



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica

TESIS PROFESIONAL

*Para optar al título profesional de Tecnóloga Médica con mención
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico*

**“Evaluación de marcadores inflamatorios en el intestino de peces
Nothobranchius furzeri durante el envejecimiento fisiológico y en modelos
inducidos de inflamación”**

Deyanira Avelin Cárdenas Ponce

Tutor/a: Dr. Miguel Concha y Dra. Janina Borgonovo

Laboratorio de Estudios Ontogénicos

Julio de 2023

Índice

1. Resumen	3
2. Palabras claves	4
3. Introducción	4
4. Hipótesis	8
5. Objetivo general.....	8
6. Objetivos específicos.....	9
7. Materiales y métodos.....	9
8. Resultados obtenidos	12
8.1 Organización anatómica e histológica del intestino de los peces <i>Nothobranchius</i> 12	
<i>furzeri</i>	12
8.2 Análisis de marcadores histológicos de inflamación durante el envejecimiento	15
fisiológico.....	15
8.2.1 Evaluación de alteraciones en la arquitectura tisular intestinal, asociadas a un estado inflamatorio crónico durante el envejecimiento de <i>Nothobranchius furzeri</i>	15
8.2.1.1 Medición del grosor de pared intestinal y de la lámina propia.....	15
8.2.1.2 Observación de la arquitectura de las vellosidades.....	18
8.2.2 Análisis de cambios celulares asociados a un estado intestinal inflamatorio crónico	18
8.2.2.1 Análisis de las células caliciformes	18
8.2.2.2 Conteo del número de linfocitos intraepiteliales	21
9. Discusión	23
10. Conclusiones.....	30
11. Bibliografía.....	31
12. Anexos.....	34

1. Resumen

El envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad presentan mecanismos comunes, entre los que se destaca la inflamación. Diferentes trastornos gastrointestinales (GI) crónicos son frecuente entre la población adulta mayor, como ocurre con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal que presenta una alta prevalencia en individuos ancianos. Diversas evidencias apuntan a la existencia de una estrecha relación entre la inflamación y el envejecimiento, siendo la primera clave en el declive fisiológico asociado al avance de la edad. Asimismo, durante el envejecimiento ocurre un desbalance de la respuesta inmunitaria, desencadenando un estado pro-inflamatorio crónico de baja intensidad. Los estímulos que conducen a este estado pro-inflamatorio crónico pueden originarse en diferentes órganos y tejidos, entre los que destaca el intestino. Este órgano es un sitio de alta exposición a agentes externos y la microbiota intestinal sufre cambios durante el envejecimiento, lo cual induce la activación crónica de las células de la inmunidad innata produciendo una inflamación primariamente local y posteriormente sistémica. Hasta la fecha, se cuenta con pocos estudios que aborden el efecto del envejecimiento sobre la inflamación crónica intestinal. Dado a la relevancia de la interrelación del envejecimiento/inflamación, en el presente trabajo queremos evaluar esta asociación en un modelo emergente de envejecimiento, el pez teleosteo *Nothobranchius furzeri*. Este modelo presenta una vida media extremadamente corta entre los vertebrados y en forma interesante experimentan un envejecimiento acelerado altamente conservado a nivel molecular, celular, tisular y sistémico comparado con los mamíferos. Además, su sistema digestivo presenta una organización y tipos celulares semejantes a los mamíferos. Estas características permiten abordar estudios longitudinales con mayor facilidad y trazabilidad con respecto a otros organismos tradicionalmente utilizados como los ratones y el pez cebra, por lo que los peces *Nothobranchius furzeri* podrían constituir un modelo vertebrado único para estudiar trastornos GI crónicos asociados al envejecimiento.

En este trabajo se analizó si durante el envejecimiento fisiológico de estos peces ocurren, de forma espontánea, cambios intestinales asociados a estados pro-inflamatorios. Para ello se evaluaron diferentes criterios histológicos en individuos jóvenes (6 semanas) y viejos (16 semanas) a nivel intestinal por medio de tinción de Hematoxilina y Eosina, y técnicas de tinción histoquímica para la caracterización de mucinas. Los criterios histológicos analizados fueron: grosor de la pared intestinal, ancho de lámina propia en vellosidades, infiltración de linfocitos intraepiteliales y número de células caliciformes, obteniendo resultados que permitirían asociar estos cambios con un patrón inflamatorio crónico leve. Esta evaluación preliminar constituye la base para estudios posteriores en los cuales se adicionarán marcadores moleculares para una descripción más certera del estatus inflamatorio intestinal.

2. Palabras claves

Envejecimiento, inflamación intestinal, *Nothobranchius furzeri*

3. Introducción

El envejecimiento es uno de los fenómenos biológicos más intrincados y complejos y representa el principal factor de riesgo para todas las enfermedades relacionadas con la edad, como infecciones, cáncer, trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias crónicas y neurodegenerativas. La gerociencia propone que el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad presentan mecanismos comunes, los cuales involucran alteraciones metabólicas, pérdida de la proteostasis, agotamiento de las células madre, alteraciones epigenéticas, disminución de la capacidad regenerativa, inestabilidad genómica e inflamación (1). Llamativamente la inflamación parece tener un rol clave, ya que la alteración de cada uno de estos mecanismos converge en inflamación, la cual a su vez afecta a los otros pilares (1). Asimismo, durante el envejecimiento se desarrolla un estado inflamatorio crónico de baja intensidad, llamado inmunosenescencia que contribuye a la patogénesis de las enfermedades asociadas con la edad. En este contexto, varios estudios

sugieren que el nivel de inflamación (asociado con la edad biológica más que con la edad cronológica) representa un factor crítico en la variabilidad interindividual de los ancianos y en la predisposición al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (2).

Entre los desencadenantes más comunes de la inflamación asociada al envejecimiento incluyen infecciones víricas y bacterianas persistentes, acumulación de debris celulares, proteínas mal plegadas y proteínas oxidadas entre otros factores. La inmunosenescencia involucra la mayoría de las células y órganos del cuerpo, en donde cada tejido y ecosistema contribuye en forma diferencial en el comienzo y progresión de este estado fisiológico. En este contexto, el intestino conjuntamente con la microbiota intestinal, son partícipes importantes en el establecimiento de la inmunosenescencia. Durante el envejecimiento se produce un remodelamiento de la microbiota comensal lo cual se asocia a un estado pro-inflamatorio crónico inicialmente local con efectos sistémicos posteriores. Asimismo, el envejecimiento aumenta significativamente la vulnerabilidad a los trastornos gastrointestinales (GI), con aproximadamente el 40% de los pacientes geriátricos que informan al menos una queja GI durante el examen físico de rutina (3).

Diferentes estados inflamatorios intestinales crónicos, como la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), se caracterizan por una respuesta inmune sostenida en el tiempo. Estas enfermedades presentan un componente asociado a la edad, siendo frecuente entre la población mayor de 60 años y mostrando una incidencia mayor entre la población anciana (4, 5). Los dos tipos más comunes de EII son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). En la EC, la inflamación afecta a todo el tubo digestivo, mientras que en la CU sólo afecta al colon. Ambas enfermedades se caracterizan por una respuesta anormal del sistema inmunitario, produciendo diarrea o urgencia rectal, sangrado, dolor abdominal, estreñimiento y pérdida de apetito (6). Se cree que la EII es causada por una respuesta inmunitaria patológica continua a la alteración de microbios comensales y productos microbianos (disbiosis) (4, 5). La evidencia acumulada indica que las interacciones complejas de los

siguientes eventos están involucradas en la patogenia de la EII: 1) alteración y/o disbiosis de la microbiota comensal, con una proporción reducida de especies bacterianas comensales protectoras frente a agresivas o alteración funcional de las bacterias comensales; 2) destrucción y procesamiento bacteriano defectuoso por parte de las células de la mucosa intestinal debido a un defecto genético; 3) defectos en la función de barrera mucosa resultante de la síntesis y/o procesamiento anormales de mucinas y TFF3; y 4) alteración en la respuesta inmunitaria del huésped, ya sea de inmunidad innata y/o adaptativa. Las alteraciones de la producción de mucina y la glicosilación ocurren en la EII, pero se desconoce si contribuyen al inicio de la inflamación o son el resultado de la inflamación (7).

A pesar de la necesidad de comprender mejor los factores asociados con la edad que aumentan la susceptibilidad a la disfunción GI, hay una escasez de estudios que investiguen los factores claves del envejecimiento que afectan el tracto GI. La mayor parte de los análisis se realizan en animales jóvenes, dejando de lado a este factor de riesgo, lo cual puede conducir a una interpretación inexacta o errónea de los resultados. Hasta la fecha, se cuenta con pocos estudios que aborden el efecto del envejecimiento sobre la fisiología del sistema GI y en este sentido ha demostrado en roedores una alteración dependiente de la edad en la contractilidad del músculo liso intestinal (8), así como la inervación neural de la musculatura del tracto gastrointestinal (9).

En lo que respecta a los modelos pre-clínicos de la EII, generalmente son modelos agudos o subcrónicos que se realizan en animales jóvenes. Se han establecido varios modelos murinos para estudiar la EII basados en modificaciones genéticas (IL-10, IL-2, TLR5, ratones deficientes en T-bet) o por medio de la inducción de colitis con agentes químicos como dextran sodium sulfate (DSS), 2, 4, 6 trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) y oxazolona (10). Esto ha permitido avanzar en la comprensión de la EII, en términos de aspectos que incluyen el rol de la microbiota intestinal, inmunorreacción, infección y herencia. Más recientemente,

se ha empezado a utilizar a pez cebra (*Danio rerio*) para comprender la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal utilizando los mismos agentes enterocolíticos que se evalúan en los roedores. En estos estudios se pudo observar que a pesar de la distancia filogenética de los peces con los mamíferos, se alcanzaban respuestas similares, con los mismos patrones histológicos y moleculares a los observados en los modelos murinos. Los peces expuestos a enterocolíticos presentan un aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, alteraciones de la arquitectura de las vellosidades, cambios en el número de las células caliciformes e infiltraciones de células inflamatorias (11–15).

La evidencia, por lo tanto, respalda la existencia y viabilidad de modelos animales de experimentación para enfermedades intestinales inflamatorias, los cuales replican una inflamación local crónica fidedigna a niveles histológicos. Sin embargo, surge la necesidad de contar con un modelo que permita replicar enfermedades intestinales inflamatorias en condiciones fisiológicas de envejecimiento. En este contexto, el pez teleósteo *Nothobranchius furzeri* (killifish turquesa) es un candidato atractivo para realizar este tipo de estudios. Este pez registra una vida media excepcionalmente corta para un vertebrado, viviendo sólo 4 meses en condiciones de laboratorio (16). De este modo, *N. furzeri* se incorporó recientemente al grupo de modelos de envejecimiento bien establecidos que incluyen levaduras, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila* (16). Los killifish turquesa presentan un proceso de envejecimiento acelerado y altamente conservado a nivel molecular, celular, tisular y sistémico con el de los mamíferos. Estas características permiten abordar estudios longitudinales con mayor facilidad con respecto a otros organismos vertebrados como pez cebra y ratones, reduciendo tiempos y costos. Asimismo, presenta una serie de ventajas con respecto a los invertebrados de vida corta como *C. elegans* y *Drosophila melanogaster*, ya que poseen una organización anatómica y fisiología más cercana a los mamíferos.

Recientemente, en un estudio realizado en el Laboratorio de Estudio Ontogénicos de la Facultad de Medicina (LEO-lab), se demostró que el sistema GI de los killifish turquesa presentan muchas características similares al de otros vertebrados. La arquitectura de los tejidos es conservada, mostrando una mucosa plegada formando vellosidades que se apoya sobre una muscular externa, seguida de una serosa. El epitelio intestinal presenta diferentes tipos celulares semejantes a los observados en los mamíferos como son los enterocitos, células caliciformes, células enteroendocrinas y además linfocitos intraepiteliales. Entre las capas musculares circular y longitudinal, es posible distinguir un plexo mientérico que posee neuronas que expresan serotonina (5-HT), sustancia P y tirosina hidroxilasa (TH). Dado a estas características, los peces *Nothobranchius furzeri* podrían constituir un modelo vertebrado adecuado para estudiar los trastornos GI crónicos asociados al envejecimiento. Por ello, en el presente trabajo se propuso analizar si, durante el envejecimiento fisiológico de estos peces, ocurren de forma espontánea cambios intestinales asociados a un estado pro-inflamatorio. Para ello, se evaluaron diferentes criterios histológicos en individuos jóvenes (6 semanas) y viejos (16 semanas) a nivel intestinal por medio de tinción de Hematoxilina y Eosina, y técnicas de tinción histoquímica para caracterización de mucinas presentes a lo largo del tracto digestivo. Los criterios histológicos analizados fueron: grosor de la pared intestinal (serosa, muscular y lámina propia), ancho de lámina propia en vellosidades, infiltración de linfocitos intraepiteliales y número de células caliciformes.

4. Hipótesis

Durante el envejecimiento fisiológico de los peces *Nothobranchius furzeri* se producen cambios citoarquitectónicos en la pared intestinal compatibles con un estado inflamatorio crónico.

5. Objetivo general

Evaluar cambios inflamatorios a nivel histológico en el intestino de los peces *Nothobranchius furzeri* en condiciones de envejecimiento fisiológico.

6. Objetivos específicos

6.1 Objetivo específico 1: Evaluar alteraciones en la arquitectura tisular intestinal asociadas a un estado inflamatorio crónico.

6.2 Objetivo específico 2: Analizar cambios celulares asociados a un estado inflamatorio crónico.

7. Materiales y métodos

7.1 Mantenimiento de peces

Se utilizaron peces *Nothobranchius furzeri* de 6 y 16 semanas de edad pertenecientes a la cepa GRZ (Gona Re Zhou), escogiendo 3 individuos por condición etaria. Los animales fueron mantenidos en el bioterio de peces del Laboratorio de Estudios Ontogénicos (LEO), de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Las condiciones ambientales fueron las siguientes: régimen de ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, temperatura de 28°C, sistemas recirculantes, conductividad del agua de 400–500 μ S y el pH entre 7 y 7,5. Los procedimientos animales fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (número de certificado Cicua: 20385-Med-Uch).

7.2 Procesamiento de muestras

Los peces fueron sacrificados con una solución al 0,1% de etilo 3-aminobenzoato metano sulfonato (MS-222; Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos; A-5040). Los intestinos fueron removidos, seccionados en 3 zonas (intestino anterior, medio y posterior) identificadas según hitos anatómicos (curvaturas del tracto digestivo, colédoco y esfínteres) y fijados por inmersión en solución fijadora de Bouin toda la noche a 4°C. Los 3 segmentos de intestino fueron orientados transversalmente en bloques de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, preparada al momento de usar, en moldes de vinilo para especímenes (Tissue-Tek Cryomold,

Sakura 4566). Posteriormente, los bloques fueron enfriados durante 20 minutos y recortados al tamaño de los moldes de acero inoxidable. Estos bloques fueron lavados con etanol 80° a 4°C durante toda la noche y deshidratados en una batería ascendentes de etanoles (80°, 95°, 95°, 100°, 100°, 100°), aclarados en 3 baños de Histoclear e incluidos en 3 baños de parafina histológica (Histosec pastillas MERCK, 1.11609) a 60°C. Finalmente, los bloques de agarosa se orientaron para la inclusión final en bloque de parafina procurando mantener la orientación de los segmentos de manera transversal, mediante la utilización de cassetes histológicos y moldes de acero inoxidable.

7.3 Obtención de cortes

Se obtuvieron cortes seriados de 4 µm de grosor con micrótopo rotatorio tipo Minot (Leitz), los cuales fueron estirados en baños termorregulados con agua destilada a 40°C y adheridos a portaobjetos silanizados. Una vez adheridos, los cortes fueron secados a 70°C y almacenados a 4°C hasta su uso.

7.4 Técnicas histoquímicas

Los cortes adheridos a portaobjetos fueron desparafinados en 3 baños consecutivos de histoclear, rehidratados en batería descendente de etanoles (70°, 95°, 95°, 100°, 100°, 100°) y finalmente en agua destilada. Se realizó tinción de rutina con Hematoxilina (Sigma-Aldrich 1092491000) y Eosina (Sigma-Aldrich 1.15935.0025) para la visualización general de la morfología de la pared intestinal. La identificación y caracterización de mucinas se realizó por medio de reacción de ácido peryódico-Schiff (PAS) (Protocolo de Mc. Manus, 1946, 1948) y por el método de alcian blue pH 2,5 (AB) (Protocolo de S. Spicer, 1964). Los cortes teñidos fueron deshidratados en batería ascendente de etanoles (80°, 95°, 95°, 100°, 100°, 100°), aclarados en dos baños consecutivos de Histoclear (National diagnostics) para finalmente ser montados con cubreobjetos y 2 gotas de medio de montaje (Entellán, MERCK, 1.07961.0100).

7.5 Análisis y procesamiento de imágenes

Los cortes teñidos fueron observados en Tissue Scanner o microscopio de luz convencional. Se utilizaron 3 animales por condición y se analizaron aproximadamente 10 secciones de cada región intestinal (anterior, media y posterior). Se tomaron fotos utilizando microscopio de luz convencional de campo claro con aumento 40x (Nikon eclipse 80i) y cámara (Nikon digital sight DS-Fi1) con el software NIS-Elements (Nikon). Se examinaron cuatro parámetros diferentes: grosor de la pared intestinal (serosa, muscular y lámina propia), ancho de lámina propia en vellosidades, infiltración de linfocitos intraepiteliales y número de células caliciformes. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MARYLAND).

7.6 Análisis y procesamiento de datos

Se utilizó un $n=3$ de animales por grupo. Las cuantificaciones se realizaron en 10 secciones escogidas al azar para cada una de las regiones intestinales analizadas (IA, IM1, IM2, IM3, IP). Las mediciones se realizaron con el software ImageJ 1.53t utilizando los complementos "Analizar partículas" y "Rectas", previa calibración de la escala, para contar el número de células positivas para las tinciones específicas y el ancho de la lámina propia y pared intestinal, respectivamente. Los test estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism v 5.03 y los datos fueron analizados por ANOVA de una sola vía seguido del test de comparación múltiple Tukey. Los gráficos representan las medias de los datos y el error estándar (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

8. Resultados obtenidos

8.1 Organización anatómica e histológica del intestino de los peces *Nothobranchius furzeri*

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Borgonovo et al., 2023, paper en revisión), encontramos que el tracto digestivo de *Nothobranchius furzeri* consta de una boca, faringe, esófago, intestino y ano. Al igual que los otros integrantes de la familia de los Cyprinodontiformes, los killifish turquesa carecen de estómago y el esófago se continúa directamente hacia el intestino. El intestino se puede dividir en tres secciones diferentes siguiendo hitos anatómicos (Figura 1). El intestino anterior (IA) corresponde a la región comprendida entre el esófago y la zona de inserción del conducto biliar, el intestino medio (IM) abarca al siguiente segmento hasta el comienzo del recto (intestino posterior, IP), el cual se puede evidenciar por un abrupto ensanchamiento del calibre del tubo intestinal y un cambio en la coloración (pigmentación rojiza). Por razones prácticas el IM fue dividido en tres secciones de similar tamaño para poder analizar toda la longitud de este segmento (porción más extensa del intestino).

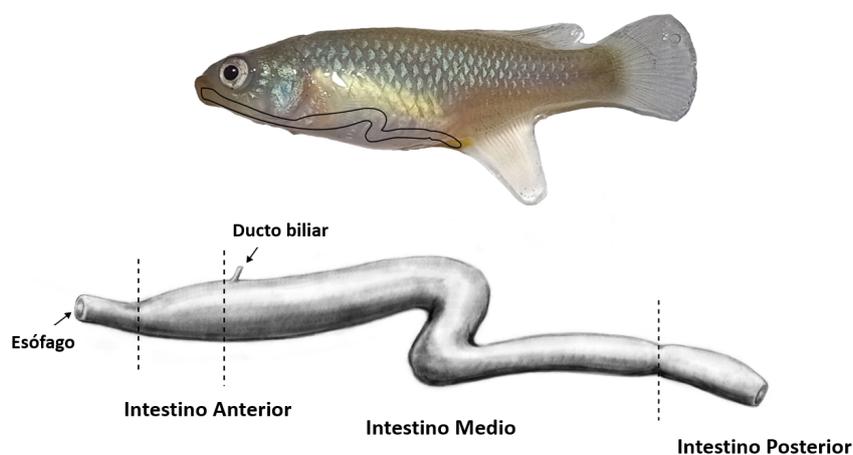


Figura 1. Dibujo esquemático del intestino de *Nothobranchius furzeri* indicando los tres segmentos intestinales: intestino anterior (IA), intestino medio (IM) e intestino posterior (IP).

Por medio de tinciones de hematoxilina/eosina pudimos observar que el intestino de *Nothobranchius furzeri* estaba organizado en capas concéntricas similares a las presentes en el intestino de los mamíferos. Sin embargo, los killifish turquesa al igual que otros teleósteos, carecían de una capa de músculo liso comparable a la muscularis mucosa. Así, solo fue posible distinguir tres capas: mucosa, muscularis externa y serosa (Figura 2). Esta arquitectura básica fue la misma en todos los segmentos del intestino analizados. La mucosa constaba de un epitelio cilíndrico simple sostenido por la lámina propia. El epitelio carecía de criptas y la lámina propia era una fina capa formada por tejido conectivo laxo vascularizado sin presencia de glándulas. La mucosa de los segmentos intestinales anterior, medio y posterior formaba pliegues de longitud variable, asemejando las vellosidades de los vertebrados superiores. La muscularis externa estaba compuesta por dos capas de músculo liso; las células de la capa interna tenían una orientación circular mientras que las de la capa externa era longitudinal (Figura 2).

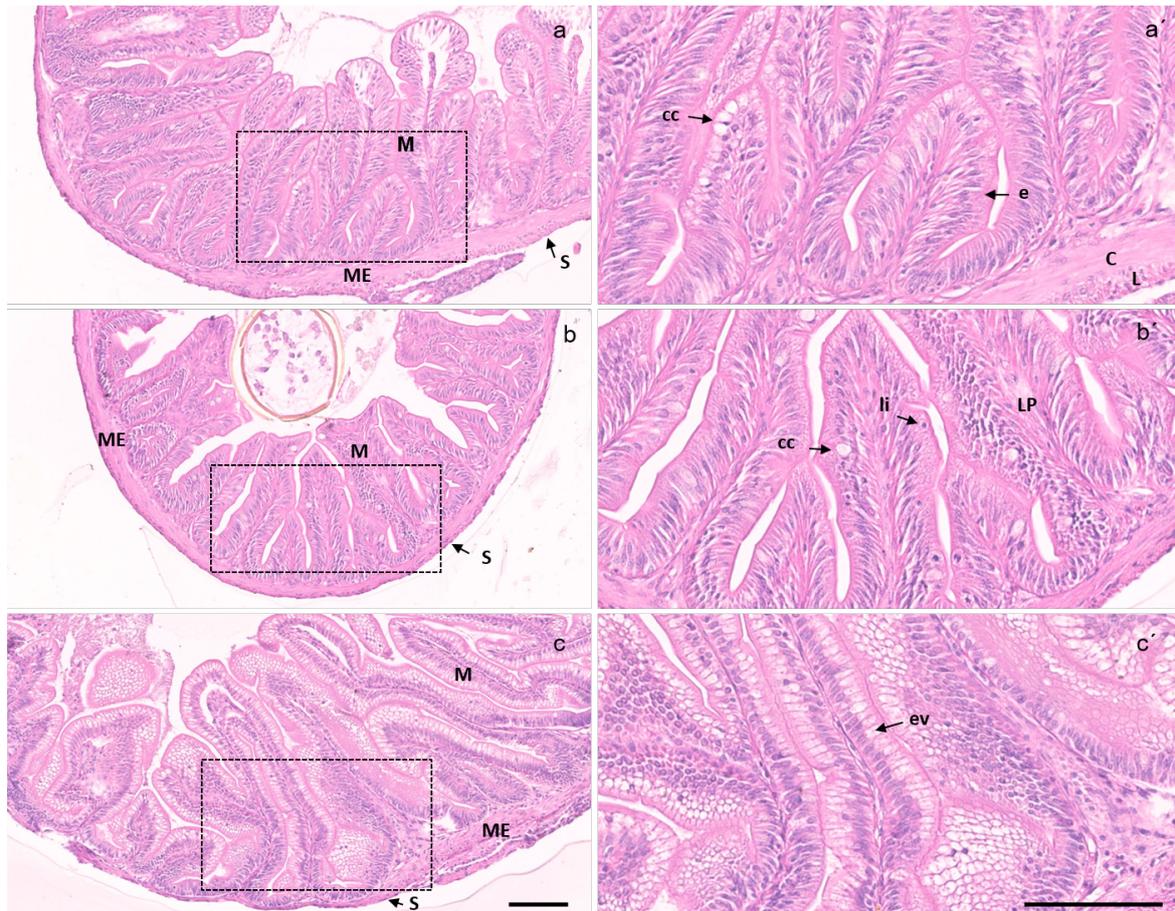


Figura. 2 Características histológicas del intestino adulto de *Nothobranchius furzeri*. Tinción de hematoxilina/eosina en cortes transversales del intestino anterior (a, a'), medio (b, b') y posterior (c, c'). Los paneles a'-c' corresponden a ampliaciones de las regiones rectangulares representadas en a-c. Los tres segmentos contienen tres capas de tejido: mucosa (M), muscularis externa (ME) y serosa (S). Las células caliciformes (cc) se intercalan entre los enterocitos (e). Los enterocitos del intestino posterior mostraron vacuolas supranucleares. Abreviaturas: C, capa de músculo liso circular; li, linfocito intraepitelial; L, capa de músculo liso longitudinal; LP, lámina propia; ev, enterocito vacuolado. Barras de escala: a-c=250 μ m; a'-c'= 100 μ m.

8.2 Análisis de marcadores histológicos de inflamación durante el envejecimiento

fisiológico

Para evaluar si el envejecimiento fisiológico de los peces se asocia a un estado inflamatorio intestinal crónico, se evaluaron marcadores histológicos habitualmente utilizados en peces y otros modelos vertebrados (11–13,15,17). Entre los parámetros analizados se incluyeron alteraciones en la arquitectura intestinal (grosor de la pared intestinal y de la lámina propia, y la arquitectura de las vellosidades) y cambios en el número de células (células productoras de mucus y linfocitos intraepiteliales).

8.2.1 Evaluación de alteraciones en la arquitectura tisular intestinal, asociadas a un estado inflamatorio crónico durante el envejecimiento de *Nothobranchius furzeri*

8.2.1.1 Medición del grosor de pared intestinal y de la lámina propia

Las mediciones del grosor de la pared intestinal y de la lámina propia se realizaron en cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina, según lo indicado en la Figura 3. La medición del grosor de pared intestinal reveló un aumento significativo en el intestino posterior en individuos de 16 semanas en comparación con individuos de 6 semanas (Figura 4a). Aunque se observó una tendencia al aumento del grosor de la pared intestinal en las porciones de intestino medio 2 y 3, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 4a). Por otra parte, el grosor de lámina propia no presentó cambios significativos entre los grupos analizados. A pesar de ello, se puede evidenciar una tendencia de aumento del grosor de la lámina propia en la región anterior y medias (1-3) en los animales viejos (Figura 4b).

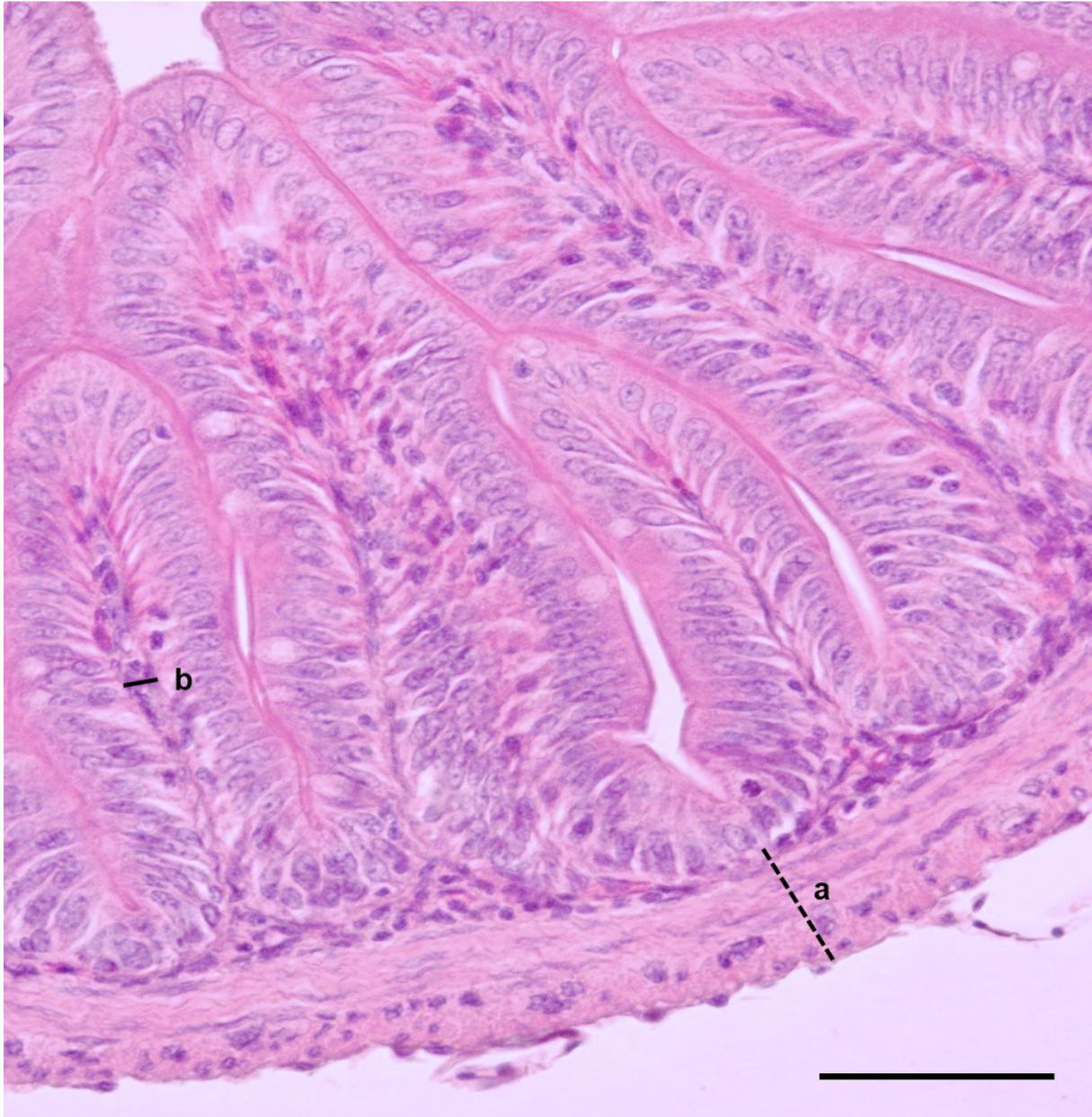
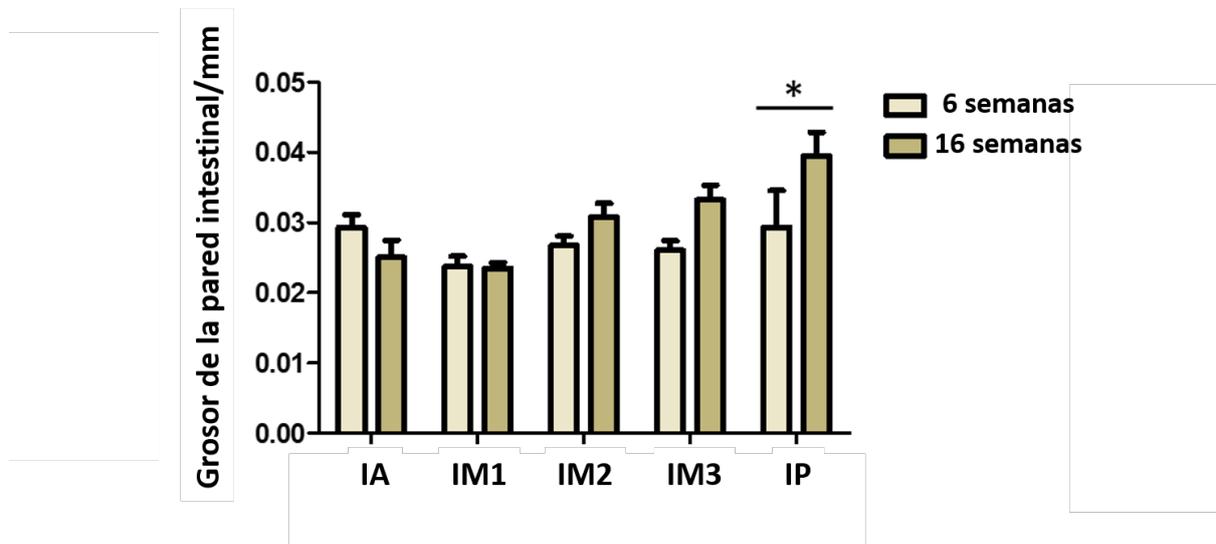


Figura 3. Imagen representativa de un corte transversal teñido con hematoxilina/eosina de intestino medio 1 de *Nothobranchius furzeri* de 6 semanas de edad, en donde se ejemplifica las regiones analizadas para realizar las mediciones del ancho de la pared intestinal (a) y el grosor de la lámina propia (b). Barra de escala: 50 μ m.

a



b

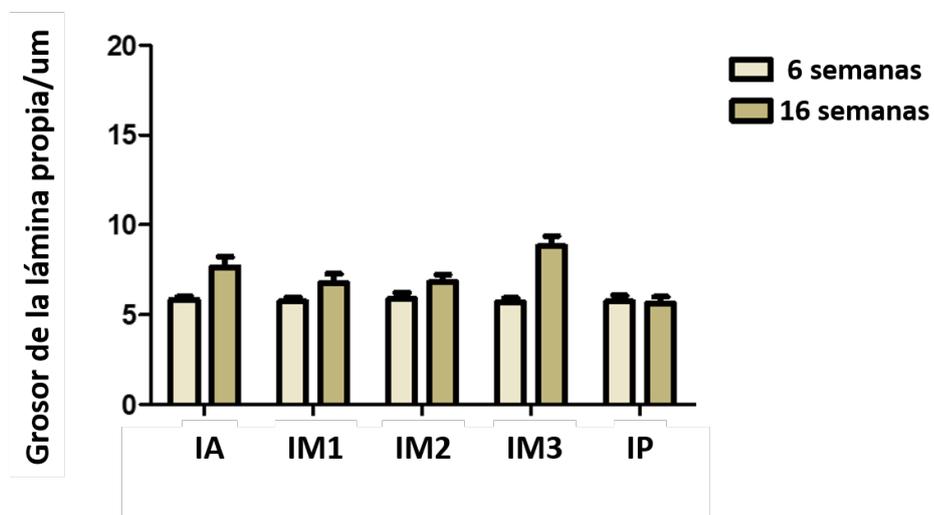


Figura 4. Medición del grosor de la pared intestinal y la lámina propia en *Nothobranchius furzeri*. (a) Se puede observar un aumento significativo del ancho de la pared intestinal en el

segmento posterior en individuos de 16 semanas de edad en comparación a individuos de 6 semanas. (b) No se observan cambios significativos en el grosor de la lámina propia. ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey (*: $p < 0,05$).

8.2.1.2 Observación de la arquitectura de las vellosidades

Las vellosidades de la mucosa intestinal de los *Nothobranchius furzeri* presentan alta variabilidad en su longitud dificultando el análisis de cambios en el tamaño durante el envejecimiento. Por ello, decidimos excluir este criterio en nuestro análisis. Por otro lado, no observamos alteraciones en la arquitectura de las vellosidades como erosiones o ulceraciones en los animales de mayor edad.

8.2.2 Análisis de cambios celulares asociados a un estado intestinal inflamatorio crónico

8.2.2.1 Análisis de las células caliciformes

Para el análisis de las células caliciformes se realizaron las tinciones de alcian blue (AB) y la reacción ácido peryódico de Schiff (PAS). La tinción AB a pH 2,5 permite demostrar de manera selectiva la presencia de mucinas ácidas de tipo sulfatadas y carboxiladas. La coloración celeste intensa demuestra la presencia de mucinas ácidas teñidas selectivamente. Por otra parte, la reacción de PAS es comúnmente utilizada para demostración de glucógeno, mucinas neutras, esfingomielina, coloide tiroideo, entre otros. El ácido peryódico utilizado en el protocolo oxida a los grupos 1,2 glicoles presentes en los tejidos para formar aldehídos, luego estos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff para formar un compuesto de color rosado turquesa. Por medio de estas marcaciones, pudimos identificar y discriminar entre células caliciformes productoras de mucinas ácidas y neutras (Figura 5). Adicionalmente en cortes teñidos con reacción PAS se logró identificar la membrana basal de las vellosidades que conforman el epitelio de revestimiento de la mucosa.

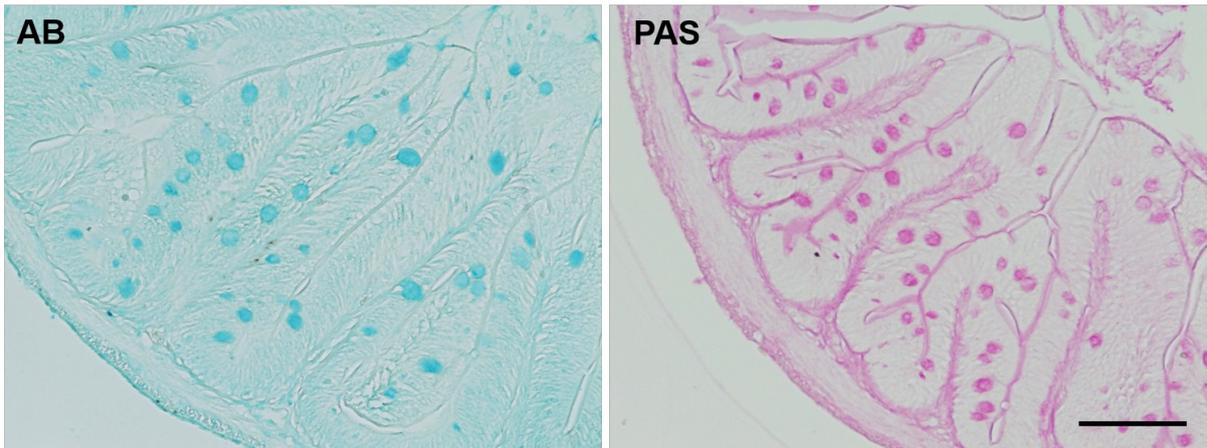
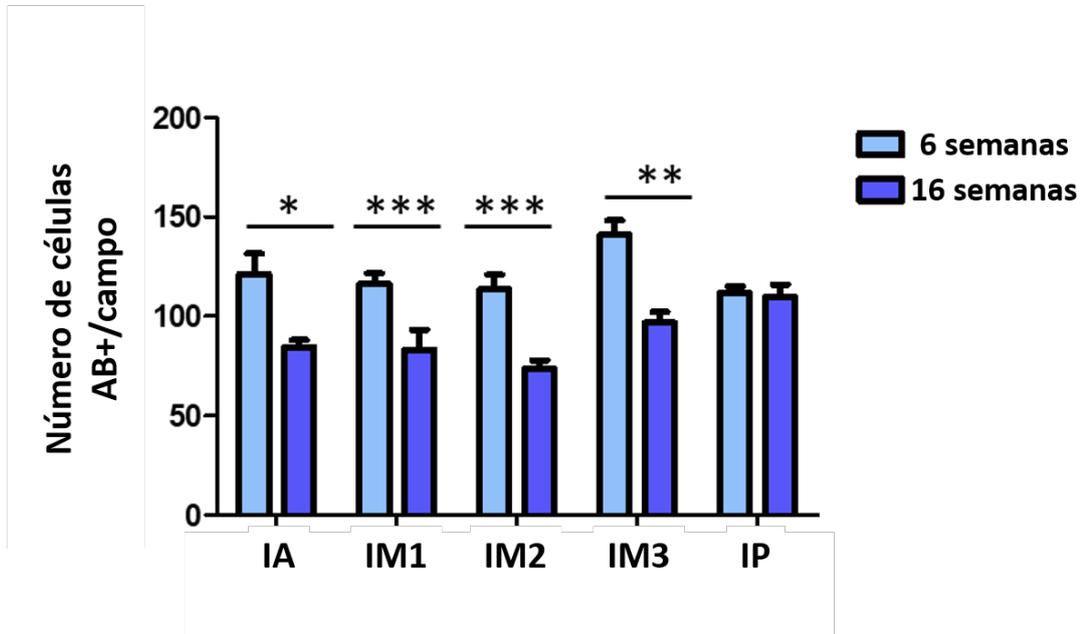


Figura 5. Foto representativa de las células caliciformes del intestino de *Nothobranchius furzeri*. Secciones transversales del intestino medio 1 teñidos con alcian blue (AB) y con la reacción de ácido peryódico de Schiff (PAS). Barra de escala: 100 μm .

El conteo de células caliciformes evidenció cambios en el número de células caliciformes productoras de mucinas ácidas (AB) asociados a la edad. En las secciones anterior y media se observó una disminución significativa de estas células en los animales de 16 semanas con respecto a los de 6 semanas (Figura 5a). Por otro lado, las células caliciformes productoras de mucinas neutras disminuyeron en los animales viejos solo en IA (Figura 5b).

a



b

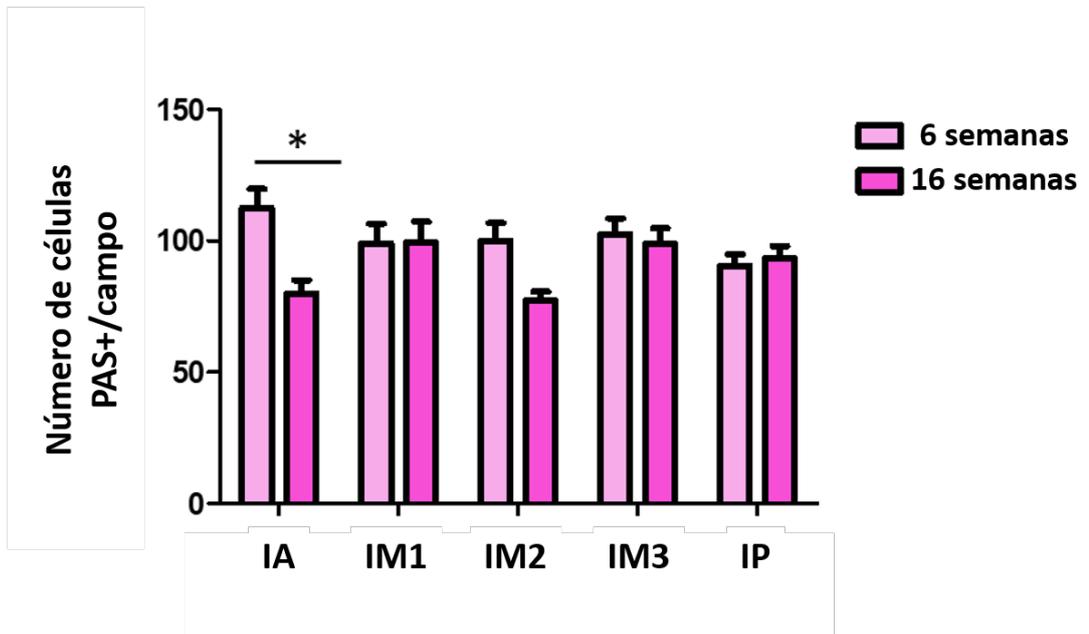


Figura 6. Cambios relacionados con la edad en el número de células caliciformes en *Nothobranchius furzeri*. (a) El número de células caliciformes AB positivas disminuyó en animales viejos (16 semanas) en comparación con animales jóvenes (6 semanas) en las secciones anterior y media del intestino. (b) Las células PAS positivas solo disminuyeron en la sección anterior de los animales viejos. ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Tamaño del campo: $0,312 \times 0,234$ mm.

8.2.2.2 Conteo del número de linfocitos intraepiteliales

Para la identificación de los linfocitos intraepiteliales se utilizó la tinción de hematoxilina/eosina. Esta tinción de rutina ofrece detalles citoplasmáticos y nucleares necesarios para realizar análisis histológicos de las muestras. Por medio de esta se pueden evaluar diferentes parámetros histológicos, desde arquitectura hasta detalles cromatínicos. Los linfocitos intraepiteliales se pueden identificar por su núcleo picnótico (cromatina condensada) y notorio halo citoplasmático (Figura 7). El análisis cuantitativo del número de linfocitos intraepiteliales no arrojó diferencias significativas entre los animales jóvenes y viejos en las regiones intestinales analizadas (*Nothobranchius furzeri* de 6 y 16 semanas) (Figura 8).



Figura 7. Tinción de hematoxilina/eosina en corte transversal de intestino medio de *Nothobranchius furzeri* de 6 semanas, 40x. Se observan vellosidades con arquitectura conservada, se identifica epitelio de revestimiento cilíndrico simple compuesto por células de núcleos ovales y basales, con cromatina laxa y citoplasma eosinófilo correspondientes a enterocitos (cabeza de flecha). Adicionalmente se observan células de citoplasma vacuolado u ópticamente vacío correspondientes a células caliciformes distribuidas a lo largo del espesor epitelial (asterisco). Se identifica la presencia de células con núcleos redondeados con

cromatina condensada y rodeados de halo citoplasmático de coloración difusa, correspondientes a linfocitos intraepiteliales (flechas). Escala: 20 μ m.

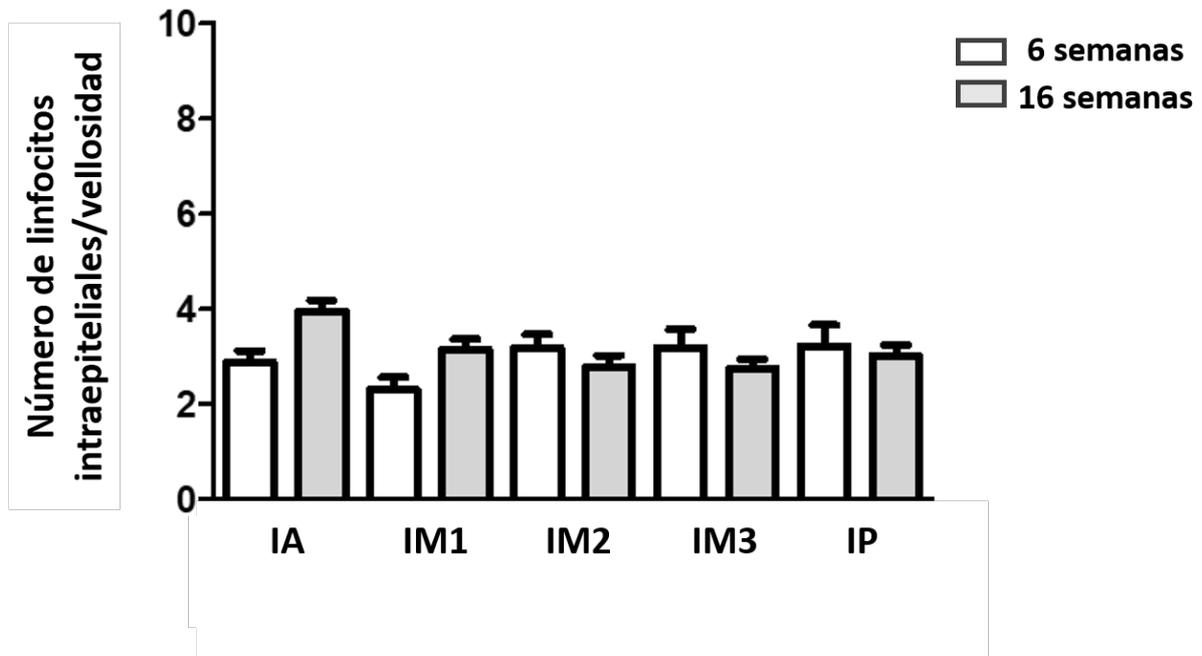


Figura 8. Cuantificación de linfocitos intra-epiteliales por vellosidad en *Nothobranchius furzeri*. No se registraron diferencias significativas en el número de linfocitos intraepiteliales entre ambos grupos etarios analizados. ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

9. Discusión

La inflamación es una respuesta de los tejidos vascularizados a las infecciones y al daño tisular que provee de células y moléculas de defensa del huésped desde la circulación a los lugares donde se necesitan para eliminar los agentes agresores. La inflamación puede ser de dos tipos, aguda y crónica. La respuesta inicial y rápida a las infecciones y daño tisular se

denomina inflamación aguda, ésta se desarrolla en minutos u horas y es de corta duración; puede durar varias horas o unos pocos días. Sus principales características son la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y la emigración de leucocitos, predominantemente neutrófilos (también llamados leucocitos polimorfonucleares). Las características morfológicas de las reacciones inflamatorias agudas son la dilatación de los vasos sanguíneos pequeños y la acumulación de leucocitos y líquido en el tejido extravascular. A diferencia de la inflamación aguda, la inflamación crónica se caracteriza por la infiltración de células mononucleares, que incluyen macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, destrucción tisular e intento de curación por sustitución del tejido dañado por tejido conjuntivo mediante angiogénesis, y en particular, fibrosis (18). La inflamación crónica se asocia a diferentes procesos patológicos como las EII, pero también ocurre durante el envejecimiento fisiológico. En el envejecimiento se alcanza un estado pro-inflamatorio crónico de bajo grado, el cual impacta sobre la morbilidad y mortalidad entre la población adulta mayor. Este desbalance de la respuesta inmune aumenta la susceptibilidad a infecciones y predispone al desarrollo de diferentes enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardíacas, artritis reumatoidea y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson. Los estímulos que conducen a un estado pro-inflamatorio crónico pueden originarse en diferentes órganos y tejidos. El intestino es un sitio de alta exposición a agentes externos y la microbiota intestinal sufre cambios durante el envejecimiento, lo cual induce la activación crónica de las células de la inmunidad innata produciendo una inflamación primariamente local y posteriormente sistémica. Dada la relevancia de la inflamación intestinal durante el envejecimiento sobre la salud de los adultos mayores, es necesario contar con modelos animales que puedan emular este estado fisiopatológico.

En el presente trabajo se evaluó si durante el envejecimiento fisiológico de *Nothobranchius furzeri* se alcanza un estado pro-inflamatorio intestinal. Como modelo de envejecimiento, estos peces ofrecen la oportunidad de estudiar diferentes enfermedades asociadas a la edad

y generar intervenciones que puedan prevenirlas o reducir la morbilidad que generan. Dado que la inflamación es un proceso común a todas estas enfermedades, contar con un modelo vertebrado versátil que permita realizar estudios longitudinales y de fácil trazabilidad, permitirá entender la patogénesis y factores que desencadenan el desbalance inmunológico que ocurre durante el envejecimiento. En nuestro laboratorio, recientemente caracterizamos el sistema gastrointestinal de los killifish turquesa y observamos que, a pesar de las características específicas de la especie, presentan una organización tisular conservada con los otros vertebrados y posee células epiteliales y neuronas mientéricas similares a los mamíferos.

En esta tesis de grado, y como primera aproximación para evaluar si durante el envejecimiento fisiológico de *Nothobranchius furzeri* se alcanza un estado pro-inflamatorio intestinal, se utilizaron diferentes criterios morfológicos/histológicos para evidenciar marcadores de inflamación. La selección de estos marcadores se realizó en base a aquellos habitualmente utilizados para pesquisar inflamación en diferentes vertebrados, incluidos los mamíferos y peces. Los criterios analizados fueron cambios en el número de células productoras de mucus, el número de linfocitos intraepiteliales, el grosor de la pared intestinal y de la lámina propia, y la arquitectura de las vellosidades.

Entre los resultados encontrados en nuestro trabajo, pudimos evidenciar una reducción del número de células caliciformes en los animales viejos, especialmente de aquellas productoras de mucinas ácidas. Las células caliciformes comprenden del 10% al 15% del epitelio intestinal (19) y son las encargadas de sintetizar glicoproteínas de mucina secretoras (MUC2) y moléculas bioactivas como mucinas unidas a la membrana epitelial (MUC1, MUC3, MUC17), péptidos del factor de trébol (TFF), molécula similar a la resistina β (RELM β) y proteína de unión a Fc- γ (Fcgbp) (19).

Las capas de moco intestinal secretadas por las células caliciformes consisten principalmente de una red compacta similar a una malla de mucina MUC2 viscosa, permeable y formadora de gel, que proporciona la primera línea de defensa del huésped contra los irritantes endógenos y exógenos y la unión e invasión microbiana, pero también permite el transporte de nutrientes (7). Diferentes autores señalan que las capas de moco intestinal juegan un papel clave en el establecimiento de la microbiota intestinal comensal y la protección contra la colonización e invasión de la microbiota patógena. La barrera mucosa defectuosa, conjuntamente con el desbalance de las bacterias comensales y una respuesta inmunitaria innata y adaptativa alterada dan como resultado inflamación y lesiones intestinales (20).

Cambios en el número de células caliciformes han sido previamente reportados en condiciones patológicas como en la EII y en modelos experimentales de colitis. En la CU, la capa mucosa está claramente comprometida con una franca reducción en su espesor, lo cual se ha relacionado con el agotamiento de las células caliciformes de la mucosa colorrectal afectada (21). Por otra parte, estudios recientes en modelos de colitis en ratones destacan la importancia del papel de la mucina en el mantenimiento de la integridad de las barreras mucosas protectoras cuya ruptura puede provocar colitis. Se informó recientemente que ratones deficientes en MUC2 sin células caliciformes morfológicamente identificables y sin expresión de MUC2 (pero que sí expresaron TFF3 y RELM β) en el intestino, tenían capas de moco marcadamente deficientes con mayor permeabilidad y mayor adhesión bacteriana a las superficies de las células de la mucosa. Estos ratones desarrollaron colitis espontánea y eran susceptibles a la colitis inducida por DSS (22,23). Además, se ha demostrado que la composición de mucina y su secreción están alteradas en pacientes con EII (20). Esta alteración puede deberse a mutaciones genéticas, cambios en el ARNm o bien, en los niveles de proteína y cambios en el grado de glicosilación, sulfatación o degradación de las mucinas (24). Otros estudios señalan que normalmente, las mucinas colónicas están muy sulfatadas y generalmente se consideran más resistentes a la degradación bacteriana. Una capa de

moco colónico compuesta de mucinas menos sulfatadas se considera menos protectora y esto se ha asociado con la EII en humanos (24–26). Esto por lo tanto añade un factor más que podría ser considerado como un factor etiológico en cuadros inflamatorios, sumándose a la lista que considera cambios en células caliciformes a niveles pre-transcripcionales (mutaciones en gen MUC2), transcriptómicos (problemas en ARNm), traduccionales (mal plegamiento de la proteína) y post traduccionales (problemas en la glicosilación y sulfatación). Adicionalmente otros estudios han demostrado que los cambios estructurales en las mucinas también juegan un papel muy importante en la génesis de las EII. Estos autores concluyeron que la mucina secretada es propensa a plegarse incorrectamente y/o ensamblarse aberrantemente, lo que provoca un estrés sustancial en el retículo endoplásmico y apoptosis prematura de las células caliciformes, lo que eventualmente conduce al desarrollo de inflamación intestinal crónica (23).

Por otro lado, en un estudio realizado en larvas de peces cebra expuestos a agentes enterocolíticos se observaron cambios en el número de las células caliciformes. Mientras que la exposición temprana a la oxazolona induce una reducción en el número de estas células, el TNBS causa un aumento (11–13). Diferencias en estas respuestas pueden asociarse a la duración del estímulo y etapa del desarrollo en el cual fueron aplicados. Por último, un estudio realizado con ratones de 10 semanas y 19 meses de edad en el que se investigó microbiota y los cambios en la expresión génica del huésped en asociación con el envejecimiento, mostró que en ratones de edad avanzada la capa de moco del colon se redujo aproximadamente 6 veces en relación con ratones jóvenes. Esto fue relacionado con una mayor apoptosis de células caliciformes, lo que fue demostrado por medio de tinción inmunohistoquímica anti caspasa 3, que arrojó tinción positiva en células caliciformes de las criptas colónicas de ratones de 19 meses. Estos hallazgos sugirieron que ratones viejos producirían menos moco secretado que ratones jóvenes debido a la disminución de células caliciformes. Finalmente, a partir de tinciones histoquímicas (PAS y AB) identificaron un

adelgazamiento de la capa de moco colónico en ratones de 19 meses en comparación a ratones de 10 semanas (17).

Considerando las evidencias previas, se puede inferir que el patrón identificado en la cuantificación de células caliciformes podría asociarse con una alteración de la barrera mucosa en el envejecimiento, la cual podría predisponer a un proceso inflamatorio ulterior y menor capacidad de hacer frente a potenciales patógenos. Los principales cambios fueron observados en las células caliciformes productoras de mucinas ácidas (AB), las cuales incluyen mucinas sulfatadas y carboxiladas. A partir de esto, surge la interrogante si la reducción de las células AB positivas fue una consecuencia de un aumento en la apoptosis de estas células, o una reducción en la producción de mucinas sulfatadas y/o carboxiladas. Entre las proyecciones de este trabajo, se utilizarán marcadores específicos para evidenciar apoptosis de las células caliciformes y una variante de la tinción de AB. A pH 1,0 los grupos sulfatos que forman parte de los glicosaminoglicanos (GAGs) se encuentran disociados, permitiendo que el colorante interactúe exclusivamente con los ésteres de sulfato. Esta tinción nos permitirá evidenciar si durante el envejecimiento de los *Nothobranchius furzeri* se produce una disminución de las mucinas sulfatadas como ocurre en los procesos inflamatorios crónicos intestinales.

Adicionalmente a los cambios en el número de células caliciformes y la producción de mucinas, los procesos inflamatorios crónicos y modelos experimentales de colitis, muestran alteraciones en la arquitectura de las vellosidades y cambios en el grosor de la lámina propia y de la pared intestinal, conjuntamente con infiltrado leucocitario. En humanos, la colitis crónica se asocia con una distorsión de la arquitectura tisular con erosión de las vellosidades, fibrosis de la lámina propia e infiltrado leucocitario (27). Asimismo, en modelos de colitis en pez cebra (oxazolona) se observa engrosamiento severo de la pared intestinal, desaparición

de la arquitectura del pliegue intestinal, e infiltración severa de eosinófilos y neutrófilos (11). Por otro lado, la exposición crónica de peces del género *Dicentrarchus labrax* a microplásticos nativos (MPV) y contaminados (MPI), induce un estado inflamatorio caracterizado por alteraciones estructurales como el ensanchamiento de la lámina propia, acortamiento e hinchazón de las vellosidades, destacando además edema evidente de las capas serosa, muscularis mucosa y submucosa/mucosa (17). Si bien, en nuestro trabajo no evidenciamos distorsión o erosiones de las vellosidades intestinales en los peces viejos, pudimos detectar cambios significativos en el grosor de la pared intestinal en el segmento posterior (IP). Asimismo, observamos una tendencia dependiente de la edad del engrosamiento de la lámina propia, aunque sin diferencias significativas. Estos resultados resultan coherentes considerando que durante cuadros inflamatorios es esperable observar un infiltrado de celulares inflamatorias y edema, causando el ensanchamiento de ambas estructuras. En nuestros análisis incluimos la evaluación del número de linfocitos intraepiteliales por medio de la tinción de H/E como marcador de infiltración leucocitaria. Nosotros no observamos diferencia en este parámetro entre ambos grupos etarios de peces. La identificación de linfocitos por técnicas estándares de tinción puede verse afectada en diferentes circunstancias, especialmente en aquellas en donde existen estados inflamatorios asociados a fibrosis, que dificultan la observación de estos tipos celulares. Por lo cual, los resultados obtenidos pueden no necesariamente reflejar la posible infiltración leucocitaria en los ejemplares viejos. Como proyección, utilizaremos técnicas más específicas y sensibles para poder identificar linfocitos a lo largo del tejido afectado, como la marcación inmunohistoquímica anti linfocitos T CD4+, la cual será complementada con tinciones tricrómicas para identificar si existen intentos de reparación con fibrosis.

10. Conclusiones

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados se puede sugerir que durante el envejecimiento fisiológico de *Nothobranchius furzeri* ocurren cambios morfológicos/histológicos que se asocian a un estado inflamatorio crónico leve. En este sentido, la disminución de las células caliciformes es característica de varios procesos inflamatorios persistentes en el sistema digestivo. Sin embargo resulta inevitable formular nuevas preguntas: ¿la disminución de las células caliciformes pueden debilitar la barrera mucosa favoreciendo al desarrollo de un estado inflamatorio crónico? o ¿la reducción en la producción de mucinas es el resultado de un agotamiento de estas células por un daño inflamatorio acumulativo? Es necesario complementar estos estudios con técnicas histoquímicas como alcian blue a pH 1,0 y 2,5, para caracterizar de manera completa si la disminución de las células caliciformes corresponde a una reducción en la producción de mucinas sulfatadas como ocurre en la EII o a una verdadera pérdida células caliciformes debido al daño que la inflamación persistente puede provocar.

En tanto, para el criterio histológico de grosor de pared intestinal y ancho de lámina propia, en el que evidenciamos una tendencia al engrosamiento de la pared intestinal (regiones medias y posterior) y un engrosamiento de lámina propia (región anterior y media) en individuos viejos, quedan por dilucidar si el efecto observado es el resultado de un componente inflamatorio circulante en la lámina propia y/o además, subyacen intentos reparativos del tejido mismo. Con respecto a los linfocitos intraepiteliales, la ausencia de diferencias entre los grupos etarios analizados puede deberse a las limitaciones de la técnica utilizada. Mediante las tinciones de rutinas es difícil identificar linfocitos entre las células epiteliales que recubren la mucosa. Por lo cual, es necesario utilizar técnicas inmunohistoquímicas lo que eventualmente ayudaría a conocer el tipo de infiltrado inflamatorio que ocurre durante envejecimiento fisiológico.

Finalmente, se destaca la relevancia de profundizar en estos hallazgos y complementar con estudios moleculares, tales como la medición de mediadores inflamatorios como histamina, serotonina, prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, citoquinas, pues éstos respaldarían y permitirían validar los hallazgos histológicos de inflamación intestinal evaluados a lo largo de esta investigación

11. Bibliografía

1. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. 2018. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. Vol. 14, *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group. p. 576–90.
2. Santoro A, Bientinesi E, Monti D. 2021. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? Vol. 71, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd.
3. Hall KE, Proctor DD, Fisher L, Rose S. 2005. American Gastroenterological Association future trends committee report: Effects of aging of the population on gastroenterology practice, education, and research. *Gastroenterology*;129(4):1305–38.
4. Sartor RB. 2008. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*;134(2):577–94.
5. Xavier RJ, Podolsky DK. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Vol. 448, *Nature*. p. 427–34.
6. Hanauer SB. 2006. Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. *Inflamm Bowel Dis*. 12 Suppl 1:S3-9.
7. Kim YS, Ho SB. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. Vol. 12, *Current Gastroenterology Reports*. p. 319–30.
8. O'mahony D, Leary PO', Quigley EMM. 2002. Aging and Intestinal Motility A Review of Factors that Affect Intestinal Motility in the Aged. *Drugs Aging*; 19(7):515-27.
9. Phillips RJ, Powley TL. 2007. Innervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. Vol. 136, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. p. 1–19.

10. Hanyang L, Xuanzhe L, Xuyang C, Yujia Q, Jiarong F, Jun S, et al. 2017. Application of zebrafish models in inflammatory bowel disease. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. Vol. 8, p. 501.
11. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. 2014. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. SUPPL.104).
12. Oehlers SH, Flores MV, Hall CJ, Crosier KE, Crosier PS. 2012. Retinoic acid suppresses intestinal mucus production and exacerbates experimental enterocolitis. *DMM Disease Models and Mechanisms*. 5(4):457–67.
13. Fleming A, Jankowski J, Goldsmith P. 2010. In vivo analysis of gut function and disease changes in a zebrafish larvae model of inflammatory bowel disease: A feasibility study. *Inflamm Bowel Dis*. 16(7):1162–72.
14. Brugman S, Liu KY, Lindenbergh-Kortleve D, Samsom JN, Furuta GT, Renshaw SA, et al. 2009. Oxazolone-Induced Enterocolitis in Zebrafish Depends on the Composition of the Intestinal Microbiota. *Gastroenterology*.137(5).
15. Oehlers SH, Flores MV, Hall CJ, Okuda KS, Sison JO, Crosier KE, et al. 2013. Chemically induced intestinal damage models in zebrafish larvae. *Zebrafish*.10(2):184–93.
16. Valdesalici S, Cellerino A. 2003. Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2:270.
17. Pedà C, Caccamo L, Fossi MC, Gai F, Andaloro F, Genovese L, et al. 2016. Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution*. 212:251–6.
18. Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. 2017. *Robbins Basic Pathology* (10th ed.). Elsevier - Health Sciences Division.
19. Hohman LS, Osborne LC. 2022. A gut-centric view of aging: Do intestinal epithelial cells contribute to age-associated microbiota changes, inflammaging, and immunosenescence? *Aging Cell*. Vol. 21(9):e13700.
20. Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K. 2009. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity*. S. Karger AG. Vol. 1, p. 123–35.

21. Corfield AP, Myerscough N, Longman R et al. 2000. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut*. 47:589–94.
22. Johansson ME V, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC, et al. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30;105(39):15064-9.
23. Einerhand AWC, Renes IB, Makkink MK, Van Der Sluis M, Bü Ller HA, Dekker J. 2002. Role of mucins in inflammatory bowel disease: important lessons from experimental models The tripartite cause of IBD: involvement of mucins. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. Lippincott Williams & Wilkins, Vol. 14(7):757-65.
24. Van Klinken BJW, Van Der Wal JWG, Einerhand A, Büller HA, Dekker J. 1999. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut*.44(3):387–93.
25. Tytgat KMAJ, Buller HA, Opdam FJM, Kim YS, Einerhand AWC, Dekker J. 1994. Biosynthesis of Human Colonic Mucin: Muc2 Is the Prominent Secretory Mucin. *Gastroenterology*. 107(5):1352-63.
26. Tsai HH, Dwarakanath AD, Hart CA, Milton JD, Rhodes JM. 1995. Increased faecal mucin sulphatase activity in ulcerative colitis: A potential target for treatment. *Gut*. 36(4):570–6.
27. Carrasco-Avino G. 2019. Histology of Inflammatory Bowel Disease. *Revista Medica Clinica Las Condes*. Ediciones Doyma, S.L.; Vol. 30, p. 283–98.

12. Anexos



Santiago, 30 de junio de 2020

Certificado N°: 20385-MED-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA 1135 FMUCH**, del Proyecto de Investigación titulado **"Nothobranchiusfurzeri como modelo de estudio para enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento"**, de la Investigadora Responsable, **Dra. Janina Borgonovo**, Postdoctorante, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, BNI, Center for Geroscience, Brain Health and Metabolism (GERO), y cuyo Académico Patrocinante es el **Dr. Miguel Concha N.**, Profesor Titular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, BNI, Center for Geroscience, Brain Health and Metabolism (GERO), no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales. Así mismo, la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los Investigadores se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **420 Nothobranchiusfurzeri GRZ y Nothobranchiusfurzeri ZM21001** (330 ejemplares adultos y 90 larvas), provenientes de Leibniz Institute on Aging (Jena, Germany) e Institute of Vertebrate Biology (Brno, Czech Republic) desde **junio de 2020 a marzo de 2025**, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por Proyecto FONDAF N° **15150012**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los Investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.


Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile




Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile

<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>
email: coordinador.cicua@uchile.cl