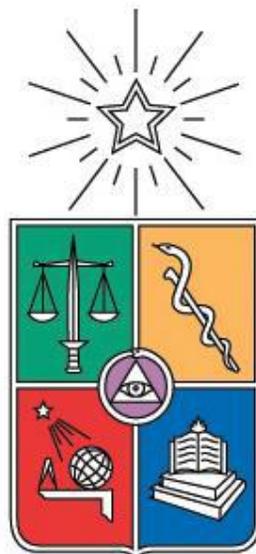


UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica
TESIS PROFESIONAL



***Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico***

*"Expresión de los receptores ErbBs en hígado y tejido adiposo de ratones normopeso
y obesos"*

Alumno: Katherine Escobedo

Tutor: Nevenka Juretić

Co tutor: Gladys Tapia

Una firma manuscrita en tinta que parece decir "Nevenka Juretić".

Firma tutor

Firma co-tutor

2019

TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en

Morfofisiopatología y Citodiagnóstico

***"Expresión de los receptores ErbBs en hígado y tejido adiposo de ratones normopeso
y obesos"***

Alumno: Katherine Escobedo

Tutoras:

Nevenka Juretić

Gladys Tapia Opazo

AGRADECIMIENTOS

Nevenka Juretić, Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Proyecto Puente-ICBM 2018/02.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
Obesidad.....	5
Neuregulinas.....	5
Receptores de Neuregulina (ErbBs).....	6
Función de la vía de Neuregulina/receptores ErbBs en músculo.....	8
Efectos de Neuregulina en tejido adiposo. Rol en Obesidad.....	9
Función de la vía de Neuregulina/receptores ErbBs en hígado. Rol en obesidad.....	10
Expresión de receptores ErbBs en tejido adiposo e hígado.....	10
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Modelo experimental.....	13
Extracción de RNA.....	13
Síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA.....	14
Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR).....	14
Procesamiento de tejido hepático.....	16
Histología convencional.....	16
Inmunohistoquímica para ErbB2, 3 y 4.....	17
Análisis estadísticos.....	17
RESULTADOS	19
Análisis histológico de muestras hepáticas.....	19
Expresión de receptores ErbBs en hígado mediante inmunohistoquímica.....	20
Expresión de receptores ErbBs en hígado y tejido adiposo mediante niveles de mRNA.....	24
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIÓN	32
REFERENCIAS	33
ANEXO	34
Certificado de aprobación del Comité de Bioética sobre Investigación en Animales.....	36

RESUMEN

Introducción: La obesidad es considerada una epidemia a nivel nacional y mundial. Diferentes estudios relacionan las alteraciones metabólicas de la obesidad con desbalances en los niveles de distintas isoformas de neuregulina (NRG 1 a la 4). Las NRGs son mioquinas que se unen a los receptores denominados ErbBs (2, 3 y 4), que se expresan en una amplia variedad de tejidos. En hígado y tejido adiposo el aumento de NRG tendría efectos protectores ante la obesidad. Sin embargo, aún se desconoce si existen cambios en la expresión de los receptores ErbBs en estos órganos, en ratones obesos comparado con los normopeso.

Objetivo: Evaluar la expresión de los receptores ErbB2, 3 y 4 en hígado y tejido adiposo de ratones obesos y normopeso.

Diseño experimental: Se utilizaron ratones machos C57BL/6J, con peso inicial de 12-14 g., alimentados por 12 semanas con dieta control (DC) o dieta alta en grasa (DAG). Se conformaron dos grupos experimentales (n= 6/grupo): DC (10% lípidos, 20% proteínas, 70% carbohidratos) y DAG (60% lípidos, 20% proteínas, 20% carbohidratos).

Materiales y Métodos: Se evaluó la expresión de los receptores ErbB2, 3 y 4 en hígado y tejido adiposo (qPCR) y niveles hepáticos de ErbB2, 3 y 4 (inmunohistoquímica).

Resultados: Los niveles de mRNA de los receptores ErbB2 y 3 en hígado, y ErbB2, 3 y 4 en tejido adiposo disminuyeron significativamente en el grupo DAG respecto al grupo DC. Los niveles proteicos de ErbB2 y 3 en hígado disminuyeron significativamente en el grupo DAG respecto al grupo DC.

Conclusiones: La obesidad inducida por DAG, se acompaña de disminución significativa de los niveles de mRNA y de los niveles proteicos de los receptores ErbB2 y 3 en hígado y de los niveles de mRNA de los receptores ErbB2, 3 y 4 en tejido adiposo. Los cambios en la expresión de estos receptores en ratones obesos podrían estar asociados a alteraciones en la vía de NRG/ErbBs, lo cual permitiría estudiar su implicancia en trastornos metabólicos relacionados con la obesidad; para lo cual se requiere estudiar previamente las vías de señalización.

INTRODUCCIÓN

1.-Obesidad.

La obesidad es una enfermedad compleja y multifactorial que hoy en día es considerada una epidemia debido a su crecimiento explosivo y a la gran población mundial que afecta¹. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), desde 1975 esta patología se ha triplicado en todo el mundo. Además, datos obtenidos en el año 2016 señalan que más de 650 millones de adultos, de 18 años o más, presentaron obesidad². En Chile, más del 70% de la población posee sobrepeso u obesidad, y en el caso de esta última condición, se le atribuye 1 de cada 11 muertes en nuestro país³. La obesidad se considera un estado de inflamación y de estrés oxidativo crónico y de bajo nivel⁴, que se caracteriza por una acumulación excesiva de tejido adiposo, principalmente tejido adiposo visceral, el cual puede ser perjudicial para la salud, y que ha sido asociado a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares¹.

2.- Neuregulinas.

Las Neuregulinas (NRGs) son una familia de proteínas de señalización que median una gran cantidad de funciones celulares, que incluyen la supervivencia, la proliferación, la motilidad, la angiogénesis y la diferenciación en los sistemas neuronales y no neuronales⁵. Las NRGs son consideradas mioquinas, ya que se sintetizan y secretan principalmente en el músculo⁶, pero también se ha descrito que pueden ser sintetizadas por el hígado y el tejido adiposo^{7,8}.

Se han descrito cuatro genes que codifican para NRG (1 al 4); estas variantes presentan más de 30 isoformas que resultan del splicing alternativo del gen NRG⁵.

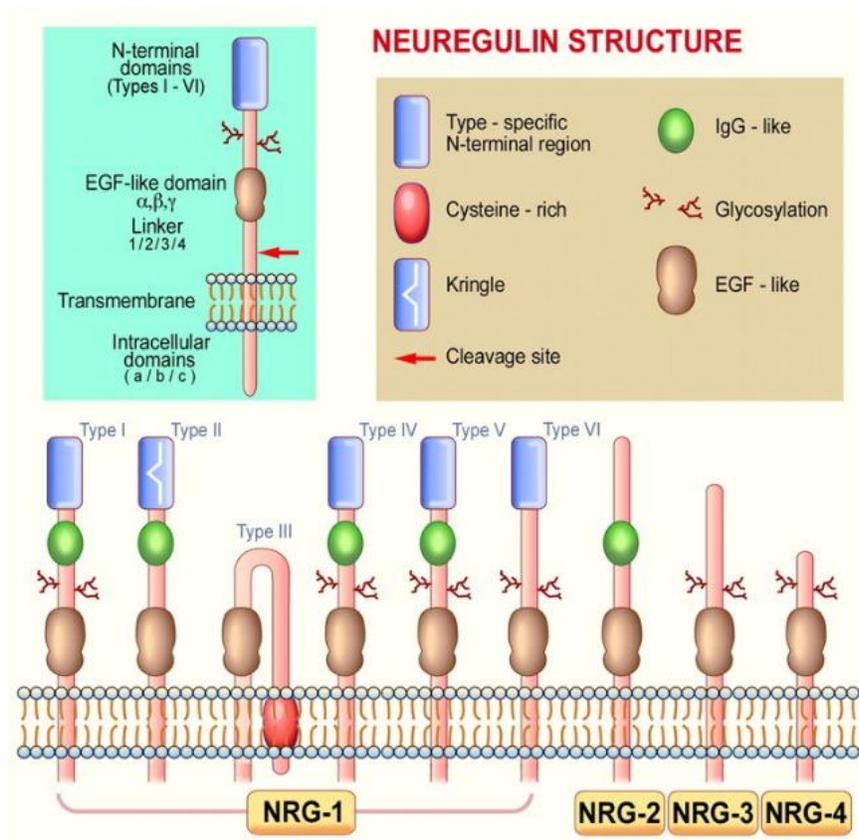


Figura 1. Estructura de las distintas isoformas de Neuregulina (NRG)⁶.

La isoforma más estudiada es NRG1 (Figura 1), la cual juega un rol muy importante en varios órganos, tales como el corazón, el músculo esquelético y el hígado, así como también en el sistema nervioso⁵. En tanto, se ha descrito que NRG4 es una isoforma que se expresa y sintetiza mayormente en el tejido adiposo, por lo que se considera una adipocina que, además, está involucrada en la homeostasis metabólica sistémica⁸.

3.- Receptores de Neuregulina (ErbBs).

Todas las isoformas de NRG poseen un dominio de tipo factor de crecimiento epidermal (EGF), el cual permite la unión a receptores específicos denominados ErbBs, que se expresan en una amplia variedad de tejidos y regulan diversos procesos tales como la apoptosis, la diferenciación, el desarrollo y la progresión del ciclo celular⁶.

La familia de receptores ErbBs comprende cuatro miembros: ErbB1 (también llamado HER1 o EGFR), ErbB2 (HER2 o NEU), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4) (Figura 2).

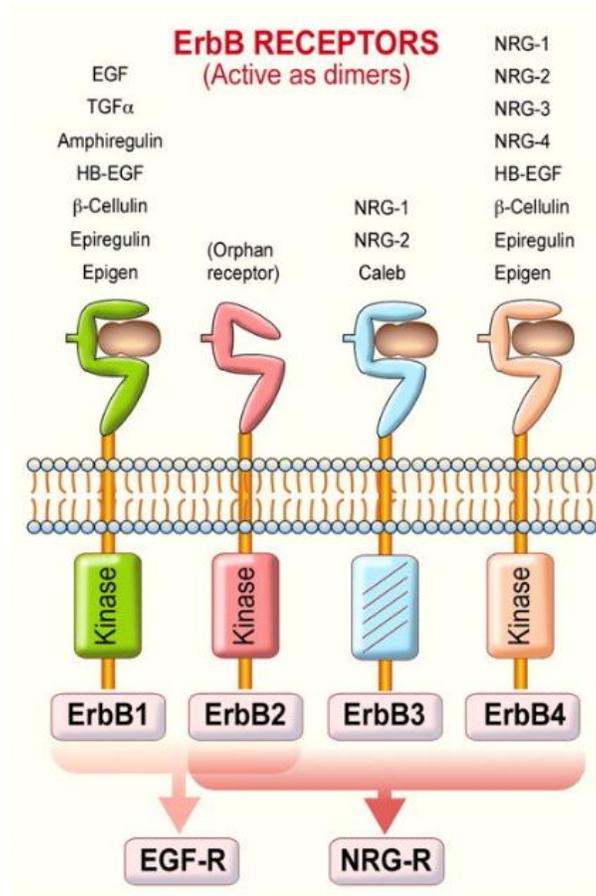


Figura 2. Estructura de los receptores ErbBs y sus ligandos específicos⁶.

Como se muestra en la Figura 2, de todos estos receptores, ErbB1 no reconoce a NRG, pero sí otros ligandos; ErbB2 carece de un dominio de unión a ligando, pero posee un dominio citosólico tirosina quinasa catalíticamente activo, y el receptor ErbB3 reconoce a NRG, pero carece de actividad tirosina quinasa. Sólo el receptor ErbB4 posee tanto la capacidad de unión a NRG como la actividad tirosina quinasa, por lo que puede activarse como homo o heterodímero. Los otros receptores deben necesariamente heterodimerizar para complementarse y ser funcionales para la vía activada por NRG⁶.

La unión de NRG a los receptores ErbBs, desencadena una serie de eventos de señalización río abajo, activándose principalmente las vías de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y MAP quinasa (MAPK), generando efectos autocrinos, paracrinos y yuxtacrinos dependiendo del tipo de órgano⁶.

4.- Función de la vía de Neuregulina/receptores ErbBs en músculo.

El músculo esquelético es uno de los órganos más importante para la homeostasis de la glucosa en hiperglicemia, ya que es el responsable de la captación y catabolismo de la glucosa estimulada por la insulina⁹.

Estudios realizados en músculo esquelético de ratas Wistar señalan que la contracción muscular induce la liberación de NRG1, la cual por medio de señalización autocrina activa al heterodímero ErbB2-ErbB4, provocando la inducción de la translocación del transportador de glucosa-4 (GLUT-4) a la membrana plasmática, proceso importante para la captación de glucosa en las células musculares⁹. Por lo tanto, estos estudios conectan la vía de NRG/receptores ErbBs con la homeostasis de la glucosa, postulando que esta vía de señalización tiene un efecto relevante en la regulación del metabolismo muscular⁹.

Más aún, estudios realizados en el músculo esquelético de ratas obesas señalan que el entrenamiento con ejercicios de resistencia de baja intensidad, combinado con un cambio a dieta control, activan la vía de NRG1/ErbB4 mediante el aumento de expresión y actividad de una metaloproteasa denominada ADAM17¹⁰. Esta metaloproteasa provoca el corte proteolítico de NRG1 de transmembrana, lo que permite la liberación del dominio catalíticamente activo de NRG1, que se une al receptor⁶. Este estudio además postula que los efectos beneficiosos de la actividad física y dieta en ratas obesas, podría ser explicada en parte por la activación de la vía de señalización de NRG1/ErbB4¹⁰.

5.- Efectos de Neuregulina en tejido adiposo. Rol en Obesidad.

El tejido adiposo es el órgano endocrino más grande involucrado en el metabolismo. Está encargado del almacenamiento de los lípidos, por lo que su disfunción está directamente relacionada con la obesidad¹¹.

El tejido adiposo pardo actúa como una fuente de factores endocrinos que modulan el metabolismo energético sistémico. En relación con esto, se ha descrito que NRG4 es una adipoquina que se expresa altamente en grasa parda¹².

En un estudio realizado en ratones knockout para NRG4 se observó una reducción de la angiogénesis, tanto en tejido adiposo blanco como en tejido adiposo pardo. Además, estos ratones presentaron un fenotipo obeso, junto con una disminución de la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa¹³.

De igual manera, estudios realizados en ratones obesos por DAG han descrito una disminución de NRG4 en el tejido adiposo blanco, comparado con ratones normopeso¹⁴. Además, se demostró que la transferencia de un plásmido con el gen NRG4, a ratones de 8 semanas de edad, generó un efecto protector ante la obesidad inducida por la dieta. Estos ratones, luego de 9 semanas, presentaron un peso corporal significativamente menor (10 gr) que el de los animales controles¹⁴.

Por otra parte, análisis realizados en individuos obesos, muestran que aquellos sujetos con los niveles plasmáticos más bajos de NRG4, presentaban niveles de índice de masa corporal (IMC), circunferencia de la cintura y masa corporal grasa significativamente mayores, comparado con los individuos que tenían niveles más altos de NRG4. También la prevalencia de aumento de la glucosa en ayunas y la presión arterial fue significativamente mayor en los individuos con niveles más bajos de NRG4, que en aquellos con valores plasmáticos de NRG4 más elevados, asociando a NRG4 con el metabolismo de la glucosa¹⁵.

6.- Función de la vía de Neuregulina/receptores ErbBs en hígado. Rol en obesidad.

El hígado es el órgano encargado de almacenar y producir glucosa, por lo que es uno de los principales órganos involucrados en la homeostasis de la glucosa, la cual depende principalmente del equilibrio entre su producción y consumo¹⁶.

Estudios realizados en hígados de ratas Wistar adultas han descrito que la administración aguda de NRG1 aumenta significativamente la tasa de fosforilación del receptor ErbB3 y de la proteína quinasa AKT. La activación de esta vía de señalización tendría un efecto de disminución de la glucosa en el hígado, mediante la inhibición de la expresión de los genes que codifican las enzimas gluconeogénicas¹⁶.

En modelos de ratón transgénico para NRG4, en los que se provocó una sobreexpresión de NRG4, se demostró una reducción significativa en los niveles de glucosa e insulina en el plasma, en comparación a ratones silvestres, luego de una alimentación con una DAG. Estos ratones transgénicos también presentaron una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. Junto con esto, se observó una disminución significativa de la esteatosis hepática, determinado mediante el análisis histológico y la medición del contenido lipídico¹².

Por otra parte, se ha descrito que la deficiencia de NRG4 inhibe la señalización de los receptores ErbB3-ErbB4, lo que conduce a un aumento de la lipogénesis hepática y predispone a los ratones a la esteatosis hepática inducida por la dieta¹². Asimismo, en un estudio realizado con pacientes que presentan enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se observaron niveles reducidos de NRG4 plasmáticos, sugiriendo que la baja de NRG4 estaría contribuyendo a la patogénesis de EHGNA¹⁷.

7.- Expresión de receptores ErbBs en tejido adiposo e hígado.

Hasta la fecha no hay publicaciones que describan los niveles de expresión de los receptores ErbBs en hígado y en tejido adiposo, a pesar de las importantes funciones descritas para la vía de NRG/receptores ErbBs en condiciones fisiológicas y de obesidad. Los estudios sólo se

han centrado en describir los niveles y efectos de NRG (NRG1 y 4 en hígado, y NRG4 en tejido adiposo), ligandos de estos receptores, en distintos modelos. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue evaluar la expresión de los receptores ErbB2, 3 y 4 tanto en hígado como en tejido adiposo de ratones obesos y normopeso.

Los antecedentes de la literatura indican que un aumento de la expresión de NRG1 en hígado sería beneficioso para disminuir la obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas a ella, lo que podría estar asociado a una mayor expresión de los receptores ErbBs en este órgano^{12,16}.

Por otro lado, en tejido adiposo, un aumento en la expresión de NRG4 estaría ligado a un rol protector ante la obesidad^{7, 8}. Sin embargo, no se conocen los mecanismos por los cuales NRG4 estaría cumpliendo este papel, lo que hace aún más interesante el estudio de la expresión de los receptores ErbBs en este tejido.

HIPÓTESIS

Los ratones obesos presentan una mayor expresión de los receptores ErbB2, 3 y 4 respecto a aquellos normopeso, tanto en tejido adiposo como hepático.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la expresión génica de los receptores ErbB2, 3 y 4 en hígado y tejido adiposo, y caracterizar su localización en cortes de hígado, en modelo murino en condiciones de normopeso y obesidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Evaluar el nivel de expresión de los mRNA de los receptores ErbB2, 3 y 4 en muestras de tejido hepático y adiposo en ratones normopeso y obesos, mediante qPCR.
- 2.- Evaluar el nivel de expresión proteico de estos receptores en muestras de tejido hepático en ratones normopeso y obesos, mediante inmunohistoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo experimental

Se utilizaron muestras guardadas a -80 °C de tejido hepático y grasa visceral extraídas de ratones machos de la cepa C57BL/6J (Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile), los cuales fueron mantenidos en condiciones de temperatura controlada con acceso libre a agua y alimentación en ciclos de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad. Los protocolos de manejo y cuidado de animales experimentales fueron aprobados por el comité de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Autorización Bioética: CBA #0639, FMUCH).

Cuando los animales alcanzaron un peso corporal de 12 a 14 g (20 días después del destete), fueron divididos aleatoriamente en dos grupos:

- a) Grupo dieta control (DC), dieta que contiene 10% de grasa, 20% de proteína y 70% de carbohidratos (Research Diets INC D12450B, USA).
- b) Grupo sometido a dieta alta en grasa (DAG), alimentado con una dieta de 60% de grasa, 20% de proteínas y 20% de carbohidratos (Research Diets INC D12492, USA).

Los animales fueron alimentados en estas condiciones por 12 semanas. Al finalizar este período, los animales se sometieron a ayuno por 6-8 horas antes de ser anestesiados en forma intraperitoneal con Zoletil (Tiletamina hidrocloreto y Zolacepam hidrocloreto, 20-40 mg Kg⁻¹). Las muestras de tejido hepático y adiposo fueron congeladas con nitrógeno líquido y luego almacenadas a -80°C.

Extracción de RNA

Para extraer el RNA de las muestras congeladas de hígado y adiposo se utilizó el método fenol/cloroformo seguido por purificación por columnas utilizando el kit E.Z.N.A. total RNA (Omega Bio-tek Inc., Austin TX, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para

cuantificar el RNA obtenido en la extracción, se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. Para la síntesis de cDNA sólo se utilizaron las muestras que presentaron una relación RNA/proteínas (260nm/280nm) mayor a 1,6. La concentración de RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en la muestra se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{Abs. 260 nm} * \text{factor de dilución (500)} * 40}{1000}$$

Síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA

Se utilizó el protocolo incluido en el kit para RT-PCR de la enzima SuperScript II (Invitrogen). Para ello, una mezcla compuesta por 1 μg de RNA total, 1 μL dNTP 10 mM y 1 μL oligodT 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen final de 10 μl , fue incubada durante 5 min a 65°C y luego puesta en hielo por al menos un minuto. Posteriormente, se agregó una segunda mezcla que contenía 4 μL Buffer 5x First, 2 μL DTT 0,1 M, 0,25 μL RNAsin, 0,25 μL de transcriptasa reversa SuperScript II y 3,5 μL H₂O sin nucleasas. La síntesis del cDNA se realizó incubando el sistema a 42°C por 50 min y luego a 70°C por 15 min. Además, se utilizó como control un tubo -RT que contenía todos los reactivos excepto la enzima. El cDNA se guardó a -20°C.

Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)

El PCR cuantitativo para las muestras de cDNA de tejido hepático y adiposo se realizó en duplicado para cada muestra, utilizando una concentración óptima de partidores estandarizados en el laboratorio de 5 μM . Como control, se utilizaron 2 genes constitutivos: Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y β -actina.

Tabla 1.- Secuencia de los partidores utilizados

Partidor	Secuencia
ErbB-2	Sentido 5'-GCTGCCCGAAACGTGCTA-3'
	Antisentido 5'-CCGTGCCAGCCCGAA-3'
ErbB-3	Sentido 5'-AGGCTTGTCTGGATTCTGTGGTT-3'
	Antisentido 5'-GGGATCGGGTG CAGAGAGA-3'
ErbB-4	Sentido 5'-GGAGGCTGCTCAGGACCAA -3'
	Antisentido 5'-ACGCAGGCTCCACTGTCAT-3'
GAPDH	Sentido 5'-TCCGCCCTTCCGCTGATG-3'
	Antisentido 5'-CACGGAAGGCCATGCCAGTGA-3'
β -actina	Sentido 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC -3'
	Antisentido 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'

El qPCR se realizó en un Termociclador *Stratagene Mx3000p QPCR System* (Agilent Technologies), utilizando el reactivo EvaGreen (5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus, Solis Biodyne) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello, se preparó una mezcla compuesta por 2 μ L partidores 5uM (mezcla de partidor sentido y antisentido), 7 μ L H₂O sin nucleasas y 10 μ L Mix PCR 2X. A cada tubo se agregó 19 μ L de esta mezcla y 1 μ L del cDNA correspondiente. Se incluyó como control un blanco, que contenía todos los reactivos excepto el cDNA de una de las muestras.

La amplificación por PCR se mantuvo en la fase exponencial para cada producto. Las condiciones del PCR para todos los partidores fueron: un ciclo de 95°C durante 15 min,

seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 seg, 60°C durante 20 seg, 72°C durante 20 seg y un ciclo final de 95°C durante 1 min, 55°C durante 30 seg y 95°C durante 30 seg.

Para la cuantificación del cDNA tanto de los genes de interés como de los genes constitutivos, se utilizó el programa *Mxpro Software* (Comparative quantification) de Stratagene. El análisis de los resultados se realizó a través del algoritmo Delta-Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Procesamiento de tejido hepático

Las muestras provenientes del lóbulo izquierdo hepático una vez extraídas fueron fijadas inmediatamente en formalina 4% p/v tamponada en buffer fosfato (0,1M; pH 7,4) por 24 h a 4°C, luego se sometieron a un lavado por una hora en agua corriente “corriendo”, para después continuar con la deshidratación en etanoles de graduación ascendente (70°,80°,95°, 100°,100°,100°) por 35 min cada uno, seguido por dos pasos por xilol por 35 min cada uno. Posteriormente, se realizó la impregnación a 60°C en tres cambios de parafina por 45 min cada uno, incluyendo el tejido finalmente en bloques de parafina destinados para histología e inmunohistoquímica.

Histología convencional

Se realizó el análisis morfológico del tejido hepático a partir del bloque de parafina en cortes en micrótomo de 3 µm de grosor, los cortes fueron adheridos en portaobjetos limpios y secados a 60°C durante 1 h. La desparafinación de los cortes se realizó en dos cambios de xilol por 10 min, rehidratación en etanoles de graduación descendente (100°, 100°, 95°, 70° por 5 min c/u) hasta llegar a agua destilada, tinción nuclear con hematoxilina de Mayer (5 min), viraje en agua corriente (10 min), lavado rápido en agua destilada, tinción con eosina (30 seg), lavado muy breve en agua destilada, rápida deshidratación en etanol de 95°,100°,100° (1 min c/u) seguido de dos pasos por xilol (10 min c/u) para finalmente montar con Entellán.

Inmunohistoquímica para ErbB2, 3 y 4

La inmunohistoquímica para ErbBs se realizó utilizando cortes en micrótopo a un grosor de 3 μm siguiendo el protocolo mencionado anteriormente hasta la rehidratación, seguido del proceso de recuperación antigénica en buffer citrato a pH 6.1 (10mM de citrato de sodio, 0,05% Tween-20) por 30 min a 95°C en vaporera, la peroxidasa endógena se bloqueó con solución de peróxido de hidrógeno al 3% por 15 min a temperatura ambiente, seguido del bloqueo de uniones inespecíficas utilizando suero normal de caballo 2,5% del kit ImmPRESS™ HRP Anti-Rabbit IgG (Vector) por 20 min. Como anticuerpos primarios se utilizaron los anticuerpos anti-ErbB2 (C-18: sc-284, Santa Cruz Biotechnology, INC.) y anti-ErbB4 (C-18: sc-283, Santa Cruz Biotechnology, INC.) en una dilución de 1:100 en PBS/BSA 2,5% y anti-ErbB3 (C-17:sc-285, Santa Cruz Biotechnology, INC.) en una dilución de 1:50 en PBS/BSA 2,5% durante toda la noche a 4°C, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa del kit ImmPRESS™ HRP Anti-Rabbit IgG según instrucciones del fabricante. Para el revelando se utilizó el kit impactDAB (Vector) basado en 3,3-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Luego del revelado con DAB, se realizó el contraste nuclear de las muestras con hematoxilina de Mayer por 1 min y se procedió a su deshidratación para ser montadas con Entellán.

Como control negativo se procesaron cortes de las muestras correspondientes, sin incubar con anticuerpo primario (en su lugar se usó PBS) siguiendo el protocolo señalado. Para el análisis de las muestras, se determinó la cantidad de células positivas por 10 campos a un aumento de 400x en cada una de las láminas histológicas en microscopio óptico de luz Olympus modelo CX31.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como promedios \pm error estándar (SEM). La significancia estadística entre grupos experimentales se calculó mediante la prueba t-Student para datos

no pareados, considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$. Para esto se utilizó el programa Graphpad Prism 6.0.

RESULTADOS

1.- Análisis histológico de muestras hepáticas.

Para determinar la morfología del hígado en condiciones de obesidad y normopeso, se realizó el análisis histológico mediante la tinción con hematoxilina y eosina de muestras hepáticas de ratón de los grupos DC y DAG (Figura 3). El hígado del grupo DC presenta una arquitectura lobulillar normal, sin alteraciones tisulares. Los cordones de hepatocitos adoptan una disposición radial desde la periferia del lobulillo hacia la vena central. Los sinusoides, los cuales se encuentran entre los cordones de hepatocitos, desembocan en la vena central. Los hepatocitos poseen su forma característica; poliédricas con núcleos esféricos centrales (Figura 3A). Por otra parte, el hígado del grupo DAG presenta una esteatosis con micro y macrovesículas lipídicas, las cuales comprimen y desplazan al núcleo de las células hepáticas hacia la periferia. Se observa que los hepatocitos presentan balonamiento celular, y no se disponen en cordones. Sin embargo, no se observa infiltrado inflamatorio, ni fibrosis del parénquima (Figura 3B).

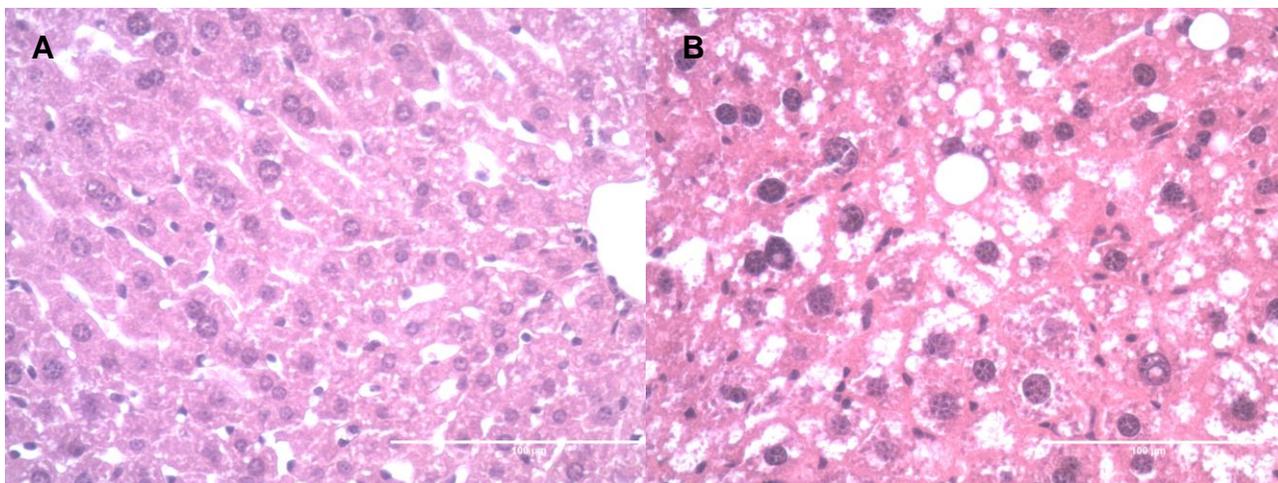


Figura 3.- Histología hepática de los animales de experimentación. (A) Dieta control (DC). **(B)** Dieta alta en grasa (DAG). Tinción hematoxilina y eosina. La histología muestra un significativo incremento del contenido graso en el grupo DAG (90%) **(B)** en comparación al grupo DC (30%) **(A)**. Barra: 100 μ m. Aumento: 400X.

2.- Expresión de receptores ErbBs en hígado y tejido adiposo mediante niveles de mRNA.

Para determinar el nivel de expresión de los mRNA de los receptores ErbB2, 3 y 4 se realizó qPCR, utilizando muestras de cDNAs obtenidas a partir de hígado y tejido adiposo de ratones con DC y DAG.

En el hígado se observó una disminución significativa de los niveles de mRNA de ErbB2 y ErbB3 en el grupo DAG, con respecto al grupo DC (Figuras 4A y 5A), mientras que para ErbB4 la disminución observada en DAG no fue significativa (Figura 6A).

En tejido adiposo todos los receptores ErbBs presentaron una disminución significativa en los grupos DAG con respecto a los grupos DC (Figuras 4B, 5B y 6B). La expresión de los receptores ErbB2 y 3 decayó más de la mitad en el grupo DAG con respecto al grupo (Figuras 4B y 5B).

Además de GAPDH, se utilizó β -actina como gen constitutivo para normalizar los resultados. Los resultados obtenidos con β -actina fueron iguales a los obtenidos con GAPDH (datos no mostrados).

ErbB2

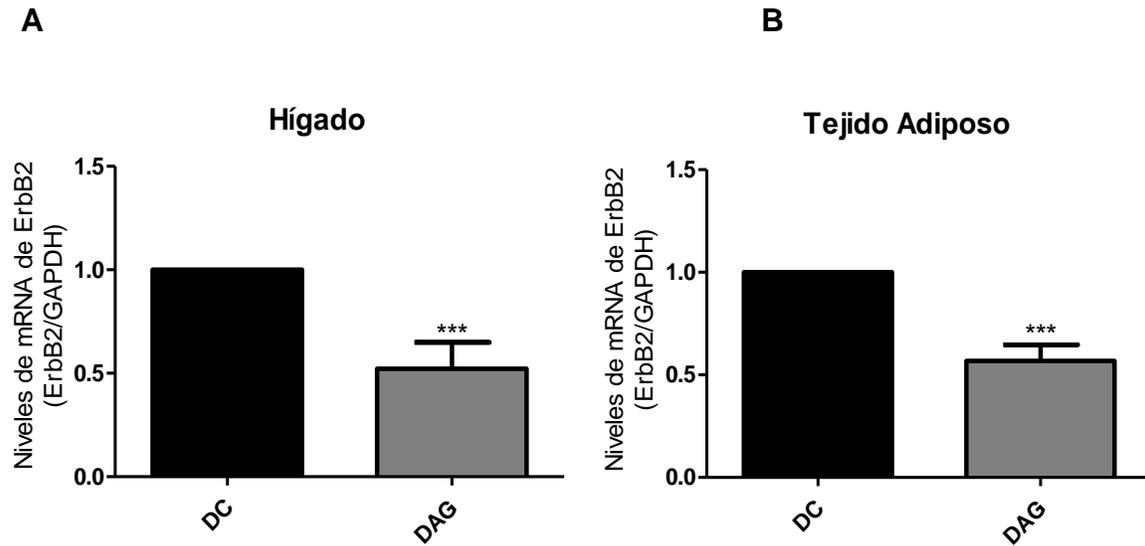


Figura 4.- Niveles de mRNA del receptor ErbB2 en hígado y tejido adiposo en ratones normopeso y obesos. (A) Muestras de hígado. **(B)** Muestras de tejido adiposo. Los niveles de expresión del receptor ErbB2 disminuyeron significativamente en el grupo dieta alta en grasa (DAG), con respecto al grupo dieta control (DC), en ambos tejidos. GAPDH se utilizó para la normalización. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 7 animales por grupo experimental en hígado y 6 animales por grupo experimental en tejido adiposo. (***) $p < 0,001$ (t-Student, datos no pareados).

ErbB3

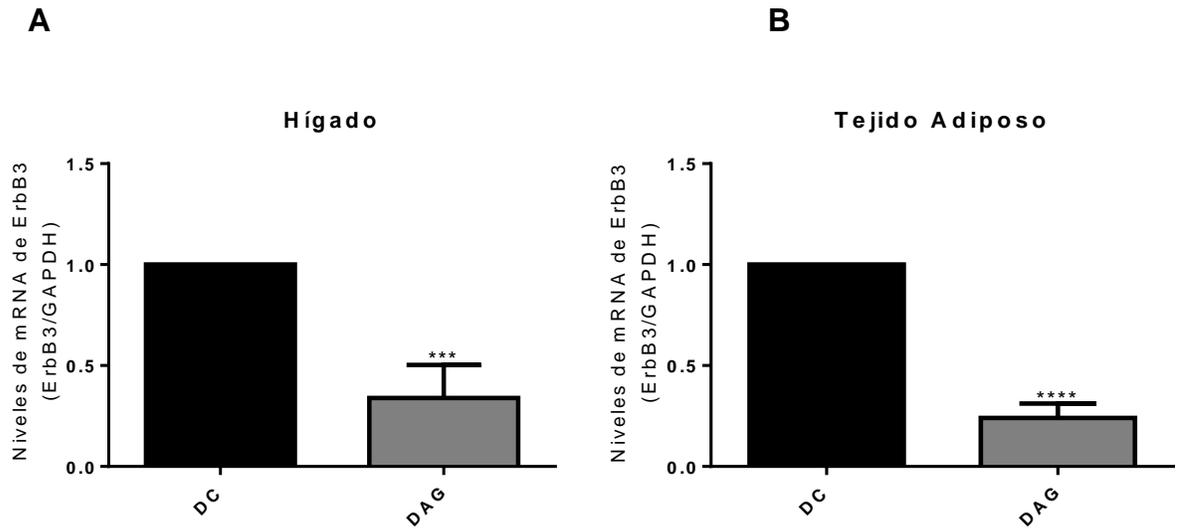


Figura 5.- Niveles de mRNA del receptor ErbB3 en hígado y tejido adiposo en ratones normopeso y obesos. (A) Muestras de hígado. **(B)** Muestras de tejido adiposo. Los niveles de expresión del receptor ErbB3 disminuyeron significativamente en el grupo dieta alta en grasa (DAG), con respecto al grupo dieta control (DC), en ambos tejidos. GAPDH se utilizó para la normalización. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 7 animales por grupo experimental en hígado y 6 animales por grupo experimental en tejido adiposo. (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$ (t-Student, datos no pareados).

ErbB4

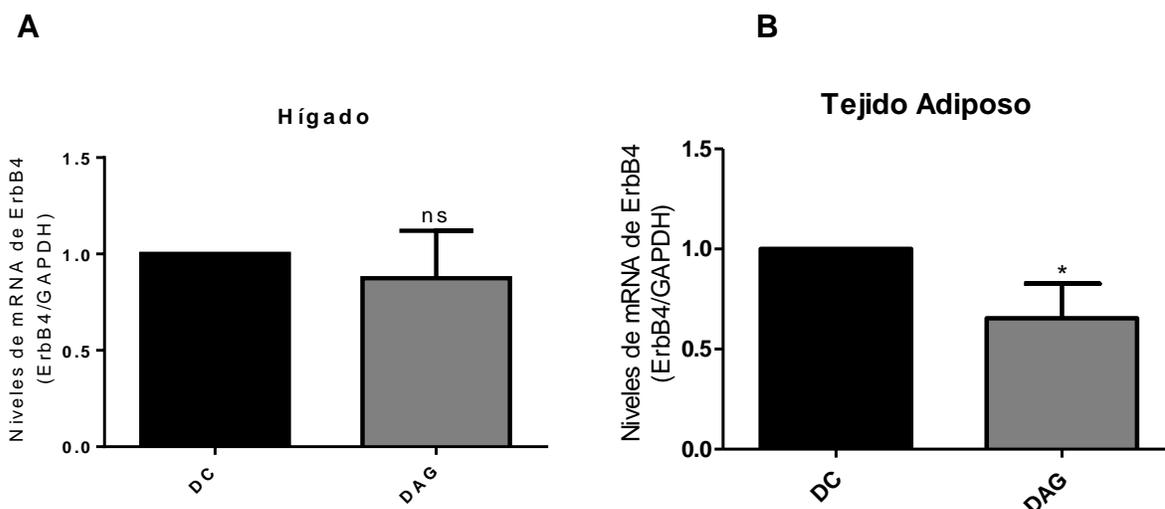


Figura 6.- Niveles de mRNA del receptor ErbB4 en hígado y tejido adiposo en ratones normopeso y obesos. (A) Muestras de hígado. **(B)** Muestras de tejido adiposo. En hígado, no se observan cambios significativos en los niveles de mRNA del receptor ErbB4, en el grupo dieta alta en grasa (DAG), con respecto al grupo dieta control (DC), mientras que en tejido adiposo se observa una disminución significativa del nivel de expresión de ErbB4 en el grupo DAG. GAPDH se utilizó para la normalización. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 7 animales por grupo experimental en hígado y 6 animales por grupo experimental en tejido adiposo. (*) $p < 0,05$ (t-Student, datos no pareados).

3.- Expresión de receptores ErbBs en hígado mediante inmunohistoquímica

Con el objeto de evaluar el nivel de expresión proteica y localización celular de los receptores ErbBs, se realizó inmunohistoquímica para estos receptores en hígado de ratón de los grupos DC y DAG.

En los hepatocitos, la inmunomarcación se encuentra en el citoplasma y núcleo, por lo que se observa positividad uniforme en toda la célula, tanto en el grupo DC como en el grupo DAG (Figuras 7, 8 y 9). La cantidad de células positivas disminuye significativamente para los receptores ErbB2 y 3 en el grupo DAG con respecto al grupo DC; mientras que la disminución del receptor ErbB4 no es significativa (Figura 10).

ErbB2 y ErbB4 presentan una inmunotinción más intensa que ErbB3, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Las células negativas para ErbBs, suelen agruparse en distintas zonas del lobulillo hepático, no obstante, también se encuentran de forma aislada (Figuras 7, 8 y 9).

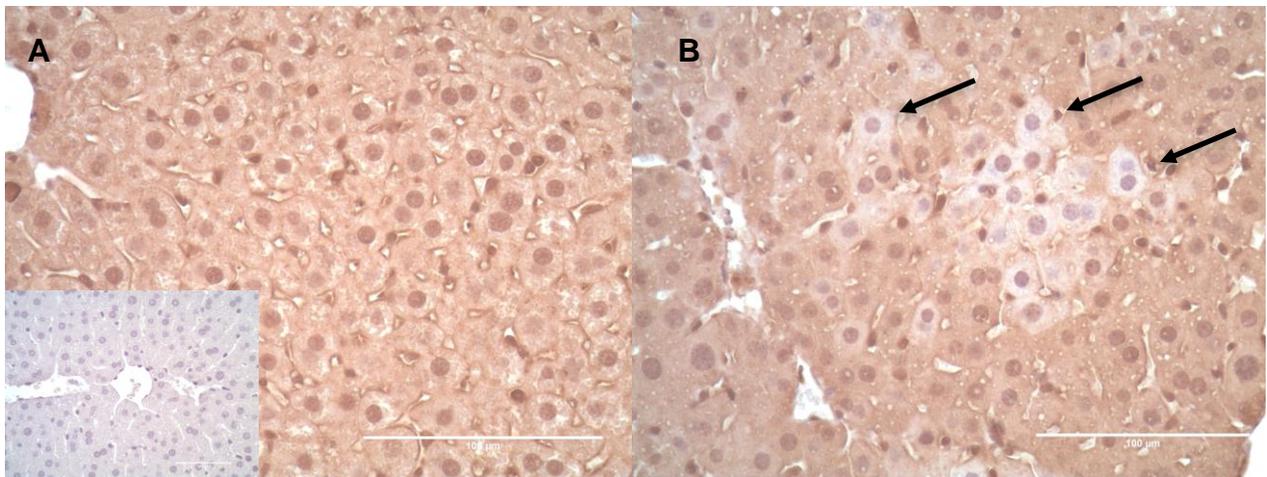


Figura 7.- Inmunohistoquímica para el receptor ErbB2 en tejido hepático. (A) Dieta control (DC). **(B)** Dieta alta en grasa (DAG). Existe una disminución de la tinción inmunohistoquímica para el receptor ErbB2 en el grupo DAG con respecto al grupo DC. Se observan células negativas agrupadas, indicadas por las flechas (B).

Barra: 100 μ m. Inserto: control negativo. Aumento: 400X.

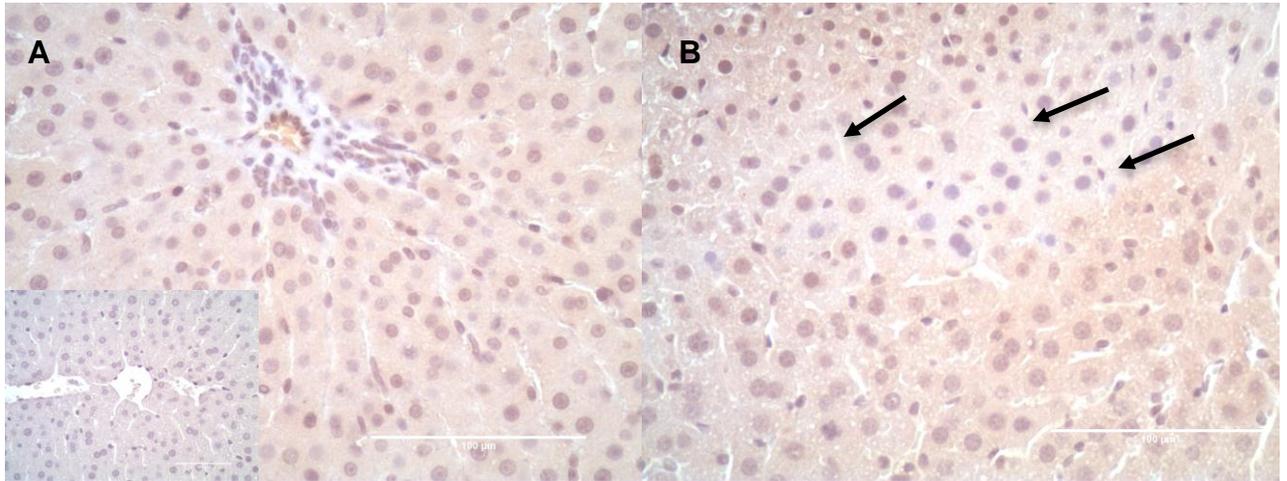


Figura 8.- Inmunohistoquímica para el receptor ErbB3 en tejido hepático. (A) Dieta control (DC). **(B)** Dieta alta en grasa (DAG). Existe una disminución de la tinción inmunohistoquímica para el receptor ErbB3 en el grupo DAG con respecto al grupo DC. El receptor ErbB3 presenta un patrón menos intenso que ErbB2 y ErbB4. Se observan células negativas agrupadas, indicadas por las flechas (B). Barra: 100 µm. Inserto: control negativo. Aumento 400X.

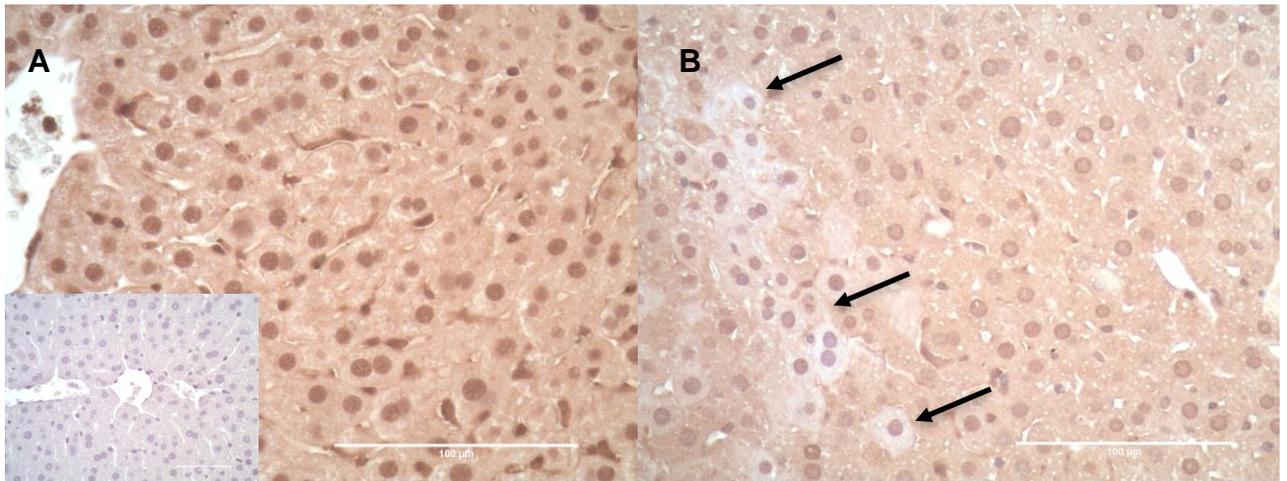


Figura 9.- Inmunohistoquímica para el receptor ErbB4 en tejido hepático. (A) Dieta control (DC). **(B)** Dieta alta en grasa (DAG). Existe una disminución de la tinción inmunohistoquímica para el receptor ErbB4 en el grupo DAG con respecto al grupo DC. Se observan células negativas agrupadas, indicadas por las flechas (B). Barra: 100 µm. Inserto: control negativo. Aumento 400X.

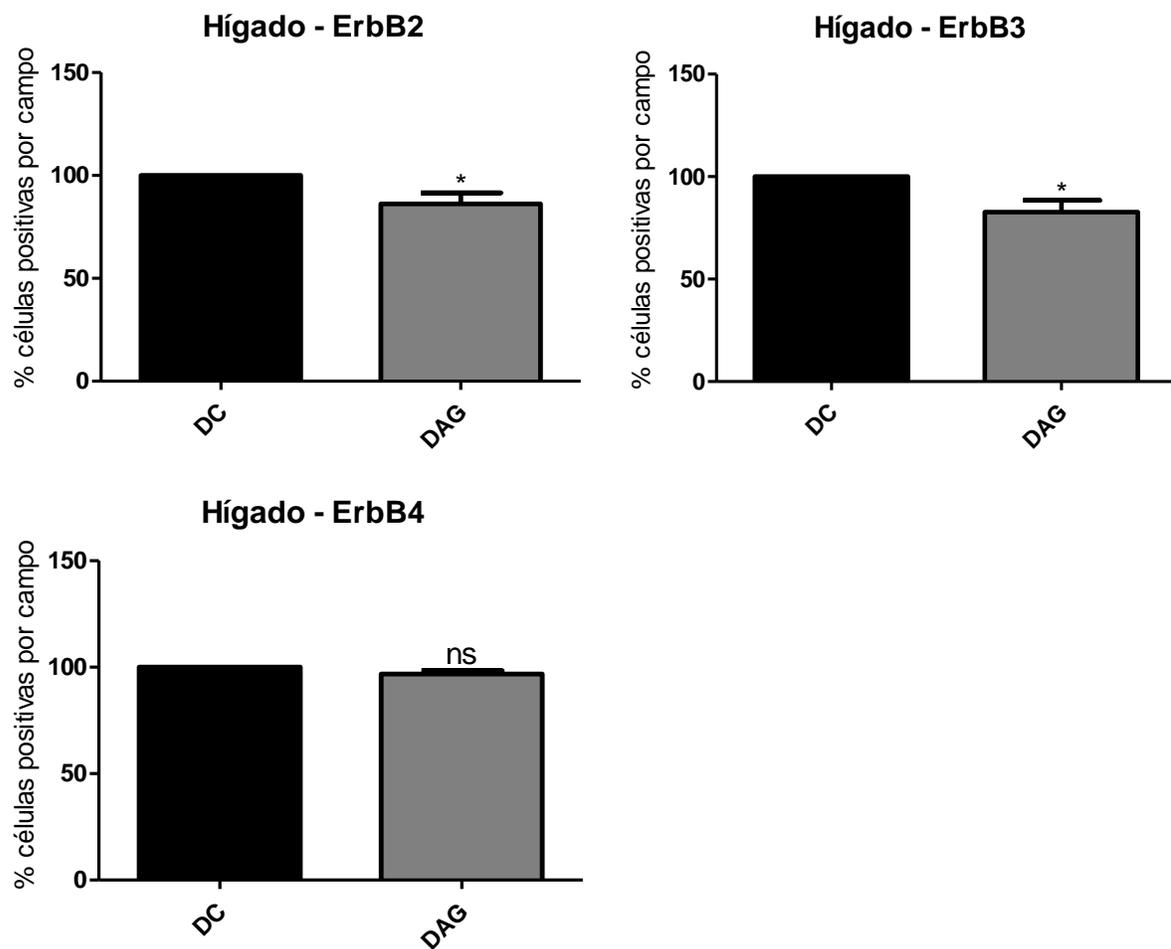


Figura 10.-Porcentaje de células positivas para inmunotinción de los receptores ErbB2, 3 y 4. El porcentaje fue tomado por campo (10) a un aumento de 400X, en los grupos dieta control (DC) y dieta alta en grasa (DAG) en hígado de ratón. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 6 animales por grupo experimental. **(A)** Receptor ErbB2. **(B)** Receptor ErbB3. **(C)** Receptor ErbB4. (*) $p < 0,05$ (t-Student, datos no pareados).

DISCUSIÓN

La obesidad es un problema a nivel mundial y en Chile se asocia a alteraciones metabólicas que son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Las tasas de prevalencia aumentan año tras año, lo que genera una amenaza para la salud de nuestro país¹⁸.

Existe una gran cantidad de estudios epidemiológicos que evidencian los efectos perjudiciales de la obesidad, sin embargo, los mecanismos biológicos subyacentes son menos conocidos¹⁹.

La homeostasis metabólica, en condiciones fisiológicas normales, está regulada principalmente por el hígado y el tejido adiposo, a través de la secreción de citoquinas, adipoquinas y factores de crecimiento²⁰. En condiciones de un exceso de consumo de calorías, las vías de señalización se alteran, contribuyendo a trastornos metabólicos y lesiones asociadas, en ambos órganos²⁰.

En el tejido adiposo, la obesidad provoca la hiperplasia de los adipocitos e hipertrofia del tejido. Esto lleva a un aumento en el consumo de oxígeno. Debido a que esta mayor demanda de oxígeno no se puede suplir, los adipocitos comienzan a sufrir muerte celular y las células inflamatorias aumentan en la circulación. Los adipocitos dañados, por la deficiencia de oxígeno, disminuyen la producción de ciertas adipoquinas (dentro de las cuales se encuentra NRG). La capacidad de respuesta a la insulina por parte de los adipocitos se ve afectada por las grandes cantidades de citoquinas inflamatorias que producen los macrófagos, como el factor de necrosis tumoral y la interleuquina-6, provocando finalmente la resistencia a insulina. Por otra parte, aumenta la lipólisis y la liberación de ácidos grasos al plasma. En consecuencia, la desregulación de los niveles de las adipoquinas metabólicas y las citoquinas inflamatorias en el tejido adiposo, producen aumento de ácidos grasos circulantes y la acumulación ectópica de los ácidos grasos en otros tejidos, incluido el hígado²⁰.

La lesión hepática está dada en parte por la acumulación de grasa en los hepatocitos, mediante el aumento de ácidos grasos circulantes que llegan al hígado y que no son beta oxidados, y la lipogénesis hepática *de novo*. Esto provoca estrés oxidativo, lipotoxicidad, disfunción mitocondrial y estrés del retículo²¹. Dichos mecanismos, inducidos por la acumulación de metabolitos tóxicos derivados de ácidos grasos y la consiguiente activación de vías inflamatorias, provocan la incapacidad de los hepatocitos para eliminar el exceso de ácidos grasos libres²².

En los últimos años, diferentes estudios vinculan las alteraciones metabólicas de la obesidad con desbalances en los niveles de distintas isoformas de NRG (1 a la 4)^{6,9,12,16}.

Las NRGs que son sintetizadas y secretadas en músculo, hígado y tejido adiposo^{6, 7, 8}, se unen a los receptores denominados ErbBs (2, 3 y 4), generando efectos autocrinos, paracrinos y yuxtacrinos, a través de la activación de múltiples cascadas de señalización⁶.

Dentro de los efectos metabólicos que se han propuesto para esta vía, se ha descrito que NRG participa en el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético, induciendo su captación mediante la translocación de GLUT-4 a la membrana celular. El efecto de NRG es aditivo a la acción de la insulina, ya que se ha identificado que activan vías de señalización independientes⁶.

Por otra parte, la activación de la vía de NRG4, en adipocitos, produce un aumento de los vasos sanguíneos en tejido adiposo blanco y genera una mayor sensibilidad a la insulina y mejora la tolerancia a la glucosa⁸. Esto último podría deberse al mismo mecanismo que se ha descrito en músculo, NRG provocaría la translocación de GLUT-4 a la membrana de los adipocitos, generando un aumento de la captación de glucosa. Sin embargo, no existen estudios que describan este mecanismo en tejido adiposo blanco.

Por otro lado, se ha descrito que NRG4 en hígado juega un rol importante en la fisiopatología de EGHNA, al inhibir la lipogénesis hepática mediante la inhibición del factor de crecimiento llamado proteína de unión al elemento regulador del esteroles (SREBP-1c) ¹⁷.

Estos antecedentes indicarían que la vía NRG/receptores ErbBs podrían estar participando de manera directa en una gran variedad de vías metabólicas asociadas a la obesidad, tanto en hígado como en tejido adiposo.

Sin embargo, a pesar de las múltiples funciones descritas para esta vía, hasta la fecha no existen estudios que describan los niveles de expresión de los receptores ErbBs en condiciones de obesidad vs normopeso en hígado y tejido adiposo.

Dado que, los antecedentes de la literatura señalan un efecto beneficioso del aumento de la expresión de NRG, en hígado y tejido adiposo^{12, 14, 16}, y además que, en otras patologías como la distrofia muscular se ha postulado que la vía de NRG/receptores ErbBs cumple un rol compensatorio²³, esperábamos observar un aumento en la expresión de los receptores ErbBs en hígado y tejido adiposo de ratones obesos comparado con los ratones normopeso. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis muestran lo contrario: disminuyen significativamente, tanto los niveles de expresión, y los niveles proteicos de los receptores ErbB2 y 3 en hígado, como los niveles de expresión de los receptores ErbB2, 3 y 4 en tejido adiposo, al comparar el grupo DAG con respecto al grupo DC.

La disminución de la expresión de los receptores ErbBs que observamos tanto en hígado como en tejido adiposo de ratones obesos, nos sugiere que las vías metabólicas asociadas a estos receptores también podrían estarlo. De hecho, varios trabajos coinciden que una disminución de NRG sería una característica común de la obesidad²⁴, postulando que un aumento en la expresión de NRG en distintos órganos, tendría efectos protectores ante la obesidad.

En ratones transgénicos para NRG4 se ha demostrado que la activación de la vía de NRG4/ErbB3-ErbB4 reduce el aumento de peso inducido por una DAG, al aumentar la tasa metabólica basal y el gasto de energía a nivel sistémico²⁵. Además, otro estudio demuestra que la activación de esta vía inhibe la vía lipogénica hepática¹², por lo que una disminución de estos receptores podría estar directamente relacionado a una disminución del gasto energético y a un aumento de la acumulación de ácidos grasos en el hígado, en ratones obesos.

En hígado, se ha descrito que la administración aguda de NRG1 aumenta significativamente la tasa de fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de ErbB3, lo que activaría la vía de señalización de PI3K/AKT. AKT es un importante inhibidor de la expresión de los genes que codifican las enzimas gluconeogénicas¹⁶, por tanto, una disminución de la vía NRG1/ErbB2-ErbB3 podría estar relacionada con un aumento de la gluconeogénesis en el hígado de ratones obesos.

La sobreexpresión de NRG4 en tejido adiposo blanco, se ha relacionado con una disminución importante en la hipertrofia de los adipocitos de ratones obesos inducidos por DAG. Además, se ha descrito que la sobreexpresión de NRG4 es capaz de prevenir la infiltración de macrófagos inducida por la DAG, disminuyendo así el daño celular provocado por las citoquinas inflamatorias¹⁴. Por otra parte, la vía de señalización NRG/receptores ErbBs también se ha asociado con una disminución de la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria²⁵. En consecuencia, en condiciones de obesidad, la disminución de los receptores ErbBs conduciría a una mayor respuesta inflamatoria, y a un aumento de la hipertrofia de los adipocitos, provocando una disfunción importante en el tejido adiposo²⁵.

Con respecto a la localización de los receptores ErbBs, nuestros resultados indican que en hígado estos receptores se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo, a pesar de

que éstos corresponden a receptores de membrana. Sin embargo, existen varios estudios que han detectado a los receptores ErbBs (como molécula intacta o dominio) a nivel nuclear^{26,27,28}. Se han propuesto distintos mecanismos que explican la presencia de estos receptores (o su dominio) en el núcleo. En el caso de ErbB2, este receptor llegaría al núcleo mediante una translocación mediada por endosoma, dirigida por la importina KPN β 1, la cual reconoce la señal de localización nuclear (NLS) de las proteínas ErbBs y las transloca al núcleo a través del complejo de poro nuclear^{26,29}.

El mecanismo principal del transporte de ErbB4 es a través de la escisión proteolítica, realizada por ADAM17, generando un dominio intracelular (ICD), que luego se traslada al núcleo y funciona como un factor transcripcional^{6, 29}.

En cuanto a ErbB3, se ha encontrado la molécula intacta en el núcleo, no obstante, el mecanismo por el cual ingresa al núcleo no es conocido hasta ahora²⁹.

A pesar de que existen una gran cantidad de antecedentes que indican la presencia de estos receptores a nivel nuclear, aún no se conocen los mecanismos específicos de la translocación nuclear de los receptores ErbBs en hígado y el rol de estos receptores nucleares aún están siendo investigados.

Los hallazgos realizados en esta tesis contribuyen a desarrollar nuevas investigaciones acerca de la expresión, función y regulación de estos receptores en hígado y tejido adiposo, tanto en condiciones fisiológicas, como en obesidad.

CONCLUSIÓN

La obesidad inducida por DAG disminuye significativamente los niveles de mRNA y los niveles proteicos de los receptores ErbB2 y 3 en hígado, y los niveles de mRNA de los receptores ErbB2, 3 y 4 en tejido adiposo.

Los cambios en la expresión de estos receptores en ratones obesos podrían estar asociados a alteraciones en la vía de NRG/ErbBs, lo cual permitiría estudiar su implicancia en trastornos metabólicos relacionados con la obesidad.

Los nuevos antecedentes que arroja este estudio permiten caracterizar con mayor detalle la expresión de los receptores ErbBs, y fomenta nuevas investigaciones dirigidas a estudiar las vías de señalización asociadas (ejemplo: PI3K/AKT) en modelo murino en condiciones de normopeso y obesidad.

REFERENCIAS

1. Hruby A., Hu FB. "The Epidemiology of Obesity: A Big Picture". PMC. 2016. Volume 33: 673–689.
2. Organización Mundial de la Salud. OMS. "Obesidad y Sobrepeso". Consultado: 13 de octubre 2018. Disponible en:
<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
3. Organización Panamericana de la salud. "Obesidad". Consultado: 28 de mayo 2019. Disponible en:
https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=179:obesidad&Itemid=1005.
4. Ellulu MS., Patimah I. "Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications". Arch Med Sci. 2016. Volume 13: 851–863.
5. Seroogy K., Dickerson J., "Neuregulins" Handbook of Biologically Active Peptides. 2006. Chapter 223: 1633-1638.
6. Gumá A, Martínez-Redondo V., et al. "Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism". AJP. 2010. Volume 298: 742-750.
7. Zhang L., Bai M. "Role of hepatic neuregulin 4 in the regulation of gluconeogenesis in mice". Epub. 2018. Volume 217: 185-192.
8. Bayu D., Ikeda K., et al. "Activation of neuregulin-4 in adipocytes improves metabolic health by enhancing adipose tissue angiogenesis". BBRC. 2018. Volume 504: 427-433.
9. Cantó C., Chibalin AV., et al. "Neuregulins mediate calcium-induced glucose transport during muscle contraction". J Biol Chem. 2006. Volume 281: 21690- 21697.
10. Ennequin G., Boisseau N. et al. "Exercise training and return to a well-balanced diet activate the neuregulin 1/ErbB pathway in skeletal muscle of obese rats". J Physiol. 2015. Volume 12: 2665–2677.

11. Luo L., Liu M. "Adipose tissue in control of metabolism". 2016. *J Endocrinol*. Volume 231:77-99.
12. Wang GX., Zhao XY., Meng ZX. et.al. "The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis". *Nat.Med*. 2014. Volume 20: 1436-1443.
13. Bayu D., Ikeda K., et al. "Neuregulin-4 is an angiogenic factor that is critically involved in the maintenance of adipose tissue vasculature". *Biochem Biophys Res Commun*. 2018. 1-7.
14. Ma Y., Gao M., Liu D. "Preventing High Fat Diet-induced Obesity and Improving Insulin Sensitivity through Neuregulin 4 Gene Transfer". *Sci Rep*. 2016.
15. Cai C., Lin M. "Association of circulating neuregulin 4 with metabolic syndrome in obese adults: a cross-sectional study". *BMC Med*. 2016. Volume 14:165.
16. Caillaud K., Boisseau N., et al. "Neuregulin 1 improves glucose tolerance in adult and old rats". *Diabetes Metab*. 2015. Volume 42: 96-104.
17. Dai Y., Zhua J., et al. "A case-control study: Association between serum neuregulin 4 level and non-alcoholic fatty liver disease". *Metabolism*. 2015. Volume 64: 1667-1673.
18. OECD "Reviews of public health: Chile". 2019. 82.
19. Nimptsch K., Konigorski S., et al. "Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine" *Metabolism*. 2019. Volume 92: 61-70.
20. Duwaerts C., Maher J. "Macronutrients and the Adipose-Liver Axis in Obesity and Fatty Liver". *CMGH*. 2019. Volume7: 749-761.
21. Koppe S. "Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease". *Transl Res*. 2014. Volume 164: 312-322.
22. Polyzos S., Kountouras J., et al. "Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics". *Metabolism*. 2019. Volume 92:82-97.

23. Juretić N., Díaz J., et al. "Interleukin-6 and neuregulin-1 as regulators of utrophin expression via the activation of NRG-1/ErbB signaling pathway in mdx cells". *Biochim Biophys Acta*. 2017. 1863(3):770-780.
24. Wang GX., Zhao XY., et al. "The brown fat secretome: metabolic functions beyond thermogenesis". *TEM*. 2015. Volume 26: 231-237.
25. Chen Z., Wang GX., et al. "Nrg4 promotes fuel oxidation and a healthy adipokine profile to ameliorate diet-induced metabolic disorders". *Mol Metab*. 2017. Volume 6: 863-872.
26. Wang SC., Hung MC. "Nuclear Translocation of the Epidermal Growth Factor Receptor Family Membrane Tyrosine Kinase Receptors". *Clin Cancer Res*. 2009. Volume 15: 6484-9.
27. Carpenter G. "Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases". *Curr Opin Cell Biol*. 2003. Volume 15:143-148.
28. Lo HW., Hung MC. "Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival". *BJC*. 2006. Volume 94:184-188.
29. Wang SC., Hung MC. "Nuclear Translocation of the Epidermal Growth Factor Receptor Family Membrane Tyrosine Kinase Receptors". *Clin Cancer Res*. 2009. Volume 15: 6484–9.

ANEXO



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE
INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

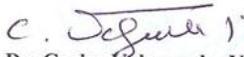
CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *“Hepatoprotective mechanisms of Rosa rubiginosa oil (Rosa mosqueta) in preconditioning against ischemia reperfusion injury in healthy and steatotic liver and prevention of liver steatosis: role of Nrf2, PPAR-alpha, NF-κB and expression of cytoprotective genes”* cuya investigadora responsable es la **Dra. Gladys Tapia Opazo** no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (**Protocolo CBA# 0639 FMUCH**).

La Dra. Tapia se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto enviado al concurso FONDECYT Regular 2014.

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO” (www.med.uchile.cl/normas/indice.html) después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.


Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

Santiago, 26 de Septiembre de 2013