



**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**“EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN EN TIEMPO RESTRINGIDO SOBRE LAS  
NEURONAS VIPÉRGICAS DEL PLEXO SUBMUCOSO Y LA PERMEABILIDAD  
INTESTINAL EN RATONES OBESOS”**

**DANITZA ESCARLET VARGAS DIAZ**

**Tesis para optar al grado de  
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Directora de Tesis:** ANGÉLICA  
ESCOBAR MALDONADO  
Universidad de Valparaíso

**Co-Directora de Tesis:**  
MARCELA JULIO PIEPER  
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

**2024**

## INDICE

### Contenido

1. RESUMEN .....	6
2. ABSTRACT .....	7
3. ABREVIATURAS.....	8
4. INTRODUCCIÓN .....	9
4.1 Obesidad como un problema de salud actual .....	9
4.2 Alteración de la barrera intestinal y su relación con la inflamación .....	9
4.3 Composición de la barrera intestinal.....	10
4.4 Mecanismos de alteración de la barrera intestinal. ....	11
4.5 Rol del sistema nervioso entérico en el control de la permeabilidad intestinal. ....	12
4.6 Neuronas VIPérgicas en el plexo submucoso. ....	13
4.7 Obesidad, dietas hipercalóricas y su rol sobre la función de neuronas del sistema nervioso entérico. ....	14
4.8 Ayuno intermitente y su posible rol modulador de la permeabilidad intestinal. ....	15
5. HIPÓTESIS Y/O PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	18
6. OBJETIVOS.....	18
6.1 OBJETIVO GENERAL .....	18
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
7. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	19
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
8.1. ANIMALES.....	19
8.2. DIETA .....	19
8.3. OBTENCIÓN DE TEJIDO .....	20
8.4. CORTES EN CRIOSTATO .....	21
8.5. FIJACIÓN DE PLEXO SUBMUCOSO .....	21
8.6. ENSAYO DE PERMEABILIDAD .....	21
8.7. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	22
8.7.1. MEDICIÓN DE LOCALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA PROTEINA DE UNIÓN ESTRECHA ZO-1. ....	22
8.7.2. MARCADOR NEURONAL Y PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) .....	23
8.7.2.1. INMUNOFLUORESCENCIA PARA ANÁLISIS DE CAMBIOS EN EXPRESIÓN DE VIP EN CORTES TRANSVERSALES.....	23

8.7.2.2. INMUNOFLUORESCENCIA PARA ANÁLISIS DEL NÚMERO Y MORFOLOGÍA DE NEURONAS VIPERGICAS EN PLEXO SUBMUCOSO EXTENDIDO.....	24
8.8. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	25
8.8.1. MICROSCOPIA CONFOCAL Y ANÁLISIS DE IMÁGENES DE ZO1. ....	25
8.8.2. MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES DE VIP Y PGP9.5. ....	26
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	29
10. RESULTADOS .....	30
10.1. PERMEABILIDAD INTESTINAL EN COLON DE RATONES OBESOS.....	30
10.2. PLEXO SUBMUCOSO EN COLON DE RATONES SOMETIDOS A UNA DIETA ALTA EN GRASA Y ALIMENTACIÓN EN TIEMPO RESTRINGIDO.....	31
11. DISCUSION.....	39
12. CONCLUSIONES .....	44
13. BIBLIOGRAFÍA.....	45

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Composición pared intestinal .....	11
Figura 2 Efectos de TRF en la permeabilidad intestinal de ratones obesos. ....	17
Figura 3 Modelo de obesidad inducido por dieta y distribución del tipo de alimentación diaria según el grupo y experimento. ....	20
Figura 4 Imágenes representativas de la metodología utilizada en el inmunomarcaje de cortes transversales de colon. ....	28
Figura 5 Efectos de TRF en la permeabilidad intestinal de ratones obesos .....	31
Figura 6 Efectos de TRF en el plexo submucoso de ratón observado en cortes transversales. ....	33
Figura 7 Efectos del TRF en ratones alimentados con HFD por 10 meses en el plexo submucoso del colon.....	34
Figura 8 Características de neuronas VIPérgicas en plexo submucoso del colon de ratones sometidos a TRF posterior a un consumo de HFD por un periodo de 10 meses. ....	35
Figura 9 Imágenes representativas inmunotinción ZO-1. ....	37
Figura 10 Efectos de TRF en ZO-1.....	38

La obesidad es altamente prevalente en la sociedad y se asocia con un estado de inflamación crónica de bajo grado. La permeabilidad intestinal aumenta en estos sujetos, contribuyendo al desarrollo de la inflamación sistémica y a la progresión de enfermedades metabólicas. Se ha propuesto que el ayuno intermitente podría ser una alternativa terapéutica contra la obesidad, siendo la alimentación en tiempo restringido (TRF) 16/8 uno de los patrones más comunes. Numerosos estudios en humanos y roedores han demostrado efectos del TRF sobre los parámetros metabólicos. Resultados obtenidos previamente en el laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas de la Universidad de Valparaíso, muestran efecto positivo del TRF sobre la permeabilidad intestinal en un modelo murino de obesidad, atenuando el aumento de permeabilidad provocada por HFD. Las neuronas VIPérgicas representan alrededor del 70% de las neuronas del plexo submucoso y diversos estudios han vinculado el péptido intestinal vasoactivo (VIP) con la integridad de la barrera intestinal. Estas neuronas podrían tener un papel clave en los cambios observados en la permeabilidad intestinal durante el ayuno intermitente. En esta tesis se evaluó como es que HFD y el TRF impactan sobre este subgrupo neuronal.

Para ello, se utilizó muestras de colon de ratones macho C57BL/6J sometidos a HFD durante 12 y 40 semanas (60% KCal en grasa) para inducir obesidad y un posterior protocolo de TRF durante 6 semanas. Una porción del colon se utilizó para ensayo de permeabilidad *ex vivo* a FITC Dextran 4KDa y la porción más proximal del colon se fijó en paraformaldehído al 4% para realizar cortes de 5  $\mu$ m en criostato y posteriormente pruebas de inmunomarcaje contra ZO-1, proteína que participa en la mantención de uniones trechas del epitelio intestinal, VIP y PGP9.5 como marcador neuronal general.

Se observó un aumento significativo de la permeabilidad intestinal al exponer 10 meses a HFD sin embargo, no se observó modificaciones posteriores a un protocolo de TRF. Por otro lado, la expresión de ZO-1 tanto al exponer por 12 semanas a HFD y posteriormente TRF se mantuvo similar a los controles, pero disminuyó luego de 40 semanas de HFD. Al evaluar cambios de expresión neuronales sólo se observó disminución del marcador general PGP9.5 en HFD pero no se observan cambios en VIP. Los resultados indican que no se observa un efecto de TRF sobre las neuronas VIPérgicas ni sobre la proteína ZO-1, esto sugiere que la disminución de la permeabilidad intestinal posterior al TRF en ratones obesos no es mediada por ZO-1 y no se relaciona al menos con el área de neuronas VIP del plexo submucoso.