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development*, 2004, vol. 18, no 23, p. 2893-2904.

CHEN, Jin-Qiang, et al. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2009, vol. 1793, no 10, p. 1540-1570.

CHEN, Chong, et al. mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. *Sci. Signal.*, 2009, vol. 2, no 98, p. ra75-ra75.

CHOUDHURY, Ryan. Hypoxia and hyperbaric oxygen therapy: a review. *International Journal of General Medicine*, 2018, vol. 11, p. 431.

CHUN, Carlene; ZHENG, Leon; COLGAN, Sean P. Tissue metabolism and host-microbial interactions in the intestinal mucosa. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, vol. 105, p. 86-92.

CHUNG, Hachung, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 2012, vol. 149, no 7, p. 1578-1593.

CLEVERS, Hans C.; BEVINS, Charles L. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annual Review of Physiology*, 2013, vol. 75, p. 289-311.

COX, Lynne S.; MATTISON, Julie A. Increasing longevity through caloric restriction or rapamycin feeding in mammals: common mechanisms for common outcomes?. *Aging Cell*, 2009, vol. 8, no 5, p. 607-613.

DAI, Dao-Fu, et al. Altered proteome turnover and remodeling by short-term caloric restriction or rapamycin rejuvenate the aging heart. *Aging Cell*, 2014, vol. 13, no 3, p. 529-539.

DANIEL, Rosemary Aparecida Furlan, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the intestinal ischemia reperfusion injury. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2011, vol. 26, no 6, p. 463-469.

DETHLEFSEN, Les, et al. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 2008, vol. 6, no 11, p. e280.

DUFOUR, Geneviève, et al. Human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 2004.

DURAND, Aurélie, et al. Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, no 23, p. 8965-8970

ELLIOTT, Rebecca L.; BLOBE, Gerard C. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, vol. 23, no 9, p. 2078-2093.

EMMETT, B. Y Hochachka, P.W. 1981. Scaling of oxidative and glycolytic enzymes in mammals. *Respiration Physiology*. 45: 261–272.



ETER, N.; SPITZNAS, M. DMSO mimics inhibitory effect of thalidomide on choriocapillary endothelial cell proliferation in culture. *British Journal of Ophthalmology*, 2002, vol. 86, no 11, p. 1303-1305.

FAGLIA, Ezio, et al. Adjunctive systemic hyperbaric oxygen therapy in treatment of severe prevalently ischemic diabetic foot ulcer: a randomized study. *Diabetes Care*, 1996, vol. 19, no 12, p. 1338-1343.

FELDMAN, Morris E., et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biology*, 2009, vol. 7, no 2, p. e1000038.

FUJISHITA, Teruaki, et al. Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in *Apc* $\Delta$ 716 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol 105, no 36, p. 13544-13549

GALVAO, Joana, et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*, 2014, vol. 28, no 3, p. 1317-1330.

GAO, Wei, et al. mTOR pathway and mTOR inhibitors in head and neck cancer. *ISRN Otolaryngology*, 2012, vol. 2012.

GARELICK, Michael G., et al. Chronic rapamycin treatment or lack of S6K1 does not reduce ribosome activity in vivo. *Cell Cycle*, 2013, vol. 12, no 15, p. 2493-2504.

GILL, Steven R., et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 2006, vol. 312, no 5778, p. 1355-1359.

GOLD, Leslie I. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 1999, vol. 10, no 4, p. 303-360.

GROSSMANN, Johannes, et al. Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*, 2001, vol. 12, no 3, p. 147-156.

GRÜN, Dominic, et al. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature*, 2015, vol. 525, no 7568, p. 251.

HAMMOND, KIMBERLY A., et al. The mechanistic basis of aerobic performance variation in red junglefowl. *Journal of Experimental Biology*, 2000, vol. 203, no 13, p. 2053-2064.

HARA, Kenta, et al. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no 23, p. 14484-14494.

HARCH, Paul G. Hyperbaric oxygen in chronic traumatic brain injury: oxygen, pressure, and gene therapy. *Medical Gas Research*, 2015, vol. 5, no 1, p. 9.

HARRISON, David E., et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 2009, vol. 460, no 7253, p. 392.

HAY, Nissim; SONENBERG, Nahum. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, 2004, vol. 18, no 16, p. 1926-1945.

HEITMAN, Joseph; MOVVA, N. Rao; HALL, Michael N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 1991, vol 253, no 5022, p. 905-909.

IEZZI, Leonardo Estenio, et al. Crohn's disease and hyperbaric oxygen therapy. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2011, vol. 26, p. 129-132.

JACINTO, Estela, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 2004, vol. 6, no 11, p. 1122.

KAIKO, Gerard E., et al. The colonic crypt protects stem cells from microbiota-derived metabolites. *Cell*, 2016, vol. 165, no 7, p. 1708-1720.

KARADURMUS, Nuri, et al. Potential benefits of hyperbaric oxygen therapy on atherosclerosis and glycaemic control in patients with diabetic foot. *Endokrynologia Polska*, 2010, vol. 61, no 3, p. 275-279.

KELLY, Catherine J., et al. Regulation of O<sub>2</sub> consumption by the PI3K and mTOR pathways contributes to tumor hypoxia. *Radiotherapy and Oncology*, 2014, vol. 111, no 1, p. 72-80.

KIM, Do-Hyung, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 2002, vol. 110, no 2, p. 163-175.

KIM, Sang Gyun; BUEL, Gwen R.; BLENIS, John. Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway. *Molecules and Cells*, 2013, vol. 35, no 6, p. 463-473.

LANGLANDS, Alistair J., et al. Paneth cell-rich regions separated by a cluster of Lgr5+ cells initiate crypt fission in the intestinal stem cell niche. *PLoS Biology*, 2016, vol. 14, no 6, p. e1002491.

LEY, Ruth E., et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 2008, vol. 320, no 5883, p. 1647-1651.

LI, Jing; KIM, Sang Gyun; BLENIS, John. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metabolism*, 2014, vol. 19, no 3, p. 373-379.

LIKNES, Eric T.; SCOTT, Sarah M.; SWANSON, David L. Seasonal acclimatization in the American goldfinch revisited: to what extent do metabolic rates vary seasonally?. 2015.

LINEHAN, Jonathan L., et al. Non-classical immunity controls microbiota impact on skin immunity and tissue repair. *Cell*, 2018, vol. 172, no 4, p. 784-796. e18.

JIN-SONG, L. I. U.; MING, L. I.; SHU-LI, S. H. A. O. Seasonal changes in thermogenic properties of liver and muscle in tree sparrows *Passer montanus*. *Acta Zool Sin*, 2008, vol. 54, no 5, p. 777-784.

LONG, Xiaomeng, et al. TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. *Current Biology*, 2002, vol 12, no 17, p. 1448-1461.

MCGRATH, R. A. Cell migration and abnormal crypt-cell enlargement in the small intestine of X-irradiated mice. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1960, vol. 2, no 2, p. 177-185.

MARKOWITZ, Sanford, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 1995, vol. 268, no 5215, p. 1336-1338.

MATSUMOTO, Mitsuharu, et al. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Scientific Reports*, 2012, vol. 2, p. 233.

MCNEIL, N. Ian; CUMMINGS, J. H.; JAMES, W. P. Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. *Gut*, 1978, vol. 19, no 9, p. 819-822.

MEYER-HOFFERT, Ulf, et al. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut*, 2008, vol. 57, no 6, p. 764-771.

MOTNGOMERY, Robert K, et al. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, vol 108, no 1, p. 179-184

MU, Jun; KRAFFT, Paul R.; ZHANG, John H. Hyperbaric oxygen therapy promotes neurogenesis: where do we stand?. *Medical Gas Research*, 2011, vol. 1, no 1, p. 14.

MU, Jun, et al. Delayed hyperbaric oxygen therapy induces cell proliferation through stabilization of cAMP responsive element binding protein in the rat model of MCAo-induced ischemic brain injury. *Neurobiology of Disease*, 2013, vol. 51, p. 133-143.

NAGAMINE, K., et al. Beneficial effect of hyperbaric oxygen therapy on liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. *European Surgical Research*, 2004, vol. 36, no 6, p. 350-356.

NEFZGER, Christian M., et al. A versatile strategy for isolating a highly enriched population of intestinal stem cells. *Stem cell Reports*, 2016, vol. 6, no 3, p. 321-329.

NOJIMA, Hiroki, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no 18, p. 15461-15464.

NORRMÉN, Camilla; SUTER, Ueli. Akt/mTOR signalling in myelination. 2013.

NOVAK, Sanja, et al. Anti-inflammatory effects of hyperbaric oxygenation during DSS-induced colitis in BALB/c mice include changes in gene expression of HIF-1 $\alpha$ , proinflammatory cytokines, and antioxidative enzymes. *Mediators of Inflammation*, 2016, vol. 2016.

NYLANDER, G., et al. Lipid peroxidation products in postischemic skeletal muscle and after treatment with hyperbaric oxygen. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*. 1989, vol 23, no 2, p 97-103.

O'BRIEN, Catherine A., et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 2007, vol. 445, no 7123, p. 106.

PARKER, Aimee, et al. Cell proliferation within small intestinal crypts is the principal driving force for cell migration on villi. *The FASEB Journal*, 2016, vol. 31, no 2, p. 636-649.

PEÑA-VILLALOBOS, Isaac, et al. Hyperbaric oxygen increases stem cell proliferation, angiogenesis and wound-healing ability of WJ-MSCs in diabetic mice. *Frontiers in Physiology*, 2018, vol. 9.

PEÑA-VILLALOBOS, Isaac, et al. Adaptive physiological and morphological adjustments mediated by intestinal stem cells in response to food availability in mice. *Frontiers in Physiology*, 2018, vol. 9.

POTTEN, Christopher S. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 1998, vol. 353, no 1370, p. 821-830.

POTTEN, Christopher S.; KOVACS, Laszlo; HAMILTON, Elizabeth. Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Proliferation*, 1974, vol. 7, no 3, p. 271-283.

POTTEN, Christopher S.; LOEFFLER, M. A comprehensive model of the crypts of the small intestine of the mouse provides insight into the mechanisms of cell migration and the proliferation hierarchy. *Journal of Theoretical Biology*, 1987, vol. 127, no 4, p. 381-391.

POTTEN, Christopher S.; OWEN, Gary; BOOTH, Dawn. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci*, 2002, vol. 115, no 11, p. 2381-2388.

POWELL, Anne E., et al. The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell*, 2012, vol. 149, no 1, p. 146-158.

RABANAL-RUIZ, Yoana; OTTEN, Elsje G.; KOROLCHUK, Viktor I. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays in Biochemistry*, 2017, vol. 61, no 6, p. 565-584.

RAWLS, John F., et al. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*, 2006, vol. 127, no 2, p. 423-433.

REILING, Jan H.; HAFEN, Ernst. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes & Development*, 2004, vol. 18, no 23, p. 2879-2892.

RHOADS, J. Marc, et al. Role of mTOR signaling in intestinal cell migration. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006, vol. 291, no 3, p. G510-G517.

RODRÍGUEZ PERÓN, José Miguel; MENÉNDEZ LÓPEZ, José Rogelio; TRUJILLO LÓPEZ, Yoel. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 2001, vol. 30, no 1, p. 15-20.

ROPER, Jatin; YILMAZ, Ömer H. Metabolic teamwork in the stem cell niche. *Cell Metabolism*, 2017, vol. 25, no 5, p. 993-994.

SALZMAN, Nita H., et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature Immunology*, 2010, vol. 11, no 1, p. 76.



SANDERS, Aaron P., et al. Effects of Hyperbaric Oxygenation on Metabolism I. ATP Concentration in Rat Brain, Liver and Kidney. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1966, vol. 121, no 1, p. 32-34.

SANGIORGI, Eugenio; CAPECCHI, Mario R. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics*, 2008, vol. 40, no 7, p. 915.

SARBASSOV, Dos D., et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 2005, vol. 307, no 5712, p. 1098-1101.

SARBASSOV, Dos D., et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology*, 2004, vol. 14, no 14, p. 1296-1302.

SARBASSOV, Dos D.; ALI, Siraj M.; SABATINI, David M. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, vol. 17, no 6, p. 596-603.

SAXTON, Robert A.; SABATINI, David M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 2017, vol. 168, no 6, p. 960-976.

SCHIEKE, Stefan M., et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, no 37, p. 27643-27652.

SCHIEKE, Stefan M., et al. The mTOR pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 2006.

SCHNEIDER, Abraham; YOUNIS, Rania H.; GUTKIND, J. Silvio. Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*, 2008, vol. 10, no 11, p. 1295-1302.

SILVA-PALACIOS, Alejandro; KOENIGSBERG, Mina; ZAZUETA, Cecilia. Nrf2 signaling and redox homeostasis in the aging heart: a potential target to prevent cardiovascular diseases?. *Ageing Research Reviews*, 2016, vol. 26, p. 81-95.

SNIPPERT, Hugo J., et al. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 2010, vol. 143, no 1, p. 134-144.

SPILMAN, Patricia, et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid- $\beta$  levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PloS One*, 2010, vol. 5, no 4, p. e9979.

TAKEDA, Norifumi, et al. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science*, 2011, vol. 334, no 6061, p. 1420-1424.

TEE, Andrew R., et al. Tuberous sclerosis complex-1 and-2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no 21, p. 13571-13576.

THOM, Stephen R., et al. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2006, vol. 290, no 4, p. H1378-H1386.

THOM, Stephen R. Hyperbaric oxygen—its mechanisms and efficacy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2011, vol. 127, no Suppl 1, p. 131S.

THOM, Stephen R. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *Journal of Applied Physiology*, 2009, vol. 106, no 3, p. 988-995.

TIAN, Hua, et al. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 2011, vol. 478, no 7368, p. 255.

TOSCHI, Alfredo, et al. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, vol. 29, no 6, p. 1411-1420.

TOTAFURNO, J. O. H. N.; BJERKNES, MATTHEW; CHENG, HAZEL. The crypt cycle. Crypt and villus production in the adult intestinal epithelium. *Biophysical Journal*, 1987, vol. 52, no 2, p. 279-294.

VAN DER FLIER, Laurens G., et al. OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, 2009, vol. 137, no 1, p. 15-17.

VAN DER FLIER, Laurens G., et al. Transcription factor achaetes-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell*, 2009, vol. 136, no 5, p. 903-912.

VEZINA, Claude; KUDELSKI, Alicia; SEHGAL, S. N. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, 1975, vol. 28, no 10, p. 721-726.

VITTORIA, J. C.; MARSH, R. L. Cold-acclimated ducklings shiver when exposed to cold. *Am. Zool*, 1996, vol. 36, p. 66.

VIVANCO, Igor; SAWYERS, Charles L. The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2002, vol. 2, no 7, p. 489.

WANG, Xiao-Li, et al. Proliferation of neural stem cells correlates with Wnt-3 protein in hypoxic-ischemic neonate rats after hyperbaric oxygen therapy. *Neuroreport*, 2007, vol. 18, no 16, p. 1753-1756.

WATT, Fiona M.; HOGAN, Brigid LM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 2000, vol. 287, no 5457, p. 1427-1430.

WEAVER, Lindell K., et al. Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *New England Journal of Medicine*, 2002, vol. 347, no 14, p. 1057-1067.

WEINER, January. Physiological limits to sustainable energy budgets in birds and mammals: ecological implications. *Trends in Ecology & Evolution*, 1992, vol. 7, no 11, p. 384-388.

WILLIAMS, J. M., et al. Epithelial cell shedding and barrier function: a matter of life and death at the small intestinal villus tip. *Veterinary Pathology*, 2015, vol. 52, no 3, p. 445-455.

WONG, Vivian WY, et al. Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nature Cell Biology*, 2012, vol. 14, no 4, p. 401.

YAN, Kelley S., et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, no 2, p. 466-471.

YILMAZ, Ömer H., et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature*, 2012, vol. 486, no 7404, p. 490.

YIN, Xiaolei, et al. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. *Nature Methods*, 2014, vol. 11, no 1, p. 106.

YUE, Jianbo, et al. CD38/cADPR/Ca<sup>2+</sup> pathway promotes cell proliferation and delays nerve growth factor-induced differentiation in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, vol. 284, no 43, p. 29335-29342.

YU, Fa-Xing; GUAN, Kun-Liang. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & Development*, 2013, vol. 27, no 4, p. 355-371.

ZAROGOULIDIS, P., et al. mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review (Review). *Oncol Lett*, 2014, 8: 2367–2370.

ZHAI, Baohui, et al. Rapamycin relieves anxious emotion and synaptic plasticity deficits induced by hindlimb unloading in mice. *Neuroscience Letters*, 2018, vol. 677, p. 44-48.

ZHANG, Xiao-Ying, et al. The role of  $\beta$ -catenin signaling pathway on proliferation of rats neural stem cells after hyperbaric oxygen therapy in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2011, vol. 31, no 1, p. 101-109.

ZHANG, Tao, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves neurogenesis and brain blood supply in piriform cortex in rats with vascular dementia. *Brain Injury*, 2010, vol. 24, no 11, p. 1350-1357.

ZHENG, Wei-Hong, et al. Comparison of thermogenic character of liver and muscle in Chinese bulbul *Pycnonotus sinensis* between summer and winter. 2010.

ZHOU, Yuning, et al. TSC2/mTORC1 signaling controls Paneth and goblet cell differentiation in the intestinal epithelium. *Cell Death & Disease*, 2016, vol. 6, no 2, p. e1631.

#### *8.1 Material de referencia complementario:*

Instituto español de medicina hiperbárica ([www.institutomedicinahiperbarica.es/medicina-hiperbarica/](http://www.institutomedicinahiperbarica.es/medicina-hiperbarica/)) actualizada el 2018, consultada el 9 de julio del 2018

Informe “Proyecto De Medicina Hiperbárica”, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2018,