

**EFFECTOS DE LA OBESIDAD MATERNA SOBRE EL PATRÓN DE APOPTOSIS
EN LA CARDIOGÉNESIS TARDIA DE LA RATA *WISTAR***

MARIA ELEONORA TEJADA LOPEZ
Estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas

Universidad del Valle
Escuela de Ciencias Básicas
Departamento de Morfología
2016

**EFFECTOS DE LA OBESIDAD MATERNA SOBRE EL PATRÓN DE APOPTOSIS
EN LA CARDIOGÉNESIS TARDIA DE LA RATA *WISTAR***

MARIA ELEONORA TEJADA LOPEZ, Lic. Biol., M. Sc. en Doc. Universitaria
Estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas

MARIO ALEJANDRO ORTIZ
Od, M.Sc en Ciencias Básicas Médicas

MARIA CAROLINA PUSTOVRH
PhD. Ciencias Biológicas

Tutores

LILIANA FLOREZ
Estadística

Universidad del Valle
Escuela de Ciencias Básicas
Departamento de Morfología
2016

NOTA DE ACEPTACION

El jurado calificador del trabajo de investigación titulado:

“EFECTOS DE LA OBESIDAD MATERNA SOBRE EL PATRÓN DE APOPTOSIS EN LA CARDIOGÉNESIS TARDIA DE LA RATA *WISTAR*” considera que está estructurado conforme al rigor académico y normas que para estos fines tiene la Universidad del Valle. Por lo anterior conceptúa lo siguiente

Presidente:

Jurado 1:

Jurado 2:

Jurado 3:

Ciudad y fecha _____

DEDICATORIA

Dedico este logro a Dios quien me guio y proporcionó todas las situaciones que permitieron llegar hasta la Maestría. A mi esposo Alejandro, por su apoyo incondicional y a mi madre que aunque no esté conmigo, sé que estaría muy orgullosa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a la Universidad del Valle, porque me brindó la oportunidad de crecer profesionalmente y, sobre todo, como persona. A la Doctora Liliana Salazar, quien dedico inicialmente, parte de su tiempo para orientarme en el inicio de este proceso, y finalmente acogerme en el grupo de investigación TEBLAMI, que por medio de sus aportes favoreció el adecuado desarrollo de este valioso trabajo. A cada uno de los docentes que me guiaron y apoyaron para hacer de este proyecto una realidad. Gracias doctor Mario y doctora Carolina, por creer en mí y guiarme en cada momento, tanto en lo académico como en lo personal. A las compañeras del laboratorio Nhora Holguín, Martha Lucia Ceballos, Sirsa.Hidalgo. A mis compañeros de estudio Carlos Humberto Valencia, Sonia Osorio, Sebastian Medina; a todos los integrantes del proyecto de obesidad, Yhoiss Muñoz, Farah, Carlos Andres Muñoz, Estefanía Cuellar, David Moreno. Muchas gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.....	13
3.1 Apoptosis y Obesidad	13
3.1.1 Apoptosis y desarrollo cardíaco	15
4. MARCO TEORICO	17
4.1. Antecedentes	17
4.2. Biomodelos como herramienta de investigación de enfermedades humanas	17
4.3. Anatomía del corazón en murinos	18
4.3.1. Histología del corazón.....	19
4.3.2. Desarrollo embrionario del corazón.....	20
4.4 Definición proceso de apoptosis	24
4.4.1. Características del proceso de apoptosis	24
4.4.2 Etapas del proceso de apoptosis	25
4.4.3 Caspasas asociadas a los procesos de apoptosis.....	26
4.4.4 Mecanismos celulares que controlan la activación y función de las caspasas.....	26
4.4.5 Apoptosis y desarrollo cardíaco	28
4.4.6 Obesidad y alteraciones cardiacas	30
5. OBJETIVOS.....	33
5.1. OBJETIVO GENERAL	33
5.1.2 Objetivos específicos	33
6. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS.....	33
7. DISEÑO METODOLÓGICO.....	34
7.1 Tipo de estudio	34
7.2 Selección de la muestra corazones fetales.....	34
7.2.1. Criterios de inclusión corazones fetales.....	34
7.2.2. Criterios de exclusión corazones fetales.....	34
7.3 Consideraciones éticas	35
7.4 Diseño Experimental	35
7.4.1 Biomodelos	35
7.5 Protocolo de Trabajo.....	35

7.5.1. Fase I Establecimiento del modelo de obesidad adquirida por dieta	35
7.5.1.1. Evaluación del ciclo estral y establecimiento de la preñez.....	37
7.5.2. Fase II	38
7.5.3. Fase III	39
7.5.3.1 Procesamiento de corazones fetales para la realización de técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica	39
7.5.3.1.1 Inclusión y corte	39
7.5.3.2 Procedimientos histoquímicos	41
7.5.3.2.1 Técnicas para la detección de apoptosis	41
7.5.3.2.1 Detección de caspasa 3 activada	41
7.5.3.2.2 Técnica de TUNEL (dUTP nick end labeling).....	42
7.5.3.3. Cuantificación de cardiomiocitos positivas caspasa 3 activada y TUNEL	43
7.5.3.4 Diseño y realización de prueba de concordancia.....	43
7.5.3.4.1 Análisis estadístico descriptivo	47
8. RESULTADOS.....	49
8.1 Evaluación de la morfología cardíaca estadio E16.5	49
8.1.1 Evaluación del grosor de la pared ventricular estadio E16.5	50
8.2. Detección de células apoptóticas.....	51
8.2.1 Apoptosis cardíaca E13.5	58
8.2.1.1 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en atrios corazón fetal E13.5 ..	58
8.2.1.2 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en ventrículo corazón fetal E13.5	59
8.2.1.3 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en el tabique interventricular corazón fetal E13.5	61
8.3 Apoptosis cardíaca E16. 5	61
8.3.1. Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en atrios corazón fetal E16.5	61
8.3.2 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en ventrículos corazón fetal E16.5	63
8.3.3 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en tabique interventricular del corazón fetal E16.5	64
9. DISCUSIÓN	66
10. CONCLUSIONES	71
11. RECOMENDACIONES	72
12. REFERENCIAS	125

LISTAS ESPECIALES

ANEXOS

ANEXO: 1. POE PARA ANESTESIA Y DISECCIÓN DE ÚTERO DE RATA WISTAR E IMPLANTACIONES	73
ANEXO 2. POE PROCESO ESTANDAR DE DESHIDRATACIÓN, INCLUSIÓN EN PARAFINA Y CORTE DE CORAZON FETAL DE RATA WISTAR ESTADIO 13.5 Y 16.5	84
ANEXO 3. POE PARA LA DETECCION INMUNOHISTOQUIMICA DE CASPASA 3 ACTIVADA EN CORTES DE CORAZONES FETALES INCLUIDOS EN PARAFINA ESTADIO 13.5 Y 16.5	91
ANEXO 4. POE PARA LA TECNICA DE TUNEL EN CORTES DE CORAZONES FETALES INCLUIDOS EN PARAFINA ESTADIO 13.5 Y 16.5	95
ANEXO 5. POE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS CASPASA 3 ACTIVADA POSITIVAS (PRUEBA DE CONCORDANCIA)	100
ANEXO 6. POE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNOMARCADAS CASPASA 3 ACTIVADA Y TECNICA DE TUNEL EN MUESTRAS PARAFINADAS DE CORAZONES FETALES ESTADIO E 13.5 Y E16.5	106
ANEXO 7. POE PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL GROSOR DE LA PARED VENTRICULAR CORTES DE CORAZONES FETALES ESTADIO E16.5	115
ANEXO 8. AVAL COMITE DE ETICA	122
ANEXO 9. Valores p obtenidos en la prueba para caspasa 3 activada	123
ANEXO 10. Valores p obtenidos en ensayos de TUNEL	123
ANEXO 11. Divulgación	124

TABLAS

Tabla 1. Alimentos suministrados a los biomodelos maternos durante la dieta de cafetería	36
Tabla 2. Distribución de corazones fetales para las pruebas de histoquímica e inmunohistoquímica	39
Tabla 3. Sistema de codificación para muestras de corazones fetales en día gestacional E13.5 y E16.5	40
Tabla 4. Muestras de corazones fetales utilizadas para prueba de concordancia	44
Tabla 5. Distribución de muestras evaluadas por medio de la técnica de inmunohistoquímica para detección de caspasa 3 activada.	45
Tablas 6: Distribución de muestras evaluadas por medio de la técnica de TUNEL	45
Tabla 7. Valores del coeficiente de Lin y grado de concordancia de las regiones evaluadas según los grupos experimentales	46
Tabla 8. Características de las variables de estudio	48

FIGURAS

Figura 1. Corte Coronal de tórax de ratón <i>Mus musculus</i> cepa CFW. Estadio E17.....	19
Figura 2. Etapas tempranas del desarrollo cardíaco en murinos.....	23
Figura 3. Vías de señalización extrínseca e intrínseca en el proceso de apoptosis.	27
Figura 4. Toma de frotis vaginal.....	37
Figura 5. Distribución de biomodelos en la fase de apareamiento.....	38
Figura 6. Corazones fetales de rata <i>Wistar</i> estadio E16.5.....	50
Figura 7. Medianas del grosor de la pared ventricular estadio E16,5.	51
Figura 8. Regiones evaluadas en el corazón fetal.	52
Figura 9. Microfotografía de cortes histológicos de corazón fetal de rata <i>Wistar</i> día E13.5 técnica caspasa 3 activada.....	53
Figura 10. Microfotografía de atrio derecho de corazón fetal de rata <i>Wistar</i> día E16.5 técnica caspasa 3 activada.....	54
Figura 11. Microfotografía tabique interventricular de corazón fetal de rata <i>Wistar</i> día E16.5 técnica caspasa 3 activada.....	54
Figura 12. Microfotografía de cortes histológicos de corazón fetal de rata <i>Wistar</i> día E13.5 técnica de TUNEL.	55
Figura 13. Microfotografía de cortes histológicos de corazón fetal de rata <i>Wistar</i> día E13.5 del grupo obeso técnica TUNEL.....	56
Figura 14. Microfotografía del tabique interventricular de corazón fetal de rata <i>Wistar</i> día E13.5 técnica TUNEL.	56
Figura 15. Microfotografía de cortes histológicos atrio derecho de corazón fetal de rata <i>Wistar</i> día E16.5 técnica de TUNEL.....	57
Figura 16. Microfotografía de cortes histológicos de corazón fetal día E16.5 a nivel de los ventrículos técnica TUNEL.....	57
Figura 17. Porcentaje de células apoptóticas. Prueba caspasa 3 activada y TUNEL en atrios estadio E13.5.....	59
Figura 18. Porcentaje de células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL positivas a nivel de los ventrículos en el día 13.5 de gestación.	60
Figura 19. Células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL en el tabique interventricular de corazones fetales día 13.5.....	61
Figura 20. Porcentaje de células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL estadio E16.5 en atrios de corazones fetales.....	62
Figura 21. Cuantificación de células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL en ventrículos de corazones fetales estadio E16.5.	64
Figura 22. Porcentaje de células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL positivas en el tabique interventricular de corazones fetales estadio E16.5.	65

RESUMEN

Antecedentes

La ganancia excesiva de peso durante la gestación contribuye a un desbalance en el aporte de nutrientes que influye en la reprogramación de vías moleculares de la organogénesis, aumentando el riesgo de desarrollar anomalías congénitas en el corazón. Durante la cardiogénesis, la apoptosis actúa programando la muerte celular sin afectar el tejido que las rodea, controlando el número de células, y el remodelado de órganos. Por lo tanto, alteraciones en el proceso originan cambios en la estructura cardíaca en desarrollo.

Objetivo

Determinar el efecto de la obesidad materna sobre el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía en fetos de rata *Wistar*.

Materiales y Métodos

Se estableció un modelo de obesidad materna adquirida por dieta, en ratas *Wistar* adultas. Para el estudio de la apoptosis cardíaca se utilizaron corazones provenientes de fetos de ratas normopeso y obesas.

Se evaluó el perfil de apoptosis por cuantificación de células inmunomarcadas positivas para la caspasa 3 activada y células con núcleos fragmentados (TUNEL positivas). La cuantificación se realizó bajo microscopio de luz, en cinco regiones específicas del corazón fetal: atrios, ventrículos y tabique interventricular.

Posteriormente, se realizaron pruebas de significancia estadística, para contrastar las diferencias existentes entre los grupos. El software para el análisis estadístico de datos fue Excel (Microsoft Office 2013) y R, de libre acceso.

Resultados

El estadístico de prueba (valor p), para caspasa 3 activada en el estadio E13.5 fue significativo entre los grupos experimentales, en ventrículo derecho e izquierdo con un valor $p \leq 0.05$ y en el atrio izquierdo ($p \leq 0.040$) respectivamente. Para el estadio E16.5, fue significativo entre los grupos experimentales a nivel del tabique interventricular con un valor $p \leq 0.077$.

La evaluación de TUNEL en E13.5, solo mostró diferencias significativa en la región del atrio derecho con un valor $p \leq 0.003$.

En la edad gestacional E16.5, los grupos experimentales, solamente presentaron diferencias significativas en el atrio derecho y el tabique interventricular, con un valor $p \leq 0.05$.

Con base en los resultados de esta investigación se concluye que el biomodelo de obesidad materna adquirido por dieta de cafetería establecido en el Bioterio de la Universidad del Valle, afectó el proceso de apoptosis durante la cardiogénesis incidiendo en el desarrollo normal de las cámaras cardíacas que son compatibles con hipoplasia del ventrículo izquierdo, hiperplasia del atrio derecho e izquierdo y en la formación del tabique interventricular.

Este trabajo sienta las bases del establecimiento de una relación directa entre la obesidad materna y las malformaciones cardíacas, brindando un biomodelo que nos permite abordar esta patología desde las ciencias básicas, lo cual nos permitirá en un futuro cercano ahondar en la patogenia de la obesidad.

2. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo, es el producto de la investigación realizada sobre “Efectos de la obesidad materna sobre el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía de la rata *Wistar*”. Hace parte de la línea de investigación de biología tisular del grupo de tejidos blandos y mineralizados (TEBLAMI), se enmarca dentro del área de formación de la Maestría en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle.

Para efectos de comprender tanto los alcances de la investigación como los resultados obtenidos, es necesario hacer algunas precisiones acerca de diferentes conceptos relacionados con el tema de la cardiogénesis en la rata.

Esta investigación nos aportó conocimiento sobre el impacto que la obesidad materna, considerada una de las pandemias más recientes, tiene sobre el desarrollo embriológico de algunos órganos, en este caso, el corazón.

El propósito de este trabajo fue realizar un estudio que permitiera determinar el efecto de la obesidad materna sobre el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía en fetos de rata *Wistar*.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

3.1 Apoptosis y Obesidad

Actualmente la obesidad y el sobre peso, son considerados un problema de salud pública convirtiéndose en una epidemia mundial y en la principal causa de las comorbilidades, como la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, varios tipos de cáncer y otros problemas de salud que pueden conducir a una mayor morbilidad y mortalidad (1). Ha sido definida como la acumulación excesiva de grasa en el organismo que conlleva a un aumento de peso corporal con respecto al que correspondería según la estatura, el sexo y la edad de la persona. Es así que para el año 2000 la organización mundial de la salud (OMS) le dio estatus de epidemia global (2). Con mayor prevalencia en los países desarrollados y en la población adulta se ha incrementado dramáticamente en las últimas décadas, especialmente en el mundo occidental y en países desarrollados, reportándose mayor prevalencia en las mujeres que en los hombres (3).

Con base en el índice de masa corporal (IBM), se ha establecido la siguiente categorización, peso normal: 18.5–24.9 kg/m², con sobrepeso 25–29.9 kg/m², obesidad tipo I entre 30–34.9 kg/m², obesidad tipo II: 35–39.9 kg/m², y obesidad tipo III: 40 kg/m² o más (3). Datos epidemiológicos de la encuesta nacional en Salud y Nutrición, reportan que a partir de 2007-2008, el 28 a 32% de las mujeres en edad reproductiva, eran obesas y que el 7,2 a 8,4% de ellas eran mórbidamente obesas (índice de masa corporal (IMC) ≥ 40 kg / m²).

La Organización Mundial de la Salud predice que para el año 2015, aproximadamente 2.3 millones de adultos en todo el mundo presentan sobrepeso y más de 700 millones son obesos (3).

En Colombia, el estudio de Análisis de Situación de Salud realizado por la Universidad de Antioquia para el Ministerio de la Protección Social determinó que la obesidad alcanza un 13,7% con diferencia marcada por sexo, siendo del 8,8% en los hombres y 16,6% en las mujeres. En este estudio se estableció también que, la primera causa de mortalidad es ocupada por las enfermedades cardiovasculares, las cuales están asociadas en gran proporción con el sobrepeso y la obesidad (2)(4).

La obesidad y el sobrepeso previo al embarazo, así como la ganancia excesiva de peso durante la gestación son factores negativos que implican complicaciones para la embarazada, su feto y neonato (5). Por lo que las pacientes gestantes con obesidad son catalogadas como embarazo de alto riesgo. De acuerdo al índice de masa corporal (IMC) (6).

La prevalencia de la obesidad materna ha aumentado rápidamente en las últimas dos décadas. En Estados Unidos, alrededor del 64% de las mujeres en edad reproductiva tienen sobrepeso y el 35% son obesas, siendo este patrón similar en Europa. Existiendo, un vínculo adverso entre el ambiente intrauterino y el embrión o feto, bajo peso al nacer y posterior muerte fetal. A partir de modelos animales y estudios en humanos se ha sugerido que la obesidad materna también crea un efecto adverso en el medio ambiente uterino, el cual a largo plazo tiene efectos sobre la descendencia (7). La obesidad materna, provoca complicaciones en el embarazo, tales como diabetes gestacional, hipertensión y pre eclampsia y afecta el crecimiento fetal. El ambiente hormonal y bioquímico alterado para el desarrollo embrio/fetal, influye negativamente en el desarrollo de los diferentes órganos, por lo que hijos de madres obesas están sujetos a un mayor riesgo de muerte fetal, patrones de crecimiento alterado y anomalías congénitas (8). Siendo los principales defectos del corazón, del tubo neural y defectos orofaciales (9).

Durante el resto de la gestación existe mayor incidencia de diabetes mellitus gestacional, y muerte fetal entre otras. En cuanto a las complicaciones fetales y del recién nacido se incluyen macrosomía, muerte fetal y malformaciones congénitas. El impacto de la obesidad materna se extiende más allá de la vida intrauterina y neonatal, pudiendo generar complicaciones a largo plazo como obesidad, diabetes, hipertensión, síndrome metabólico y una variedad de enfermedades cardiovasculares entre las que se cuenta accidente vascular cerebral, infarto, insuficiencia cardíaca congestiva, angina de pecho y miocardiopatías (10) (11).

A nivel cardíaco, se ha reportado, durante el desarrollo una alta prevalencia de hipoplasia izquierda del corazón, transposición de vasos, defectos de cojines endocardiales, tetralogía de Fallot, defectos del septum ventricular, septum atrial y coartación de la aorta, en hijos de madres obesas (9).

Es muy poco lo que se conoce en relación a la formación de los cardiomiocitos en un ambiente obesogénico, pero es claro que en el adulto la homeostasis del músculo cardíaco depende de recambio continuo de las organelas por medio del proceso de autofagia. Las fases tempranas de obesidad visceral se caracterizan por acumulación de grasa en el miocardio, que induce un estado inflamatorio, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, que posteriormente se agravan con el tiempo, exacerbando estos procesos e induciendo la fibrosis cardíaca. La asociación del estado de obesidad con insulinoresistencia, produce un incremento en el daño de las células cardíacas que anula la capacidad de reparar los daños por medio del mecanismo de autofagia, dirigiendo a las células a muerte celular programada (apoptosis) (12).

Dada las limitaciones para estudiar los efectos de la obesidad materna en humanos durante la cardiogénesis, se hace necesaria la utilización de modelos animales, que permitan y sustenten estos estudios y generar nuevas propuestas

para el entendimiento de los diferentes mecanismos involucrados. En este sentido, diferentes estudios en modelos animales han sido empleados; por ejemplo en ratas Zucker obesas, se demostró que los cardiomiocitos presentan un incremento en los niveles de componentes pro apoptóticos de la familia Bcl-2, mientras que los miembros anti apoptóticos están disminuidos. Además, en el corazón de ratas obesas existe un incremento del **Citocromo c citosólico** (indicativo de la liberación mitocondrial de agentes apoptóticos). Sumado a un aumento en los niveles de **caspasa 9** y **caspasa 3 activada**. Este desbalance en los marcadores moleculares de la apoptosis indicaría un posible mecanismo que lleva a la falla cardíaca en esta patología (13).

Por otra parte, estudios recientes muestran los efectos de la apoptosis en la expansión del tejido adiposo, donde la muerte celular programada promueve el incremento en el recambio celular. Esta alta tasa de recambio celular puede ser monitoreada en sangre estudiando los niveles de DNA circulante. En mujeres embarazadas la hipertrofia del adipocito es el mecanismo principal por el cual aumenta el contenido de lípidos en el organismo pero se asocia también con el estímulo de un grupo de pre adipocitos de alto recambio que pueden crecer y diferenciarse (12).

De estos antecedentes se establece que el mecanismo de apoptosis aumenta su grado de activación en relación con la obesidad. Siendo la muerte celular programada un marcador de daño tisular inducido por esta patología.

3.1.1 Apoptosis y desarrollo cardíaco

Durante el proceso del desarrollo embrionario de un organismo o durante los procesos encaminados a mantener la homeostasis de éste, es necesario eliminar células no deseadas, por medio del proceso de apoptosis. Proceso genéticamente regulado y caracterizado por la activación de proteasas específicas (caspasas), que le confieren a la célula una morfología especial y que finaliza en la fagocitosis de la misma sin infiltrado inflamatorio.

En el sistema cardiovascular, como en otros sistemas del organismo, este tipo de muerte es un fenómeno fisiológico durante el desarrollo embrionario y fisiopatológico en la vida adulta. En el primer caso permite la eliminación de estructuras vestigiales, control del número de células y remodelación de las estructuras (14)(15). Por otra parte, su desregulación estaría implicada en la aparición y participación en la fisiopatología de diversas enfermedades cardíacas (13).

Durante la morfogénesis y remodelación de los tejidos cardiovasculares están implicados la regulación y proliferación celular, procesos que se encuentran coordinados por apoptosis, el cual contribuye al desarrollo del tracto de salida

embrionario, formación de válvulas cardíacas, sistema de conducción y remodelación de la musculatura coronaria en desarrollo y de la estructura arterial en respuesta a los cambios locales en la hemodinámica cardíaca (16).

Las zonas de muerte celular están relacionadas con la formación del septum, de las válvulas y de las estructuras vasculares. Las células apoptóticas identificadas han sido fundamentalmente mesenquimatosas. Aunque pocos miocitos o células endocárdicas son hallados en proceso de muerte o muertos, esto ha sido atribuido a que desaparecen rápidamente en la circulación (14)(15) .

Estos antecedentes, indican claramente la importancia del mecanismo de apoptosis en el desarrollo cardíaco normal. En la patología cardíaca adulta el proceso de apoptosis retoma su importancia frente a las señales inflamatorias de la obesidad, por lo cual es de interés evaluar si la obesidad materna puede inducir cambios en el patrón de apoptosis durante la cardiogénesis del embrión en desarrollo.

Recientemente se acuñó el término de epigenética nutricional para describir el efecto de los nutrientes sobre el ADN/cromatina y por tanto sobre la expresión de genes, siendo capaz de programar y reprogramar las conexiones biológicas con consecuencias multi-generacionales. Los principales tipos de información epigenética se generan a través de los siguientes procesos, eventos de programación y reprogramación, en los cuales, el embrión parece ser especialmente sensible a las adaptaciones inducidas por nutrientes en la expresión genética. De este modo, aquellos patrones o perfiles de expresión genética durante la fase embrionaria pueden persistir y condicionar los patrones de expresión en los adultos. Se postula la teoría de que los nutrientes pueden actuar en las fases tempranas de la vida reprogramando los efectos adversos en la vida adulta, dando lugar a riesgos para hipertensión, obesidad, resistencia a insulina y enfermedades cardiovasculares (17).

El efecto de la sobrealimentación materna podría inducir cambios severos en el perfil del patrón de apoptosis durante el desarrollo embrionario generando alteraciones en la formación del corazón como cambios más sutiles que serán puestos en evidencia en el individuo adulto frente a situaciones de estrés tisular, lo que explicaría la alta asociación de hijos de madres con sobrepeso y/u obesidad con enfermedades cardiovasculares.

De acuerdo a todo lo anteriormente expuesto, se plantea el siguiente problema de investigación:

¿La obesidad materna genera cambios en el patrón de apoptosis durante la cardiogénesis tardía de la rata *Wistar*?

4. MARCO TEORICO

4.1. Antecedentes

En las últimas décadas la obesidad y el sobrepeso, se han incrementado dramáticamente a nivel mundial. Alguna vez considerados problemas de países con ingresos altos, la obesidad y el sobrepeso están en aumento en los países con ingresos bajos y medios, especialmente en las áreas urbanas (18). Según estimaciones actuales de la Organización mundial de la Salud, en el 2014 alrededor del 13% de la población mundial adulta (un 11% de los hombres y un 15% de las mujeres) eran obesos, y el 39% de los adultos mayores de 18 años (un 38% de los hombres y un 40% de las mujeres) tenían sobrepeso (19). Estas estimaciones muestran que la sobrenutrición afecta en mayor parte a la población femenina, condición similar a la reportada en el año 2010 por la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia (19). Esto impacta de manera directa en una mayor proporción de mujeres en edad fértil que inician su embarazo con sobrepeso u obesidad, incrementando los riesgos de complicaciones como preeclampsia, diabetes mellitus gestacional, parto pretérmino, parto instrumentado o por cesarí; así como también complicaciones para el feto y el neonato, como defectos a nivel de tubo neural y el desarrollo de los miembros, malformaciones cardíacas y orofaciales (20)(21).

4.2. Biomodelos como herramienta de investigación de enfermedades humanas

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las investigaciones en ciencias biomédicas. Son utilizados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano (22).

Por ejemplo, en el estudio de la obesidad como resultado de un desequilibrio prolongado de la ingesta de energía y el gasto energético; se han establecido cinco diferentes modelos animales, que han proporcionado una contribución fundamental para el desarrollo de la comprensión de los parámetros básicos que regulan los componentes del equilibrio energético, orientándose entonces los estudios a la fisiología y a las bases genéticas (23). Los primeros modelos reflejan mutaciones en un único gen que se han presentado espontáneamente en colonias de roedores y, posteriormente, se han caracterizado. El segundo enfoque es para acelerar artificialmente la tasa de mutación al azar mediante el tratamiento de roedores con mutágenos o radiación. El tercer tipo de modelos son ratones y ratas, en los cuales un gen específico ha sido interrumpido o sobre expresado. Un

cuarto grupo de animales, se refieren a experimentos donde la cría selectiva se ha utilizado para derivar cepas de roedores que difieren en su grado de gordura. Por último, se han realizado estudios de otras especies, incluyendo primates no humanos y perros. Además de los estudios de la base fisiológica y genética de la obesidad (23).

Los estudios de modelos animales también han referenciado acerca de los aspectos ambientales de esta condición; para lo cual se han utilizado murinos como modelos experimentales para la realización de diferentes investigaciones que exploran las respuestas de los animales al alto contenido de grasa o alto contenido de grasa / alto contenido de azúcar, empleando dietas de cafetería, así como estudios de fármacos candidatos a recuperar el balance energético (24) (25).

Es así que la utilización de murinos se constituye como una de las especies más utilizadas en las investigaciones biomédicas, ya que ofrecen una serie de ventajas como son: el tratarse de un mamífero, en el cual gran parte de los procesos bioquímicos y fisiológicos son muy similares con los humanos. El tiempo generacional es muy corto y tiene un alto índice reproductivo, su talla es pequeña y son relativamente dóciles. Se puede controlar con relativa facilidad las variables ambientales, más precisamente el macro y microambiente fundamentales para el desarrollo correcto de los experimentos, permitiendo su fácil reproductividad, su mantenimiento en cautiverio es fácil y económico. Dentro de los mamíferos, junto con la especie humana es de las más estudiadas y se conocen los mapas genéticos así como la secuencia completa de su genoma (26).

4.3. Anatomía del corazón en murinos

El corazón se encuentra ubicado en el tórax, entre los dos pulmones y en posición ventral respecto a la columna vertebral, esófago, tráquea y aorta dorsal. Tanto el corazón como las grandes arterias y venas están cubiertos por el pericardio, constituido por una capa celular delgada y transparente con depósitos de grasa. Posee cuatro cavidades; sus dos atrios, cada una de las cuales contiene un componente venoso, un cuerpo, un apéndice, y un vestíbulo de la válvula AV (atrio ventricular), son física y funcionalmente separados por un tabique atrial. El septo atrial está formado por varios componentes, incluido el septum primum (SP) anclado por una base muscular y el septum secundum (SS), la base muscular del septum primum forma el suelo, o el borde antero-inferior, de la fosa oval mientras que el septum secundum contribuye a su borde superior (27). Las otras dos cámaras corresponden a los ventrículos (segmento ventricular), constituyendo una cavidad derecha y una izquierda. Las cámaras atriales y apéndices auriculares son muy pequeñas.

Existen otras variaciones cuando se compara el corazón de los murinos con el de humano, por ejemplo: 1) el tabique AV (AVS) es una estructura relativamente gruesa y sobre todo muscular, 2) El componente muscular de los IVS no es tan compactos, 3) en el corazón del ratón las venas pulmonares se unen en una confluencia pulmonar detrás del atrio izquierda y 4) en el corazón del ratón la vena cardinal izquierda superior (LSCV) persiste en la vida postnatal (28).

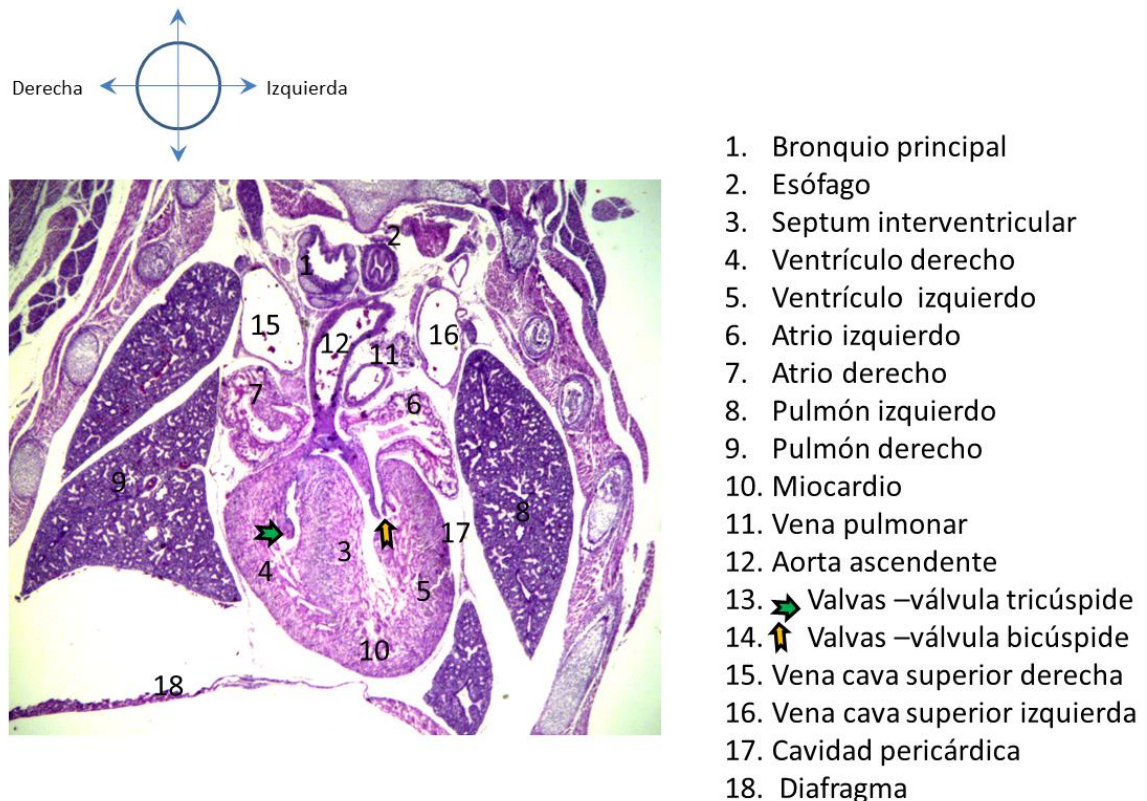


Figura 1. Corte Coronal de tórax de ratón *Mus musculus* cepa CFW. Estadío E17. Aumento 75X estereoscopio Meiji RZT techno (Meiji). Cámara fotográfica acoplada (DMS 750).

4.3.1. Histología del corazón

Desde el punto de vista histológico, el corazón de los mamíferos, está constituido por: una pared, el esqueleto fibroso y el sistema de conducción (29). La pared se encuentra constituida por un endocardio interno, formado por células endoteliales que son continuas con el endotelio de los vasos que entran y salen del corazón.

El endocardio juega un rol complejo y crítico en el desarrollo del corazón, particularmente en el desarrollo y formación de válvulas y tabicación (30). Recubre

por completo los atrios y los ventrículos, además de cubrir todas las estructuras que se proyectan en ellos como válvulas, cuerdas tendinosas y músculos papilares. Consiste en tres (3) capas, la interna compuesta de endotelio, al que brinda sostén el tejido conectivo laxo, la capa media formada por tejido conectivo denso con numerosas fibras elásticas, en la parte externa de esta capa se observan fibras de músculo liso. La capa más profunda comprende tejido conectivo de disposición irregular y suele incluir tejido adiposo (30).

La túnica media, comprende el miocardio, consiste en una red de fibras de músculo cardíaco anastomosadas con endomisio en su intersticio. El músculo cardíaco se compone de células musculares interconectadas en sus extremos por discos intercalares (29)(31). El epicardio o túnica serosa, está compuesto por una capa de células mesoteliales en la superficie externa del corazón y su tejido conjuntivo subyacente. Los vasos sanguíneos y los nervios que irrigan e inervan el corazón transcurren en el epicardio y están rodeados por tejido adiposo (31). El sistema de conducción, consiste en células del miocardio especializadas en desencadenar impulsos de contracción y conducirlos por el corazón, estas fibras musculares modificadas (miocitos conducentes), regulan las contracciones de atrios y ventrículos de manera sincronizada (29). Histológicamente, los cardiomiocitos nodales son pequeños, poseen pocos filamentos de actina y miosina y un retículo sarcoplasmático escasamente desarrollado (28).

El esqueleto fibroso se observa en el origen de la aorta y del tronco de la vena pulmonar (en los ventrículos izquierdo y derechos respectivamente), igualmente, los orificios atrio ventriculares están rodeados por anillos de tejido conectivo fibroso (29). El esqueleto fibroso, provee puntos de fijación del miocardio atrial y ventricular, actúa como aislante eléctrico al impedir el libre flujo de los impulsos eléctricos entre atrios y ventrículos (32).

4.3.2. Desarrollo embrionario del corazón en murinos

En el embrión de los vertebrados, el corazón es el primer órgano funcional; su desarrollo comienza en la gastrulación con la formación de mesodermo pre cardíaco (27). Durante la cardiogénesis, se llevan a cabo diferentes procesos: reclutamiento de células, fusión y tabicación, facilitando así la formación del corazón con cuatro cámaras. Las primeras células progenitoras cardíacas son identificadas incluso antes de la gastrulación a partir del epiblasto hacia el día E7-7,5. Posteriormente, se da una fusión en la línea media ventral en sentido cráneo-caudal originándose, un corazón tubular primitivo hacia el día E8-9 después del coito (dpc); esta formación es de secuencia céfalo caudal por lo cual se forma primero la porción ventricular y a continuación la aurícula y por último el seno venoso. Este corazón primitivo, contiene una combinación de miocardio en la parte externa y endocardio en el interior. Los cardiomiocitos son claramente

identificables y la presencia de miofibrillas se ve en el canal atrioventricular (AV) y en la región del tracto de salida (27)(29).

Para el día E8.5 a 9.5 se realiza la primera transformación, originándose una estructura en forma de S con el fin de facilitar la adecuada madurez y posicionamiento de las cámaras cardíacas, lo que origina cambios de posición de futuro atrio derecho por encima del futuro ventrículo derecho (33).

Para el mismo tiempo, la gelatina cardíaca que reviste el interior del corazón tubular, se remodela de manera desigual, a nivel de los cojines endocárdicos, en el canal atrioventricular (AV) y en el tracto de salida. Durante esta transformación en el corazón tubular se distingue varios segmentos: los cuernos, el seno venoso izquierdo y derecho, el atrio primitivo, el ventrículo, el segmento de entrada y el segmento de salida del ventrículo. Posteriormente, se inicia una tabicación a nivel del atrio y el ventrículo para formar un corazón de cuatro cámaras (33).

Los cojines endocardicos atrio ventriculares, se remodelan y contribuyen en la formación de las estructuras septales AV y válvulas AV (mitral y válvula tricúspide), y los tejidos del tracto de salida contribuyen en la formación de las válvulas semilunares de la aorta y la arteria pulmonar y a la septación del tracto de salida (28)(34)(35).

Simultáneamente, hacia el día E8.5, se establece el sistema de conducción de impulsos (28), sin embargo otros autores referencian este evento a partir de E9.5. Este sistema es el encargado del inicio y conducción de las señales eléctricas en el corazón, lo que conlleva a contracciones sincronizadas y rítmicas de las aurículas y los ventrículos, en los roedores este sistema está poco desarrollado; lo constituye los nodos sinoatrial (SAN) y atrioventricular (AVN) y la conducción eléctrica de los ventrículos. Este último comprende el haz atrio ventricular, las ramas del haz izquierdo y derecho y el sistema periférico ventricular de conducción (PVC). En el día E11.5 se diferencia el nodo sinoatrial en la pared antero medial de la vena cardinal común, que en última instancia, dará lugar a la vena cava superior. El desarrollo del AVN comienza a diferenciarse hacia el día E13, a partir de un grupo de células en la pared posterior del canal AV, hacia el lado derecho. El haz de His y el paquete del haz AV discurren a través de la parte superior del IVS (septum interventricular) , se origina hacia el día E15.5 y a nivel de la aorta se bifurca en las ramas derecha e izquierda (36).

El esqueleto fibroso, se diferencia después que el corazón tubular hace el giro a la derecha, siendo distinguibles los 4 anillos o zonas de transición en: 1) el anillo sinoatrial entre el segmento de SV y el atrio primitivo, 2) el anillo AV entre el atrio primitivo y el ventrículo primitivo izquierdo 3) el anillo principal o pliegue que separa el ventrículo izquierdo primitivo del ventrículo derecho primitivo y 4) el anillo ventrículo-arterial colocado en la unión del ventrículo derecho primitivo con el tronco o vías de salida (28).

Otros autores referencian sobre la embriogénesis del corazón en roedores, dos periodos: 1) Premorfogénico: cuando el corazón no se ha manifestado morfológicamente, distinguiéndose solamente el grupo de células que le darán origen, iniciándose este proceso en la etapa de blástula y 2) Morfogénico, cuando existe una manifestación morfológica del órgano y se inicia con el corazón en forma de tubo recto (32).

Por el contrario, Franco et al 2002, referencian que el proceso de cardiogénesis, se lleva a cabo en seis fases que coordinan para dar origen al órgano. En la primera etapa, las crestas precardiáticas, reciben señales del ectodermo y endodermo para formar futuros cardiomiocitos. En la etapa dos, las crestas cardíacas se fusionan en la línea media embrionaria para originar un tubo cardíaco primitivo, formado por miocardio y endocardio, las cuales están separadas por una matriz de tejido (gelatina cardíaca). Cuando el tubo cardíaco realiza un giro a la derecha constituye el primer signo morfológico de cambio de asimetría, evento característico de la tercera etapa. La diferenciación de regiones distinguibles, como atrio, canal atrioventricular, ventrículo embrionario y tracto de salida, caracterizan la cuarta fase (35).

En la quinta fase, se da la formación de un tabique para obtener un corazón con un doble circuito. Cuando se desarrolla el tabique interventricular se genera los ventrículos derecho e izquierdo. El atrio primitivo se divide en atrio derecho e izquierdo por la formación de complejos septos interauriculares. La separación de los tractos de entrada y tractos de salida, y del canal atrioventricular, se origina de la fusión del cojín cardíaco mesenquimático y su reemplazo posterior por los miocardiocitos. Durante la sexta etapa, se da una reestructuración para que se complete la formación de las dos cámaras atriales y dos cámaras ventriculares, con sus respectivas vías de entrada y salida (35) (33).

Durante todos estos procesos de morfogénesis cardíaca y remodelación de tejidos, están implicados la regulación y proliferación celular, al igual que mecanismos coordinados de apoptosis. En el corazón, una clara evidencia apunta hacia la apoptosis focal como contribuyente al desarrollo del tracto de salida embrionario, válvulas cardíacas, sistema de conducción, y la vasculatura coronaria en desarrollo (16).

4.4 Definición proceso de apoptosis

La apoptosis es un proceso biológico de muerte programada o suicidio celular presente en todas las células de los metazoarios. Mantiene un equilibrio entre la regeneración de las células pluripotenciales o células madre y la eliminación de células que ya han servido con su propósito, que se han reproducido en exceso, o en las que existe daño genético irreparable (37). Por lo tanto, durante la transformación del embrión hasta el organismo adulto, millones de células mueren sin dejar cicatrices ni activar repuestas inflamatorias. Este fenómeno no tiene lugar de una forma aleatoria, sino que se trata de un proceso activo, bien definido, en el que las células están destinadas a morir en un tiempo determinado. En condiciones fisiológicas las células privadas de factores de supervivencia, lesionadas o envejecidas “se suicidan” mediante un programa de muerte celular regulado de forma ordenada (38). Está implicada en importantes procesos durante el desarrollo de estructuras, incluyendo las extremidades, varios sistemas y órganos por ejemplo los riñones y el corazón (35)(39).

Se relaciona con la formación de múltiples estructuras, histogénesis y remodelación tisular, lo que contribuye a mantener la homeostasis en los organismos. ***La funcionalidad de la muerte celular es diferente durante el desarrollo embrionario, durante el cual, se da la eliminación de estructuras vestigiales (muerte celular filogenética); control del número de células en espacio y tiempo y la remodelación de las estructuras, es decir la muerte celular morfogenética. Existiendo diferencias regionales de sitios de muerte celular según la especie*** (40) .

4.4.1. Características del proceso de apoptosis

Los procesos apoptóticos se caracterizan por cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares como los que se describen a continuación (41) (42).

1. *Aumento brusco de la densidad intracelular.* El retículo endoplasmático se dilata, formando vesículas y fusionándose con la membrana plasmática, eliminando así su contenido al medio extracelular. Esta rápida, pero selectiva, salida de fluidos e iones intracelulares se encuentra mediada por transportadores iónicos.
2. *Incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre citoplasmática $[Ca^{+2}]$,* diferencia clara frente a los procesos de necrosis, donde su aumento es drástico.
3. *Cambios en la composición de la membrana celular.* Translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos y, de esta manera, evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación.

4. *Alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto.* Como consecuencia aparece una deformación, resultado de la actividad de las proteasas, modificándose el transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas.
5. *Aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas* necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular.
6. *Condensación y fragmentación de la cromatina*, por acción de endonucleasas endógenas, en fragmentos denominados oligonucleosomas.

4.4.2 Etapas del proceso de apoptosis

Durante los procesos de muerte celular se pueden distinguir varias fases a saber:

Fase de activación

Los procesos apoptóticos pueden ser activados por una inducción negativa (como la pérdida de una actividad supresora, la falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos con las células que la rodean) o por una inducción positiva como es el resultado de la unión de un ligando a un receptor o la recepción de señales conflictivas. Los receptores que participan en los procesos de muerte celular se pueden clasificar en dos grupos: aquellos cuya activación siempre conduce a la muerte de la célula, conocidos como «receptores de muerte» —receptor Fas y receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) — y aquellos que desempeña una función fisiológica, pero su sobre-activación puede conducir también a la muerte (receptores de glutamato, de trombina y canales iónicos dependientes de voltaje) (42).

Fase de decisión

Una vez que la célula recibe una señal de muerte, los posibles destinos celulares son dos: la supervivencia o la muerte. En esta fase se ha situado a la mitocondria como organelo fundamental. Uno de los acontecimientos principales que tienen lugar en la mitocondria es la alteración de la permeabilidad de sus membranas debido a la formación de un complejo multi-proteico (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial) que conduce a la liberación del contenido intramitocondrial como el citocromo C, el factor inductor de apoptosis y miembros de la familia de las caspasas. Otros episodios son alteraciones en la cadena transportadora de electrones, pérdida del potencial electroquímico de membrana y cambios del ciclo metabólico de óxido/reducción (42).

Fase de ejecución

Una vez que la célula se encamina hacia la muerte, en su interior se produce una serie de procesos bioquímicos que conducen a la degradación de proteínas y de la cromatina.

La proteólisis, a diferencia de la mayoría de las modificaciones postranslacionales, es irreversible y quizás por ello es altamente específica. Regula fenómenos biológicos críticos en los que se ve involucrado un grupo reducido de sustrato. La mayoría de las proteasas son sintetizadas como precursores de muy baja actividad catalítica que son activados por procesamiento proteolítico mediado por la unión a un cofactor o por la retirada de un inhibidor (42).

4.4.3 Caspasas asociadas a los procesos de apoptosis

La apoptosis es un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de una serie de cisteín proteasas denominadas caspasas (cysteinil aspartate-specific proteases) acompañado por una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición de la célula. Dentro de este proceso hay una gran cantidad de interacciones proteicas como entrecruzamiento, rompimientos, síntesis y degradación, además de un reordenamiento de estructuras celulares, elevando significativamente el consumo de energía por parte de la célula, logrando así su efectiva degradación para finalmente ser “reciclada” por parte de otras células (38) (43).

Entre las proteasas implicadas en los procesos de muerte celular se encuentran las caspasas, las calpaínas, y el complejo multiproteico denominado proteosoma. Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que han sido reconocidas como los homólogos en mamíferos del producto del gen pro-apoptótico ced-3 del nematodo *C. elegans*. Éstas se organizan en tres grupos: **caspasas implicadas en la producción de citocinas** (caspasas 1, 4, 5 y 13), **caspasas de señalización o de activación de otras caspasas** (caspasas 2, 8, 9 y 10) y **caspasas efectoras o ejecutoras de muerte** (caspasas 3, 6 y 7) las cuales hidrolizan sustratos selectivos. La activación de las caspasas puede tener lugar en respuesta a estímulos tanto extracelulares como intracelulares (43)(44).

4.4.4 Mecanismos celulares que controlan la activación y función de las caspasas

Las transformaciones morfológicas y estructurales que sufren las células en las cuales se desencadena un proceso de apoptosis, pueden iniciarse por dos vías de señalización: **extrínseca e intrínseca** (Figura 1). La cascada apoptótica extrínseca o de membrana es activada a través de los receptores de la familia

TNF tipo I (p55) que poseen dominios de muerte. Cuando estos receptores se unen a ligandos específicos reclutan moléculas como FADD (*Fas Associated Death Domain*) involucrada en la activación de la Caspasa 8. En el caso de TNF, a través de otras moléculas señalizadoras como TRAF2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 2*), se dispara simultáneamente una cascada protectora de apoptosis, con la activación de NF- κ B, vía la degradación de su factor inhibidor I κ B y la translocación del factor activo al núcleo(45)(46).

La vía intrínseca o mitocondrial es activada en forma directa, independiente de un receptor de membrana, por daño al ADN (entre otras señales). En ambos casos, las proteínas de la familia Bcl-2: Bid, Bax, Bim o Bad, pueden cambiar su localización solubles en el citosol o anclándose a membranas. Cuando se localizan en la membrana mitocondrial, facilitan la salida del Citocromo c al citosol. Otros miembros de la familia Bcl-2, cuyo rol es anti-apoptótico, como Bcl-2 y Bcl-xL compiten con los pro-apoptóticos en la regulación de este proceso. Una vez en el citosol, el Citocromo c se asocia con proteínas adaptadoras y la pro-caspasa 9, para formar el apoptosoma, que lleva a la activación de esta caspasa. Tanto la vía de membrana como la mitocondrial a través de las caspasas iniciadoras, convergen en la activación de la caspasa 3, que es una caspasa efectora que actúa sobre otros substratos específicos para manifestar el fenotipo apoptótico. Siendo la caspasa 3 activada un paso clave para la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN en el proceso de apoptosis (43)(45)(46).

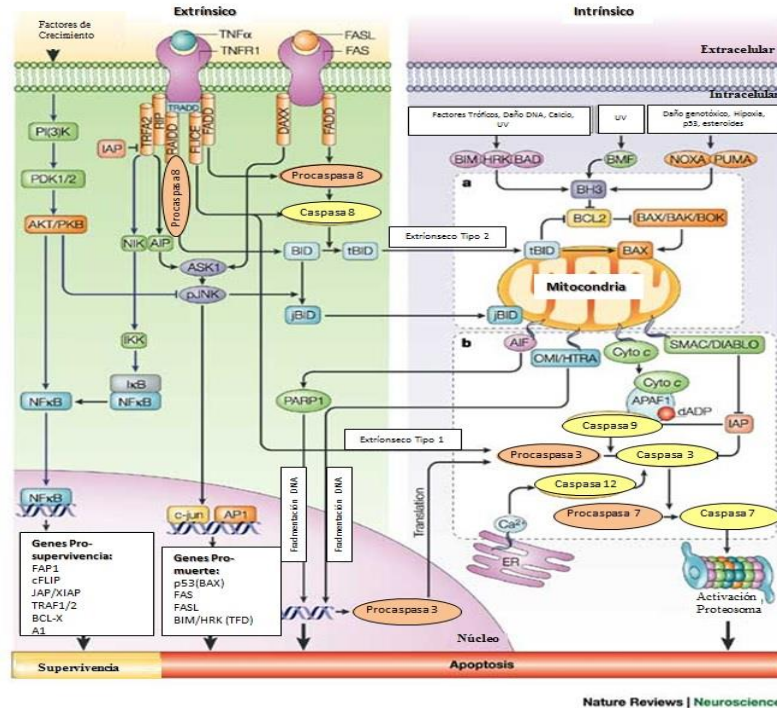


Figura 3. Vías de señalización extrínseca e intrínseca en el proceso de apoptosis. La vía extrínseca, es mediada por la activación en la superficie celular de receptores de

muerte (FasL), los cuales se unen a su ligando de muerte, reclutándose así factores citosólicos (FADD y caspasa 8). Se formando el complejo DISC, se lleva a cabo la activándose de las caspasas iniciadoras (caspasa 8). Seguidamente se rompe este complejo e iniciándose la activación de las caspasas efectora (caspasa 3). La vía intrínseca se inicia en respuesta a un estímulos generado dentro de la célula (activación de oncogenes y/o daño del ADN). Esta vía es mediada en la mitocondria. En respuesta a estímulos apoptóticos diversas proteínas son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. Algunas de las proteínas bien caracterizadas incluyen: el citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF (factor inductor de apoptosis), EndoG (endonucleasa G). Se inicia la activación de la caspasa 9 y esta a su vez activa a la caspasa efectora 3 (43)(47). **Fuente Tomada** (48).

4.4.5 Apoptosis y desarrollo cardíaco

Durante el proceso del desarrollo embrionario de un organismo o durante los procesos encaminados a mantener la homeostasis de éste, es necesario eliminar células no deseadas, por medio del proceso de apoptosis. Proceso genéticamente regulado y caracterizado por la activación de proteasas específicas (caspasas), que le confieren a la célula una morfología especial y que finaliza en la fagocitosis de la misma sin infiltrado inflamatorio. En el sistema cardiovascular, como en otros sistemas del organismo, este tipo de muerte es un fenómeno fisiológico durante el desarrollo embrionario y fisiopatológico en la vida adulta. En el primer caso permite la eliminación de estructuras vestigiales, control del número de células y remodelamiento (14) (49). Por otra parte, su desregulación estaría implicada en la aparición y participación en la fisiopatología de diversas enfermedades cardíacas (13).

El corazón es el primer órgano funcional que se forma a partir de la tercera semana posterior a la concepción, tiempo en el cual ya es posible observar el latido cardíaco. Esta adquisición temprana de la funcionalidad se debe a que el subsiguiente desarrollo del embrión depende del sistema circulatorio para la distribución y el intercambio de nutrientes, oxígeno y productos de desecho. Por lo tanto, la morfogénesis cardíaca requiere del re arreglo y la proliferación celular, cambios en la interacción célula-célula, célula-matriz extracelular y la remodelación tisular. Como se introdujo previamente, durante el desarrollo cardíaco la muerte celular programada, es un evento fisiológico finamente regulado en tiempo y espacio, por lo que el proceso apoptótico, induce la supresión de estructuras vestigiales, el control del número de células y el remodelamiento del corazón (49).

Proceso que juega un papel importante en el desarrollo del corazón, tanto del pollo, ratón y humanos (49). En embriones de ratón 21 zonas de muerte celular programada han sido identificadas entre los días E13 a E17 de gestación (40). Siendo los principales lugares de apoptosis, los cojines del tracto de salida, los cojines atrioventricular, las válvulas semilunares en desarrollo y las paredes de la

aorta y el tronco pulmonar (49). Del mismo modo, patrones apoptóticos se realizan tanto en el miocardio como en los cojines endocárdicos en distintos tiempos durante el desarrollo y en las regiones atrioventriculares (AV) (50).

Durante la etapa de formación del bucle del corazón primitivo tubular, el proceso de apoptosis participa, en la formación de los tractos de salida entre los atrios, dilatación de las cámaras, muscularización del infundíbulo, formación del tabique atrio y ventricular, en la diferenciación de las válvulas y la formación de la vasculatura coronaria. Igualmente, es parte de los mecanismos de diferenciación celular (51) (52).

La apoptosis está relacionada con la morfogénesis de las cuatro cámaras y la vasculogénesis en el órgano. Llevándose a cabo en momentos y regiones específicas del órgano (53). En la base ventral del tracto de salida (OFT) donde se conecta con el ventrículo y en el miocardio del OFT (50), a nivel del epicardio y otras regiones donde la apoptosis se detecta a partir de E9 y persiste hasta que se cubre completamente el corazón y el OFT hacia el día E11 (15).

Para el día E10.5-E18.5, otras regiones cardíacas bajo influencia del proceso de apoptosis, es en el ápice ventricular y surco interventricular. En la región proximal a la aorta es evidente hacia el día E13.5 del desarrollo embrionario (15). Todo el proceso entonces, es coordinado en diferentes etapas en las cuales el corazón se remodela y organiza para dar origen al órgano definitivo y funcional (35)(39)(34).

Regula los mecanismos que implican a los cardiomiocitos de las zonas compactas y trabecular de los ventrículos, desde el día E11 al día 16 en la cardiogénesis del ratón (16). Siendo reportado por otros autores que las células del trabeculado del ventrículo derecho sufren apoptosis hacia los días E13.5-E14.5 (15). Durante la formación de las válvulas, de la aorta y el tronco pulmonar, y la parte superior del tabique interventricular y morfogénesis ventricular (53).

Durante la formación de los cojines cardíacos, se originan unas expansiones constituidas de matriz extracelular (gelatina cardíaca), en los sitios de conexiones atrioventricular y ventriculoarterial (válvulas mitral y tricúspide). Así como en el nódulo atrioventricular (16).

Los estudios realizados por Lakhani et al. (2006) muestran que las caspasas efectoras 3 y 7 son clave mediadores en eventos mitocondrial de la apoptosis. Referenciando que ratones deficientes en caspasas 3 y 7 murieron inmediatamente después del nacimiento por defectos en el desarrollo cardíaco. El examen histológico de doble knockout (para caspasa 3 y 7) en los corazones del ratón reveló dilatación de los atrios, desorganización y no compactación de la musculatura del ventrículo. Los autores concluyeron que la caspasa 3 controla la fragmentación del ADN y cambios morfológicos de la apoptosis y la caspasa 7 parece ser más importante para la pérdida de la viabilidad celular aunque el papel combinado de ambas caspasas es crucial (54).

Otros autores referencian, zonas de muerte y células apoptóticas identificadas fundamentalmente mesenquimatosas y que pocos miocitos o células endocárdicas son hallados en proceso de muerte o muertos, suceso atribuido a que desaparecen rápidamente en la circulación (14) (15).

Estos antecedentes, indican claramente la importancia del mecanismo de apoptosis en el desarrollo cardíaco normal. En la patología cardíaca adulta el proceso de apoptosis retoma su importancia frente a las señales inflamatorias de la obesidad, por lo cual es de interés evaluar si la obesidad materna puede inducir cambios en el patrón de apoptosis durante la cardiogénesis del embrión en desarrollo.

Recientemente se acuñó el término de epigenética nutricional para describir el efecto de los nutrientes sobre el ADN/cromatina y por tanto sobre la expresión de genes, siendo capaz de programar y reprogramar las conexiones biológicas con consecuencias multigeneracionales. Los principales tipos de información epigenética se generan a través de los siguientes procesos, eventos de programación y reprogramación, en los cuales, el embrión parece ser especialmente sensible a las adaptaciones inducidas por nutrientes en la expresión genética. De este modo, aquellos patrones o perfiles de expresión genética durante la fase embrionaria pueden persistir y condicionar los patrones de expresión en los adultos. Se postula la teoría de que los nutrientes pueden actuar en las fases tempranas de la vida reprogramando los efectos adversos en la vida adulta, dando lugar a riesgos para hipertensión, obesidad, resistencia a insulina y enfermedades cardiovasculares (17).

El efecto de la sobrealimentación materna podría inducir cambios en el perfil del patrón de apoptosis durante el desarrollo embrionario generando alteraciones en la formación del corazón. Estas alteraciones podrían mostrar un abanico de defectos dependiendo de la severidad en el cambio del patrón de apoptosis, lo que podría conducir desde la aparición de defectos cardíacos congénitos hasta cambios más sutiles que serán puestos en evidencia en el individuo adulto frente a situaciones de estrés tisular, lo que explicaría la alta asociación de hijos de madres con sobrepeso y/u obesidad con enfermedades cardiovasculares.

4.4.6 Obesidad y alteraciones cardíacas

En humanos, son múltiples los reportes acerca de la relación de la obesidad y alteraciones cardíacas, ya que la obesidad es un factor de riesgo importante para la enfermedad cardiovascular y la diabetes. Se asocia con una mayor incidencia de hipertrofia del ventrículo izquierdo (LV), de cardiomiopatía e insuficiencia cardíaca y muerte. La leptina, regula la ingesta de alimentos, el peso corporal y el

almacenamiento de tejido adiposo y la homeostasis. Por lo que ratones con el gen db presentan alteraciones en la regulación de la leptina y resistencia a la insulina. El gen DB, está presente en el corazón y modula numerosos efectos de la insuficiencia cardíaca y la hipertensión. La apoptosis de los miocitos cardíacos se incrementa en la insuficiencia cardíaca. Aunque la desregulación de la leptina puede aumentar la apoptosis a través vías de lipotoxicidad, los mecanismos de apoptosis de los miocitos cardíacos se desconoce (55).

Otros estudios, referencian que la obesidad se asocia con cambios estructurales y funcionales en el corazón de los seres humanos y modelos animales, generando cambios a nivel del ventrículo izquierdo (VI), hipertrofia del atrio izquierdo (LA), ampliación y alteración sistólica del ventrículo izquierdo (VI). Por lo que se asume que la obesidad a largo plazo, dará lugar a insuficiencia cardíaca. Asociados con otros factores de riesgo de desarrollar también, hipertensión, diabetes, hiperlipidemia (56) y disfunción del corazón en estados de obesidad inducida por dieta que conlleva a la disminución de la potencia cardíaca (57).

Estudios sobre la composición de los tejidos cardíacos de sujetos obesos son pocos en humanos, lo que ha hecho necesario el uso de biomodelos animales que pueden no reflejar con exactitud la condición humana, pero que dan soporte a los resultados. Igualmente, estudios en autopsias han permitido identificar diferencias en los tejidos del corazón de sujetos obesos y no obesos. En general, estos estudios han demostrado hipertrofia cardíaca, además de un grado variable de la enfermedad arterial coronaria, incremento de grasa en el epicardio e infiltración en el miocardio (54).

Pocos estudios se han centrado en la incidencia de la obesidad en el ventrículo derecho, reportando un ligero incremento en el tamaño de la cavidad y espesor de pared en sujetos obesos en comparación con un grupo de referencia de peso normal (56).

En modelos de obesidad inducidas por dieta, en los que se han utilizado ratones y ratas se ha reportado hipertrofia de ventrículo izquierdo (HVI), aunque existen diferencias en la tensión entre las especies y los efectos dependen de la edad. En este sentido, algunos investigadores, han referenciado hipertrofia cardíaca en los corazones de ratones ob/ob jóvenes, por el contrario, otros sólo han observado este fenotipo en los animales adultos, por el contrario otros sólo han observado este fenotipo en los animales adultos. Aunque en ratas Sprague-Dawley para un máximo de 14 semanas de edad no se ha asociado con esta alteración. Por el contrario en ratas *Wistar*, con un periodo de alimentación de 7 semanas y dietas con alto contenido de grasa, las ratas parecen atenuar la presión de sobrecarga con hipertrofia de ventrículo izquierdo (56).

De todos estos estudios se desprende una asociación directa entre la obesidad y presencia de alteraciones cardíacas, aunque mucho se conoce

en la modificación macroscópica que presenta este órgano frente a esta patología, los cambios a nivel histológico del corazón de los individuos obesos adultos así como los mecanismos de apoptosis, permanecen en estudio.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar **el efecto de la obesidad materna sobre el** patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía en fetos de rata *Wistar*.

5.1.2 Objetivos específicos

5.1.2.1. Evaluar la inmunomarcación y localización de la caspasa 3 activada en los estadios E13.5 y E16.5 procedentes de rata normopeso y obesa

5.1.2.2 Establecer la distribución de células con núcleos fragmentados en los estadios E13.5 y E16.5 procedentes de rata normopeso y obesa

6. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS

Como hipótesis de este trabajo de investigación, se plantea:

Ho: La obesidad materna en ratas *Wistar* no genera cambios en el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía de su descendencia.

Ha: La obesidad materna en ratas *Wistar* genera cambios en el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía de su descendencia.

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 Tipo de estudio

Estudio experimental.

Los biomodelos maternos utilizados fueron seleccionados al azar y suministrados por el Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, el cual cumple con los requerimientos establecidos en las normas nacionales e internacionales recogidas en el manual del Bioterio de la Facultad de Salud, Ley 84 de 1989; Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council y reglamento del Bioterio (Resolución No. 171 de Noviembre 10 de 2004 del Consejo de la Facultad de Salud).

7.2 Selección de la muestra corazones fetales

Para la evaluación de la morfología cardíaca fueron evaluados $n=40$ corazones procedentes del grupo control y ($n=24$) corazones procedentes del grupo obeso en estadio E16,5.

7.2.1. Criterios de inclusión corazones fetales

Se emplearon 12 corazones fetales procedentes de las ratas control $n=6$ y del grupo obeso $n=6$.

Se incluyeron en el estudio corazones que durante la disección no sufrieron daños en su morfología externa.

Cortes de corazones fetales que durante el proceso histoquímico e inmunohistoquímico permanecieran completos.

7.2.2. Criterios de exclusión corazones fetales

Se excluyeron en el estudio cortes de corazones fetales que no presentaron una tinción homogénea.

7.3 Consideraciones éticas

El presente trabajo contó con el aval del comité de Ética Animal de la Universidad del Valle según ACTA N° 01-2012

Los procedimientos realizados durante el proyecto, no causaron sufrimiento a los biomodelos de experimentación. Durante la permanencia en el bioterio el bienestar de los biomodelos fue continuamente supervisado por el grupo de trabajo. Todos los procedimientos fueron realizados teniendo en cuenta las normas de bioseguridad.

7.4 Diseño Experimental

7.4.1 Biomodelos

Las hembras de 60 días de edad con un peso aproximado entre 190 a 210 gramos y machos adulto 2 meses con un peso aproximado de 300 g, pertenecientes a la especie *Rattus norvegicus albinus* cepa Wistar, fueron mantenidas en el Bioterio bajo condiciones de luz-oscuridad (12-12 horas) y temperatura (22-23°C) y humedad 38% a 66% controlada. Los biomodelos maternos y los machos adultos fueron mantenidos en jaulas plásticas individuales, con unas dimensiones correspondientes a 26 cm de largo x 23 cm ancho x 21 cm de alto.

7.5 Protocolo de Trabajo

El desarrollo experimental se realizó en el Bioterio de la Universidad del Valle y en el laboratorio de Histología. El protocolo experimental se llevó a cabo en tres fases.

7.5.1. Fase I Establecimiento del modelo de obesidad adquirida por dieta

Doce (12) hembras adultas, fueron divididas en dos grupos; un grupo control (n=6), el cual fue alimentado con dieta estándar (DE), dieta comercial LAB DIET 5001 (Lab Chow Rodentia Purina) comercializada por BIOSOLUCIONES (Bogotá). Origen, Estados Unidos, y cumple con las normas ISO 9001:2008. En cuanto a la composición nutricional contiene, proteína cruda mínimo 23,0%; grasa cruda mínimo 4,5%; fibra cruda máximo 6,0%; cenizas máximo 8,0%, minerales agregados máximo 3,0%.

El grupo obeso (n=6), fue alimentado con dieta estándar (DE) comercial Lab Diet 5001, complementada con una dieta hipercalórica altamente palatable denominada dieta de cafetería (DC), compuesta por 21 alimentos diferentes debidamente codificados y con contenido nutricional establecido.

Tabla 1. Alimentos suministrados a los biomodelos maternos durante la dieta de cafetería

Código Asignado	Alimento	K calorias
1	Chitos	50
2	Queso doble crema	300
3	Tocineta	70
4	Chonticos	120
5	Papas fritas - Colombia	547,2
6	Panecillos de mantequilla	380
7	Galletas Festival	200
8	Chocolatina Jet crujiente	200
9	Chocorrano	300
10	Rosquillas Caleñas	65
11	Pellet - Estándar LAB DIET 5001	100
12	Cereales Frutiboli	391,1
13	Cheese tris	220
14	Sandwich	146,5
15	Galletas Saltin	180
16	Browni	100
17	Galletas Saltin Trigo Maíz	419
18	Palomitas de maiz dulces	90
19	Jamón	60
20	Snacky	240
21	Salchicha Zenú	130

Durante un periodo de seis (6) semanas el alimento y el agua fue ofrecido en exceso a ambos grupos. La ingesta de alimento fue monitoreada diariamente, el peso, talla y circunferencia abdominal fue evaluado semanalmente.

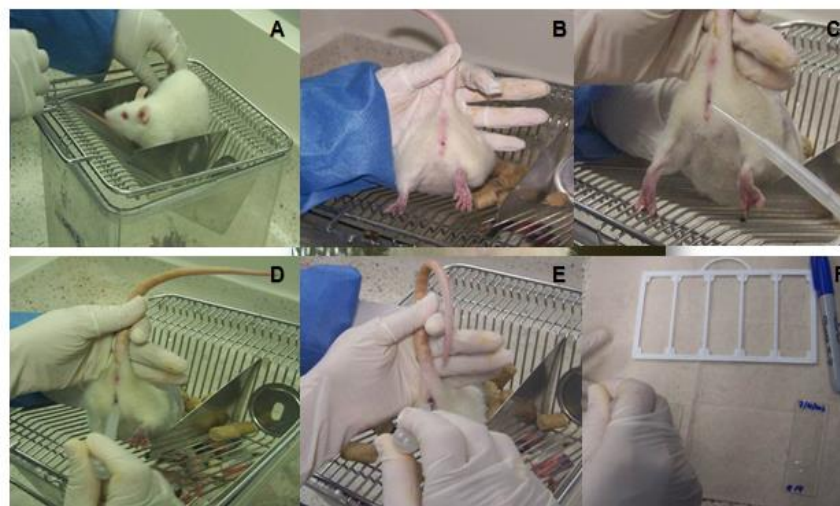
Para confirmar la ganancia de tejido adiposo a expensas de la dieta de cafetería, se seleccionaron al azar 2 (dos) biomodelos, cada uno proveniente de los grupos experimentales, esto con el fin de realizarles una Tomografía Computarizada Abdominal (TAC), realizada en un Tomógrafo Bright Speed de 16 canales. Para

realizar este procedimiento, cada biomodelo fue anestesiado con isoflurano vía inhalatoria. Una vez obtenidas las imágenes, se analizaron las regiones con la densidad grasa, su localización y proporción. Cuando los biomodelos experimentales alcanzaron el 20% más del peso inicial, se procedió a realizar el seguimiento del ciclo estral y apareamiento de biomodelos.

7.5.1.1. Evaluación del ciclo estral y establecimiento de la preñez

A partir de la sexta semana de alimentación de los biomodelos, se procedió diariamente, entre las 7:00 y 9:00 AM, a la toma de citología vaginal y visualización en fresco del extendido vaginal de los biomodelos de ambos grupos con el fin de determinar el momento del celo y obtener los estadios gestacionales para el estudio (E13.5 y E16.5).

Brevemente, se procedió a la inmovilización y ubicación del biomodelo en posición para toma de muestra, se depositó 100 µl de agua filtrada con pipeta plástica en el canal vaginal y posterior se realizó aspirado. Finalmente, se procedió a la realización de extendido en un porta objeto previamente marcado y se visualizó los frotis en fresco utilizando un microscopio Olympus CH2 y se caracterizó según cada fase del ciclo estral el tipo celular dominante. (Figura 4)



Selección biomodelo (A). Exposición canal vaginal (B). Introducción micropipeta (C)
Deposito gotas agua (D). Succión (E) . Preparación frotis (F)

Figura 4. Toma de frotis vaginal. (A) Selección y disposición del biomodelo. (B) Exposición del canal vaginal. (C-D). (E) Succión del moco vaginal. (F) Preparación del extendido.

Una vez establecida la fase del ciclo estral, los biomodelos que se encontraron en proestro, fueron trasladados al área de apareamiento y depositados en la jaula con un macho adulto de aproximadamente 300 gramos de peso corporal (Figura 5).

A la mañana siguiente, en horas de la mañana, se realizó un nuevo extendido vaginal y se determinó el día 0,5 de preñez ante la presencia de espermatozoides. A partir de esta fecha, se realizó el seguimiento y distribución de los biomodelos tanto del grupo control como del grupo experimental según las edades gestacionales establecidas E13.5 y E16.5.

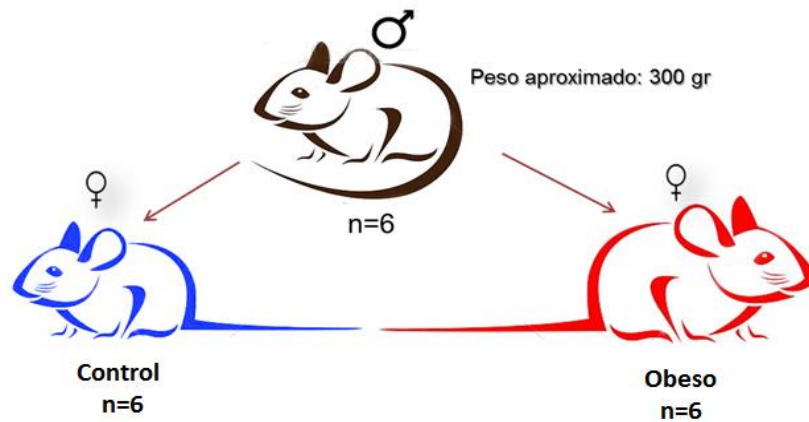


Figura 5. Distribución de biomodelos en la fase de apareamiento.

7.5.2. Fase II

Interrupción de la preñez

Finalizado el tiempo de gestación, se procedió a la interrupción de la preñez de los biomodelos para obtener los fetos en estadio E13.5 y E16.5 y sus respectivos corazones, para ello se siguió el protocolo de disección de biomodelos maternos, disección de útero e implantaciones bajo estereomicroscopio Meiji RZT techno con cámara fotográfica acoplada Infinity 1. (Anexo 1). Finalmente con base en la información registrada durante la fase de disección de biomodelos maternos, fue analizado el perfil reproductivo teniendo en cuenta:

1. Tasa Fertilidad (N° de ratas preñadas/ N° de ratas en apareo)
2. Tasa Viabilidad (N° de fetos/ N° de implantaciones X 100)
3. Tasa Reabsorción (N° de embriones reabsorbidos/ N° de implantaciones X 100)
4. Perfil Reproductivo (Promedio de implantaciones por grupo)

Con base en el análisis estadístico, se estableció que no hubo diferencias significativas al evaluar la tasa de fertilidad. En cuanto a la tasa de viabilidad, los biomodelos maternos provenientes del grupo obeso, presentaron menor número de implantaciones en comparación con los biomodelos del grupo control, siendo estas diferencias significativas con un ($p \leq 0.005$).

La tasa de reabsorción, fue mayor en los biomodelos provenientes del grupo obeso siendo esta diferencia estadísticamente significativa con un ($p \leq 0.005$). En cuanto al perfil reproductivo, no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales control vs obeso (58).

Obtenidos los fetos, se realizó la disección y respectiva explantación del corazón fetal siguiendo el respectivo protocolo (Anexo 1). Posteriormente los corazones se fijaron por inmersión en PLP durante dos (2) horas, seguido de un cambio a alcohol al 70%; finalmente, se almacenaron en recipientes adecuados previamente rotulados con fecha, estadio fetal, código de biomodelo materno y grupo experimental, hasta el momento de procesarlos para detección de apoptosis por inmunohistoquímica de caspasa 3 activada y técnica de TUNEL correspondiente a la fase III.

7.5.3. Fase III

Procesamiento histoquímico e inmunohistoquímico

Para esta fase se seleccionaron $n = 12$ (doce) corazones fetales de los obtenidos en la fase II, distribuidos según lo mostrado en la tabla 2. De cada biomodelo gestante para las edades evaluadas se realizó una selección aleatoria de los fetos ubicados en la parte central del cuerno.

Tabla 2. Distribución de corazones fetales para las pruebas de histoquímica e inmunohistoquímica

Prueba detección Caspasa 3 activada Técnica de TUNEL			
Edad gestacional 13.5		Edad gestacional 16.5	
Número corazones GC	Número corazones GO	Número corazones GC	Número corazones GO
3	3	3	3

GC: grupo control, GO; grupo obeso.

7.5.3.1 Procesamiento de corazones fetales para la realización de técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica

7.5.3.1.1 Inclusión y corte

Los corazones fetales obtenidos en la fase II, se procesaron en el laboratorio de Histología de la Universidad del Valle. El protocolo utilizado incluyó una fase de

deshidratación de las muestras con alcohol etílico en concentraciones crecientes, (70°, 80°, 95°, 100°), y aclarados con xilol. Posteriormente fueron incluidos en parafina (Anexo 2). Se realizaron cortes histológicos seriados de 4µm de espesor utilizando un micrótopo de rotación marca RM 2245. Los cortes fueron montados en portaobjetos Write frost slide export optimizados para inmunohistoquímica previamente marcados y codificados (Tabla 3). El total de bloques procesados fue de 12 (doce). Los cortes seriados obtenidos, se distribuyeron para la realización de las pruebas de caspasa 3 activada y técnica de TUNEL.

Tabla 3. Sistema de codificación para muestras de corazones fetales en día gestacional E13.5 y E16.5

Biomodelo	Código corazón
1	RWOFII-14-H13.5-06
2	RWOFII-16-H13.5-05
3	RWOFIII-1-H13.5-08
4	RWCFII-23-H13.5-01
5	RWCFII-18-H13.5-05
6	RWCFII-9-H13.5-05
7	RWOFII-3-H16.5-05
8	RWOFII-13-H16.5-05
9	RWOFII-19-H16.5-04
10	RWCFII-5-H16.5-10
11	RWCFI-11-H16.5-11
12	RWCFI-14-H16.5-09

R: especie biomodelo materno

W:cepa *Wistar*

C: grupo experimental control

O: grupo experimental obeso

FI-FII: fase experimental de obtención acompañado del número biomodelo materno

H: corazón fetal

13.5-16.5: edades gestacionales, acompañado del número de corazón

7.5.3.2 Procedimientos histoquímicos

7.5.3.2.1 Técnicas para la detección de apoptosis

Existen varios métodos específicos desarrollados para determinar y cuantificar el fenómeno apoptótico; dependen del modelo de estudio, del tipo de muestras y de la infraestructura disponible (59). Sin embargo, la mayoría no son aplicables a secciones histológicas de tejidos embebidos en parafina. Los avances en la comprensión de los eventos moleculares ocurridos en el proceso de apoptosis han llevado a la búsqueda de nuevas técnicas de detección de dicho evento (60).

Entre las técnicas más utilizadas, se encuentran 1) electroforesis de ADN, 2) citometría de flujo, 3) evaluación de la simetría de la membrana celular (61). 4) detección de caspasa 3 activada; técnica que resulta útil cuando se requiere establecer la ruta de inducción de apoptosis y 5) técnica de TUNEL (dUTP nick end labeling), detecta la fragmentación del ADN, ampliamente empleada para determinar y cuantificar el fenómeno apoptótico (62).

7.5.3.2.1 Detección de caspasa 3 activada

La apoptosis ha ganado importancia central en el estudio de muchos procesos biológicos, incluyendo neoplasia, enfermedades neurodegenerativas, y su influencia en diferentes procesos durante el desarrollo embrionario. Una de las limitaciones de muchos estudios es la dificultad de identificar específicamente las células apoptóticas individuales. Los avances en la comprensión de los acontecimientos moleculares en la apoptosis han conducido a la comprensión de que la activación de la caspasa 3, es el indicador más específico de este mecanismo de suicidio celular en etapas tempranas (60).

Como se indicó previamente, el tipo y tamaño muestral para detectar la actividad de la caspasa 3 y realizar los ensayos de TUNEL se indican en la (Tabla 2). Los procedimientos realizados para cada una de las técnicas se amplían en el respectivo protocolo (Anexo 3) y (Anexo 4) respectivamente.

Brevemente, para la detección de la caspasa 3 activada se procedió a desparafinar e hidratar las secciones de los corazones fetales en las edades gestacionales establecidas, seguido del desenmascaramiento antigénico por medio de calor, para lo cual se utilizó microondas a potencia 10 y Buffer Citrato (pH 6.0), esto con el fin de eliminar la reticulación de las proteínas formadas durante el proceso de fijación de las muestras en PLP, lo que conlleva a un enmascarado de los sitios antigénicos, seguidamente se realizaron lavados con PBS. Luego se procedió a la inmunomarcación para la caspasa 3 activada, para lo

cual se bloqueó la peroxidasa endógena y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal anti caspasa-3 activado (SC22171) y posteriormente el anticuerpo secundario Rabbit-antigoat IgG-B (SC Biotinilado 2774), seguido por incubación con Avidina-Biotina y revelado con DAB (Diaminobencidina). Los lavados se realizaron con PBS y finalmente se contra tiño con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron realizando varios cambios de alcoholes a concentración creciente (70 °, 95°, 100°) y xilol. Finalmente se realizó el montaje de las muestras (Anexo 3).

7.5.3.2.2 Técnica de TUNEL (dUTP nick end labeling)

Esta técnica se basa en analizar las características de fragmentación del ADN que ocurre durante el proceso de apoptosis. En estas células el ADN genómico se fragmenta en múltiplos de 180-200 pares de bases (pb), basado en el largo de las repeticiones nucleosomales. Este fenómeno, de la fragmentación del ADN es posible observarlo por medio de la técnica de TUNEL en muestras parafinadas (*TdT-mediated x-dUTP nick end labeling*), permitiendo de esta manera, observar las células apoptóticas y su localización en el órgano en estudio. El fundamento del ensayo radica en marcar los extremos de los fragmentos nucleosomales, con predominio de terminales 3'OH libres en cadenas simples o dobles de ADN, que pueden ser detectados mediante la incorporación de nucleótidos marcados con digoxigenina por acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). De esta manera los fragmentos de ADN que se generan durante el proceso de apoptosis pueden identificarse y localizarse "*in situ*". Teniendo en cuenta las bien conocidas características morfológicas descritas y caracterizadas por Kerr y Wyllie (63). Para los ensayos de TUNEL, se procedió según el protocolo (Anexo 4).

A continuación se detalla el proceso brevemente. Secciones de corazones fetales en las edades gestacionales establecidas fueron desparafinadas con diferentes cambios de xilol y alcoholes en concentraciones decrecientes (100°,95°y70°), lavados y re-hidratación. Seguidamente se procedió a la recuperación antigénica utilizando microondas a potencia 10 y Buffer Citrato pH 6.0, por un tiempo de 25 minutos. A continuación se procedió a la realización de la técnica siguiendo las indicaciones del proveedor del kit utilizado (ApopTag Fluorescein *in Situ*), para lo cual previamente se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂/CH₄ al 3%, seguido de lavados con PBS y la incubación de muestras con buffer de equilibrio. Posteriormente, se incubó con la solución Working Strength TdT enzima; para la detección de la reacción enzimática, las muestras fueron lavadas con Stop Wash Buffer, seguido de lavados con PBS. Luego las muestras se incubaron con la solución Working strength anti-digoxigenin conjugate durante 30 minutos y lavados con PBS. Seguidamente, se incubó durante 45 minutos con antifluoresceína, acompañado de lavados. Finalmente, se procedió a revelar con diaminobencidina y contra tinción con hematoxilina. El proceso de deshidratación

se realizó con alcoholes en concentraciones crecientes y xilol. Por último se procedió al respectivo montaje.

7.5.3.3. Cuantificación de cardiomiocitos positivas caspasa 3 activada y TUNEL

Finalizado las pruebas de histoquímica para la técnica de caspasa 3 activada y técnica de TUNEL, se procedió a diseñar una prueba de concordancia que permitió validar el instrumento de medición y el protocolo de cuantificación de células apoptóticas o en proceso de apoptosis detectadas por las técnicas de caspasa 3 activada y TUNEL.

7.5.3.4 Diseño y realización de prueba de concordancia

Inicialmente se llevó a cabo la validación del instrumento utilizado en la evaluación de los núcleos marcados para caspasa 3 activada y TUNEL. Se determinó el grado de concordancia de las observaciones realizadas por los dos observadores, experto e investigador, sobre el mismo fenómeno (células inmunomarcadas positivas), con el objetivo de evaluar, cuán acordes fueron entre sí las observaciones realizadas y validar el instrumento de medición.

Dado que la técnica de TUNEL y la técnica de caspasa 3 activada, son equivalentes en cuanto al método de evaluación de cardiomiocitos marcados, se seleccionó una de ellas al azar; para realizar la prueba de concordancia se procedió siguiendo la siguiente secuencia:

1. Selección de muestras de corazones fetales inmunomarcados con caspasa 3 activada en estadio E13.5 y E16.5 que cumplieran con los criterios de inclusión (Tabla 4)

Tabla 4. Muestras de corazones fetales utilizadas para prueba de concordancia.

Parámetro	Muestras utilizadas prueba de concordancias caspasa 3			
	Edad E13.5		Edad E16.5	
	Grupo control	Grupo obeso	Grupo control	Grupo obeso
Total cortes	1	1	1	1
Áreas a evaluar	5	5	5	5
Total de conteos por área	3	3	3	3
Total de mediciones	15	15	15	15

2. Evaluación de las muestras por parte de la experta en el área de morfología e investigadora; siguiendo el respectivo protocolo (Anexo 5).

Terminado el análisis estadístico de los datos obtenidos en la prueba de concordancia, se procedió a la evaluación del total de muestras para cada técnica, por parte del investigador. Las muestras empleadas para la evaluación de la técnica de inmunodetección de caspasa 3 activada se describen en la Tabla 5 y las muestras empleadas para la detección de fragmentos de ADN en células apoptóticas por medio de la técnica de TUNEL se describen en la Tabla 6. El protocolo de cuantificación de células marcadas caspasa 3 activadas y TUNEL positivas se describe en el (Anexo 6).

Tabla 5. Distribución de muestras evaluadas por medio de la técnica de inmunohistoquímica para detección de caspasa 3 activada.

Parámetro	Caspasa 3 activada			
	Edad E13.5		Edad E16.5	
	Grupo control	Grupo obeso	Grupo control	Grupo obeso
Total cortes	3	3	3	3
Áreas a evaluar	5	5	5	5
Total de conteos por área	3	3	3	3
Total de mediciones	90	90	90	90

Tablas 6: Distribución de muestras evaluadas por medio de la técnica de TUNEL

Parámetro	TUNEL			
	Edad E13.5		Edad E16.5	
	Grupo control	Grupo obeso	Grupo control	Grupo obeso
Total cortes	3	3	3	3
Áreas a evaluar	5	5	5	5
Total de conteos por área	3	3	3	3
Total de mediciones	90	90	90	90

Para fijar la concordancia se calculó el índice desarrollado por Lin & Lawrence (1989), denominado coeficiente de correlación concordancia (CCC). El uso de este coeficiente supera las limitaciones de otras pruebas estadísticas que se proponen generalmente para evaluar la concordancia en variables de tipo continuo. Entre ellas el supuesto de normalidad (64).

Se muestra a continuación los valores obtenidos al calcular el índice de Lin (CCC) realizado para las cinco regiones en los corazones fetales procedentes del grupo control y grupo obeso.

Tabla 7. Valores del coeficiente de Lin y grado de concordancia de las regiones evaluadas según los grupos experimentales

Regiones medidas	Control	Grado de concordancia	Obeso	Grado de concordancia
Atrio derecho	0,90	Moderado	0,93	Moderado
Ventrículo derecho	0,95	Sustancial	0,97	Sustancial
Tabique interventricular	0,58	Pobre	0,61	Pobre
Ventrículo izquierdo	0,98	Casi perfecta	0,86	Moderado
Atrio izquierdo	0,92	Moderado	0,97	Sustancial

Como se muestra en la tabla 9, el índice de Lin indica el grado de concordancia entre las mediciones realizadas por el experto y el investigador, como resultados se obtuvo que para el atrio derecho en el grupo control y grupo obeso, el grado de concordancia fue moderado (0.90 y 0.93) respectivamente; los coeficientes señalados indican una buena concordancia entre las mediciones ya que superan valores > de 0.90 (65) (66).

A nivel del ventrículo derecho, la concordancia medida fue sustancial para ambos grupos (0.95 y 0.97) respectivamente. Lo cual indica una buena correlación entre las mediciones efectuadas por los dos observadores. Por el contrario, la concordancia entre las medidas realizadas en el tabique interventricular fue pobre en ambos grupos (normopeso y obeso) con un coeficiente de Lin de 0.58 y 0.61 respectivamente.

El coeficiente de correlación–concordancia de Lin en el ventrículo izquierdo fue casi perfecto para el grupo control (0.98) en contraste con el del grupo obeso el cual fue moderado (0.86). Existiendo para el primero, una alta correspondencia de los observadores durante el conteo de células.

En el atrio izquierdo, la concordancia medida para el grupo control fue de 0.92 correspondiente a un grado de concordancia moderado, para el grupo obeso fue de 0.97 la cual se interpreta según Camacho (2008), con un grado sustancial, es decir que los datos de cuantificación emitidos por los observadores fue coherente.

7.5.3.4.1 Análisis estadístico descriptivo

Para el análisis exploratorio de datos, y cumplir con los objetivos planteados en el trabajo, se realizaron estadísticas descriptivas, que consistieron en la obtención de medidas de posición y gráficos (diagrama de barras a partir de las medianas) para las variables cuantitativas, con el fin de visualizar el patrón de comportamiento de los grupos experimentales.

Posteriormente se recurrió a pruebas de significancia estadística, que permitieron contrastar las diferencias existentes entre el grupo control y el grupo obesos, teniendo en cuenta las medianas independientes para cada una de las variables evaluadas: edad gestacional, número de células inmunomarcadas caspasa 3 activada, de ubicación de las células inmunomarcadas caspasa 3 activada, número de células TUNEL positivas y localización de las células TUNEL positivas. Las características de las variables se indican en la (Tabla 8). Finalmente, las medidas a través de la prueba “U” de Mann-Whitney, se emplearon para la comparación de las muestras independientes, y se fijó un nivel de significancia del 0.05 (67). Para el análisis de datos se emplearon el software Excel 2013 distribuido por Microsoft, y R, desarrollado por Ross Ihaka y Robert Gentleman. (R Development Core Team).

Tabla 8. Características de las variables de estudio

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO	ESCALA	UNIDAD	
				CATEGORÍA	
Grupos experimentales	Clasificación de los biomodelos embrionarios del estudio		Grupos experimentales	Clasificación de los biomodelos embrionarios del estudio	
Edad gestacional biomodelo	Días de gestación de los biomodelos embrionarios	Cuantitativa- Continua	Razón 13.5 -16.5	Días	
Número de células inmunomarcadas caspasa 3 activada	Células positivas a la prueba de caspasa 3 activada	Cuantitativo Discreta	Razón	Numérica	
Región de ubicación de las células inmunomarcadas caspasa 3 activada	Células positivas a la prueba en diferentes regiones del corazón	Cuantitativo Discreta	Razón	Células (+) en Atrio derecho Ventrículo derecho Tabique interventricular Atrio izquierdo Ventrículo izquierdo	
Número de células TUNEL (+)	Número de células positivas a la prueba	Cuantitativo Discreta	Razón	Numérico	
Localización células TUNEL (+)	Regiones en el corazón donde se ubican las células positivas a la prueba	Cualitativas	Nominal	Células (+) en Atrio derecho Ventrículo derecho Tabique interventricular Atrio izquierdo Ventrículo izquierdo	

8. RESULTADOS

Este capítulo presenta como parte inicial, los resultados obtenidos de la evaluación morfológica de los corazones fetales. Seguidamente se muestran aspectos descriptivos recopilados de la evaluación realizada para cinco regiones del corazón en dos estadios de desarrollo, tomando en cuenta las medidas descriptivas y gráficas que ilustran las diferencias existentes entre los grupos experimentales (grupo control vs grupo obeso). Igualmente, los resultados obtenidos al realizar las pruebas de significancia estadística basadas en el test de “U” de Mann Whitney (67).

8.1 Evaluación de la morfología cardíaca estadio E16.5

Al día E16,5 el corazón fetal de la rata presenta sus características finales de formación, se observan macroscópicamente la presencia de las cuatro cámaras cardíacas, y el acortamiento y septación del tracto de salida (68). Por lo cual resultó de interés realizar una evaluación macroscópica de la formación de las estructuras y cámaras cardíacas, así como también del grosor del miocardio ventricular, para esta edad gestacional.

La evaluación morfológica de los corazones fetales correspondió a la observación detallada del tamaño de las cámaras: atrio derecho e izquierdo, ventrículo derecho e izquierdo y tracto de salida (OFT), tamaño, bordes externos y diferenciación de la tabicación ventricular. Estos parámetros, se visualizaron completamente definidos en los corazones de los fetos procedentes del grupo control (n=40) (Figura 6A). Sin embargo, 6 corazones (25%) procedentes de madres obesas presentaron aumento en el tamaño de atrios (Figura 6B), ventrículos y mayor longitud del tracto de salida (Figuras 6B y 62C).

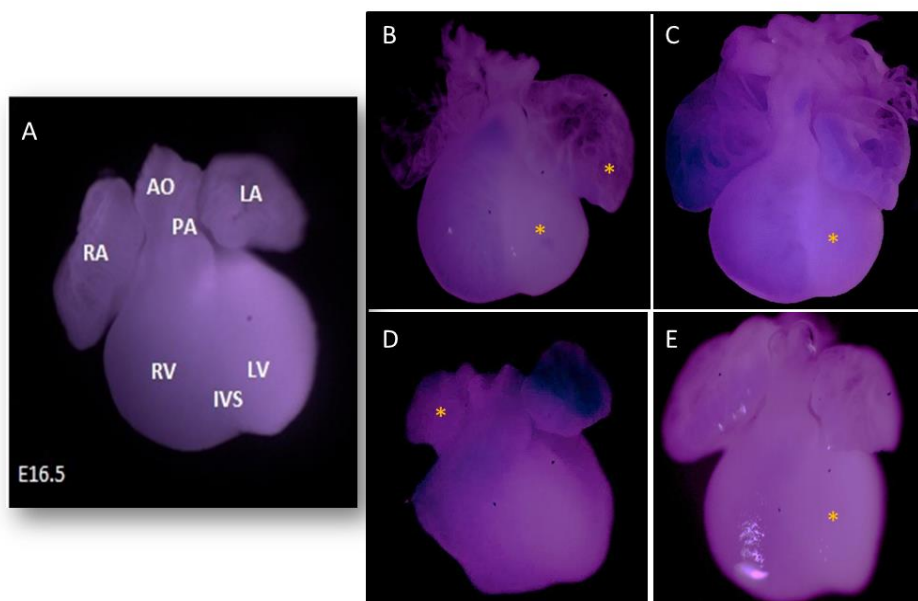


Figura 6. Corazones fetales de rata *Wistar* estadio E16.5. El corazón proveniente de un biomodelo del grupo control (A) presenta características externas normales RA: atrio derecho. RV: ventrículo derecho. IVS: septum interventricular. LV: ventrículo izquierdo. LA: atrio izquierdo. (B-C-E).Alteraciones en el tamaño del ventrículo izquierdo (hipoplasia ventricular izquierda). (B) Hiperplasia del atrio izquierdo. (D) Hipoplasia del atrio derecho; observado en corazones fetales del grupo obeso. Aumento cámara 0.55X.

8.1.1 Evaluación del grosor de la pared ventricular estadio E16.5

Se seleccionaron 10 cortes de corazones fetales en estadio E16.5 procedentes de los grupos experimentales control y grupo obeso respectivamente (5 para cada grupo). Se utilizó la herramienta Image J, para la determinación de grosor de la pared de los ventrículos derecho e izquierdo. En cada cámara ventricular se procedió a realizar 6 (seis) mediciones, siguiendo el protocolo respectivo (Anexo 7). Los resultados obtenidos muestran un mayor grosor de la pared ventricular derecha en los corazones fetales de madres obesas comparado con el grupo control, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas valor $p = 9,6$ (Figura 7).

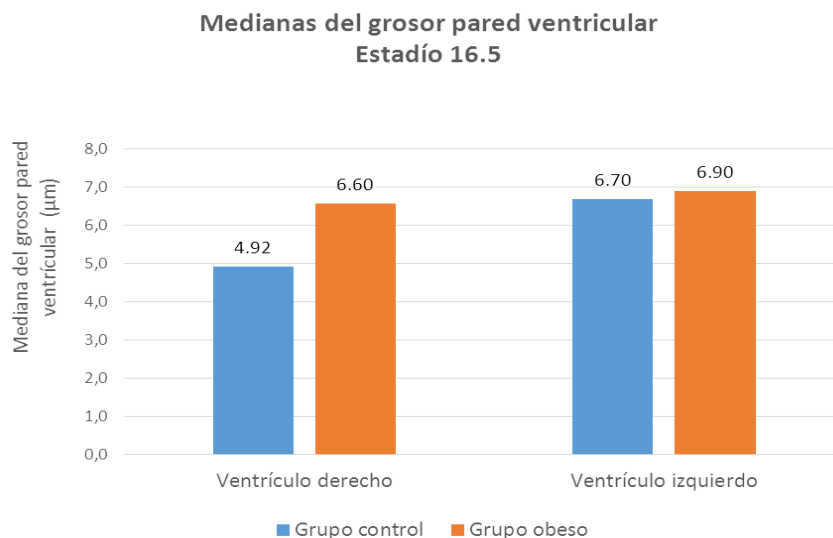


Figura 7. Medianas del grosor de la pared ventricular estadio E16,5.

El grosor de la pared ventricular fue evaluado en 5 corazones fetales control y 5 corazones fetales de madres obesas. Cada corazón fue seccionado a 4µm y se realizaron 6 mediciones independientes en cada ventrículo estudiado. Los datos fueron analizados aplicando la prueba U de Mann Witney. El valor $p=9.6\%$ para el ventrículo derecho y 69% para el ventrículo izquierdo. Los datos se representan como la mediana y un nivel de significancia 5% .

8.2. Detección de células apoptóticas

Las células apoptóticas o en proceso de apoptosis fueron evaluadas por medio de dos técnicas, inmunomarcación de caspasa 3 activada y detección de la fragmentación de ADN (TUNEL). Como se mencionó previamente (Figura 8), para ambas marcaciones se evaluaron cinco (5) regiones en el corazón fetal correspondientes a:

1. Atrio derecho
2. Ventrículo derecho
3. Tabique interventricular
4. Ventrículo izquierdo
5. Atrio izquierdo

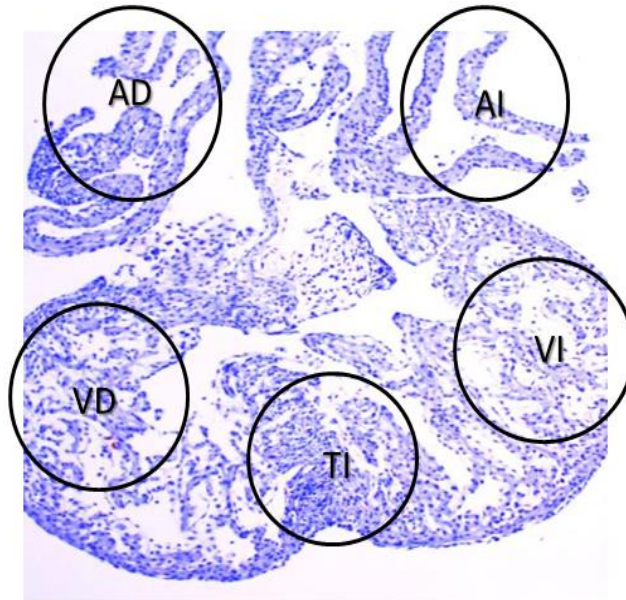


Figura 8. Regiones evaluadas en el corazón fetal. En este corte histológico se representan las regiones evaluadas para la detección de células apoptóticas en el corazón fetal E16,5. AD= atrio derecho. AI= atrio izquierdo. VD= ventrículo derecho. VI= ventrículo izquierdo. TI= tabique interventricular.

A continuación se presentan microfotografías representativas de diferentes regiones en el corazón fetal en los estadios 13.5 y 16.5, que fueron evaluadas para detectar células inmunomarcadas positivas para la caspasa 3 activada y TUNEL positivas.

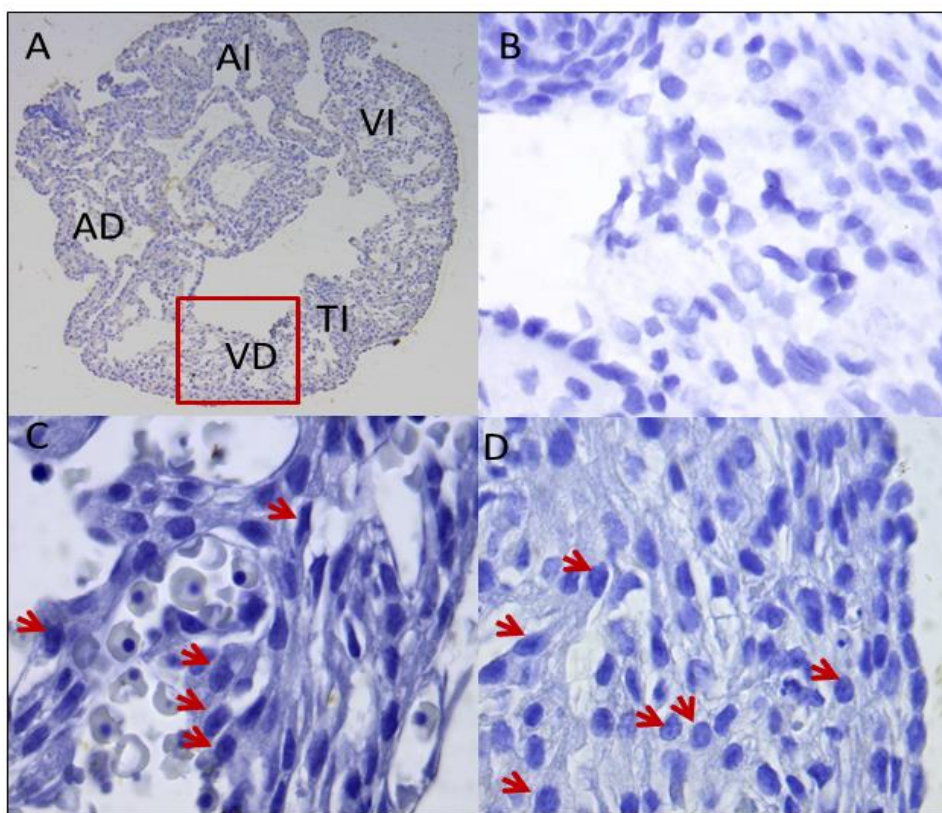


Figura 9. Microfotografía de cortes histológicos de corazón fetal de rata *Wistar* día E13.5 técnica caspas 3 activada. En el panel (A) se indican las diferentes regiones del corazón fetal: AD=atrio derecho. VD=ventrículo derecho. TI=tabique interventricular. VI=ventrículo izquierdo. AD=atrio derecho, AI=atrio izquierdo (Aumento 4X). Panel (B) control negativo, ausencia de anticuerpo caspasa 3 activada no se observan células inmunomarcadas para caspasa 3 activada (100X). Panel (C), células inmunomarcadas positivas a nivel del ventrículo derecho de corazón fetal del grupo control (100X). Panel (D) células marcadas positivas para caspasa 3 activada a nivel del ventrículo derecho de corazón fetal del grupo obeso (100X). Las flechas rojas indican células marcadas positivas.

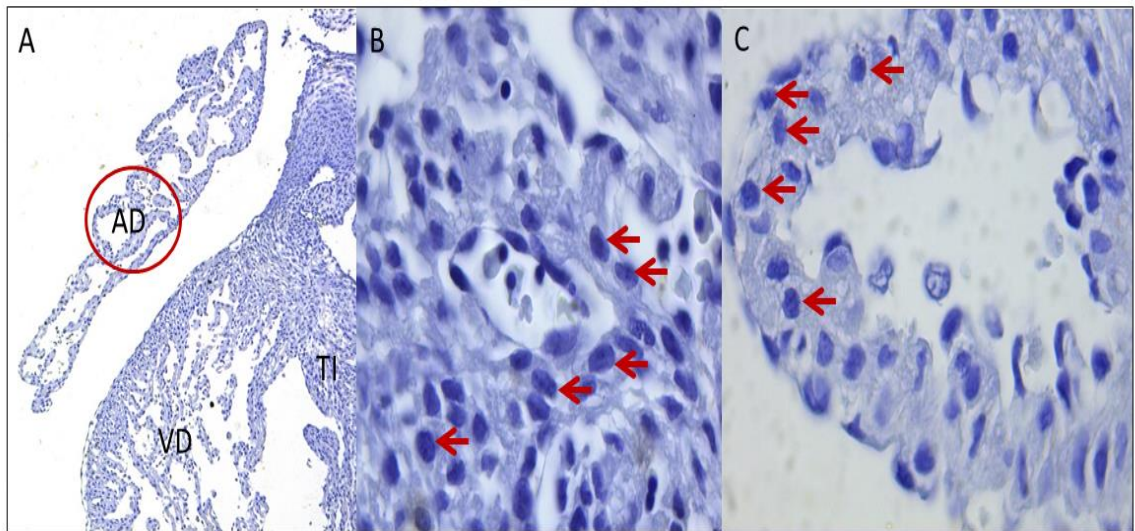


Figura 10. Microfotografía de atrio derecho de corazón fetal de rata Wistar día E16.5 técnica caspasa 3 activada. En el panel (A) se indica AD=región del atrio derecho. VD=ventrículo derecho y TI=tabique interventricular (Aumento 10X). En el panel (B) inmunomarcación de células caspasa 3 activada positivas en la región del atrio derecho en corazón de grupo control (100X). En el panel (C), las células inmunomarcadas en atrio derecho de corazón fetal del grupo obeso (100X), indicadas con flechas rojas.

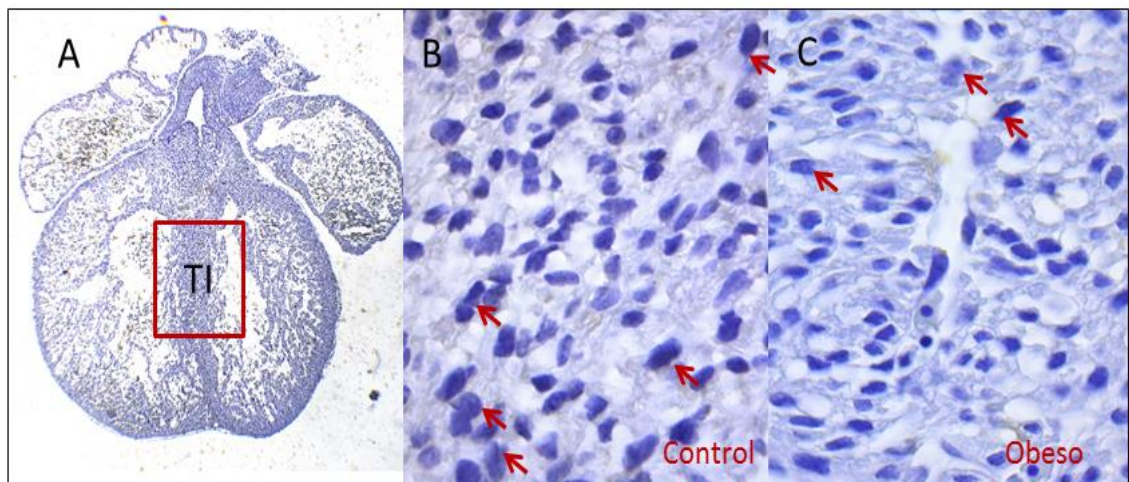


Figura 11. Microfotografía de tabique interventricular de corazón fetal de rata Wistar día E16.5 técnica caspasa 3 activada. Panel (A) vista completa del corazón fetal se indica TI=tabique interventricular (Aumento 4X). En el panel (B) inmunomarcación de células caspasa 3 activada positivas corazón fetal grupo control (100X). Panel (C) la región del tabique interventricular corazón fetal grupo obeso (100X). Las células inmunomarcadas se indican con flechas rojas.

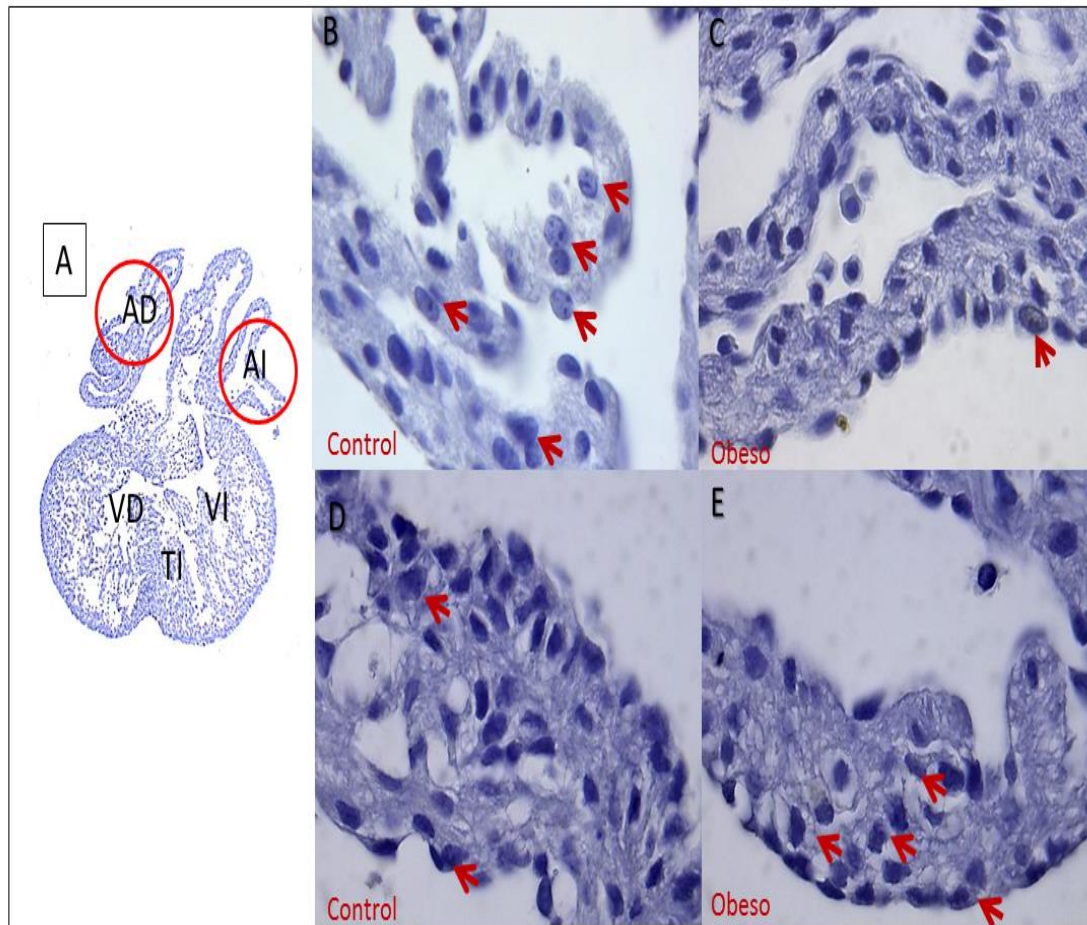


Figura 12. Microfotografía de cortes histológicos de corazón fetal de rata *Wistar* día E13.5 técnica de TUNEL. En el panel (A) se indica AD=atrio derecho. VD=ventrículo izquierdo. TI=tabique interventricular. VD=ventrículo izquierdo. AD=atrio derecho. AI=atrio izquierdo (Aumento 4X). Las células con núcleos fragmentados (TUNEL positivas) se indican con flechas rojas a un aumento de 100X. En el panel (B) región del atrio derecho de corazón fetal grupo control. Panel (C) región del atrio derecho del corazón fetal del grupo obeso. Panel (D) células con núcleos fragmentados en la región del atrio izquierdo corazón grupo control. Panel (E) región del atrio izquierdo corazón fetal del grupo obeso.

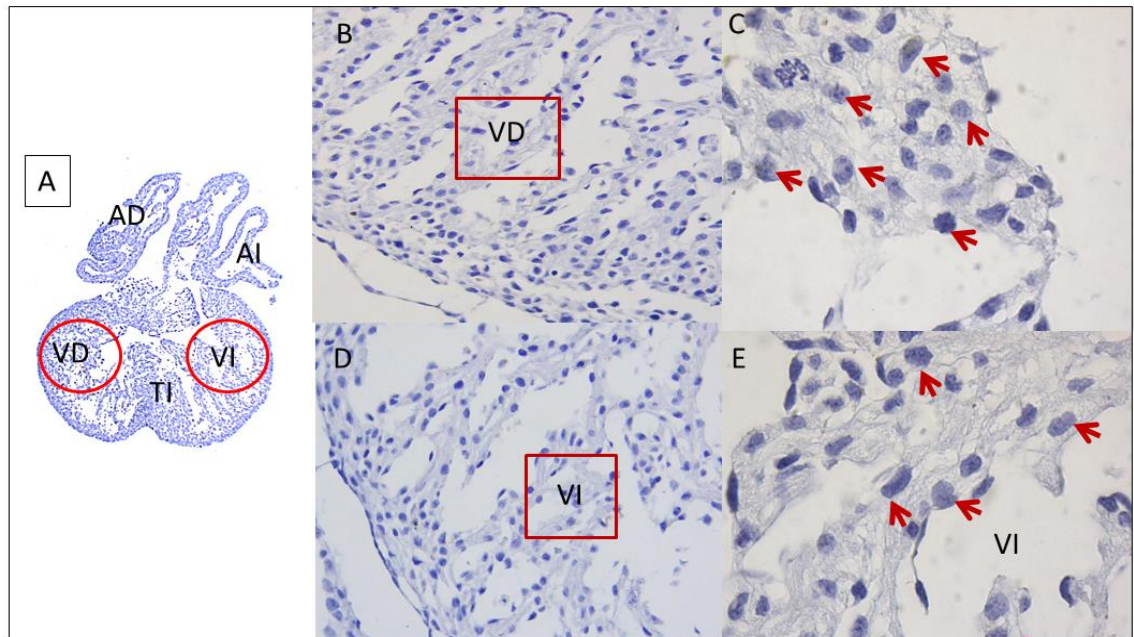


Figura 13. Microfotografía de cortes histológicos de corazón fetal de rata *Wistar* día E13.5 del grupo obeso técnica TUNEL. En el panel (A) vista completa aumento de 4X. En el panel (B) se observa región del ventrículo derecho (VD) de corazón aumento 40X. En el panel (C) se visualizan células con núcleos fragmentados (TUNEL positivas) indicadas con flechas rojas en la misma región (100X). En panel (D) Región ventrículo izquierdo (40X). Panel (E) Región en (D), indicando células TUNEL positivas señaladas con flechas rojas (Aumento 100X).

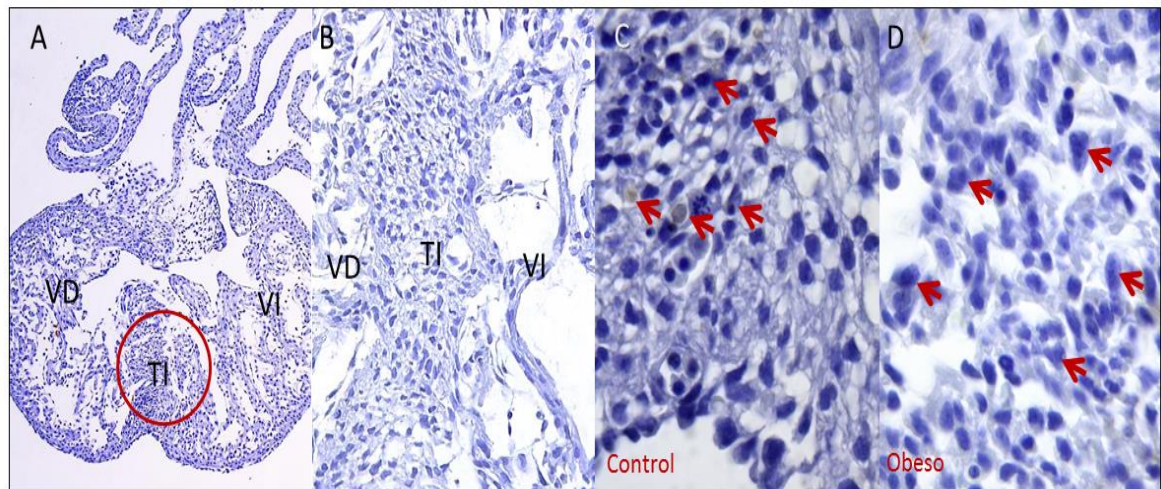


Figura 14. Microfotografía del tabique interventricular de corazón fetal de rata *Wistar* día E13.5 técnica TUNEL. El panel (A), indica una vista completa del corazón fetal aumento 10X. En (B) se observa región del tabique interventricular (TI) de un corazón del grupo obeso (40X). En el panel (C), se observan células TUNEL positivas (flechas rojas) en el tabique interventricular de un corazón grupo control. En (D) la misma región del tabique interventricular del corazón fetal del grupo obeso (Aumento 100X).

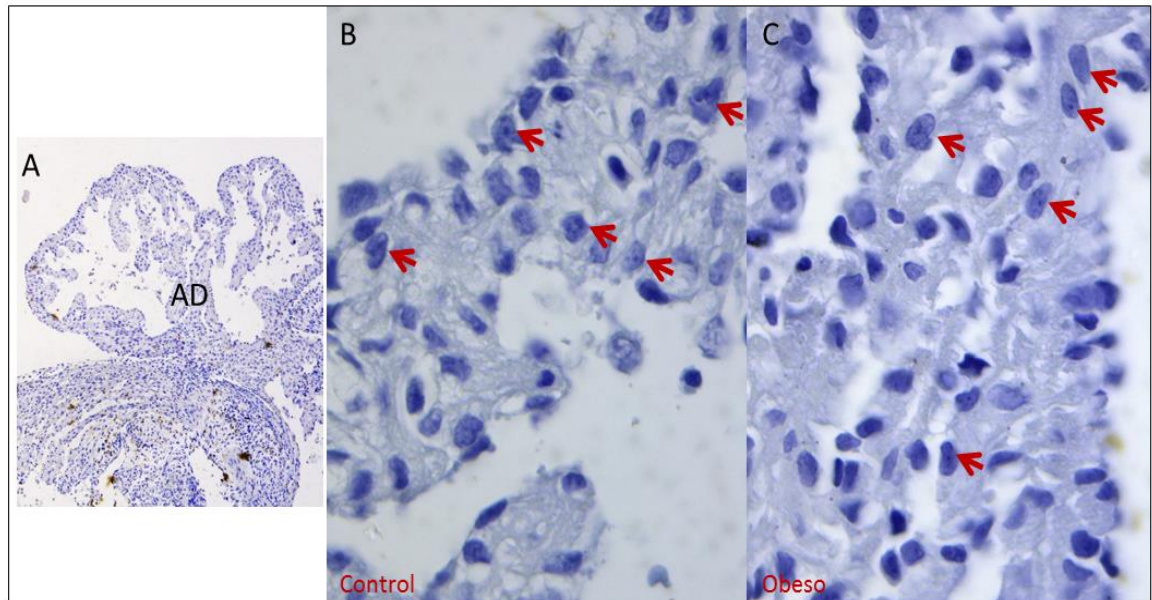


Figura 15. Microfotografía de cortes histológicos atrio derecho de corazón fetal de rata *Wistar* día E16.5 técnica de TUNEL. En el panel (A) Región del atrio derecho 40X. Las células con núcleo fragmentado (TUNEL positivas), se indican con flechas rojas. Panel (B) la región de atrio derecho corazón grupo control. Panel (C), la misma región en el corazón fetal de biomodelo grupo obeso. (Aumento de 100X).

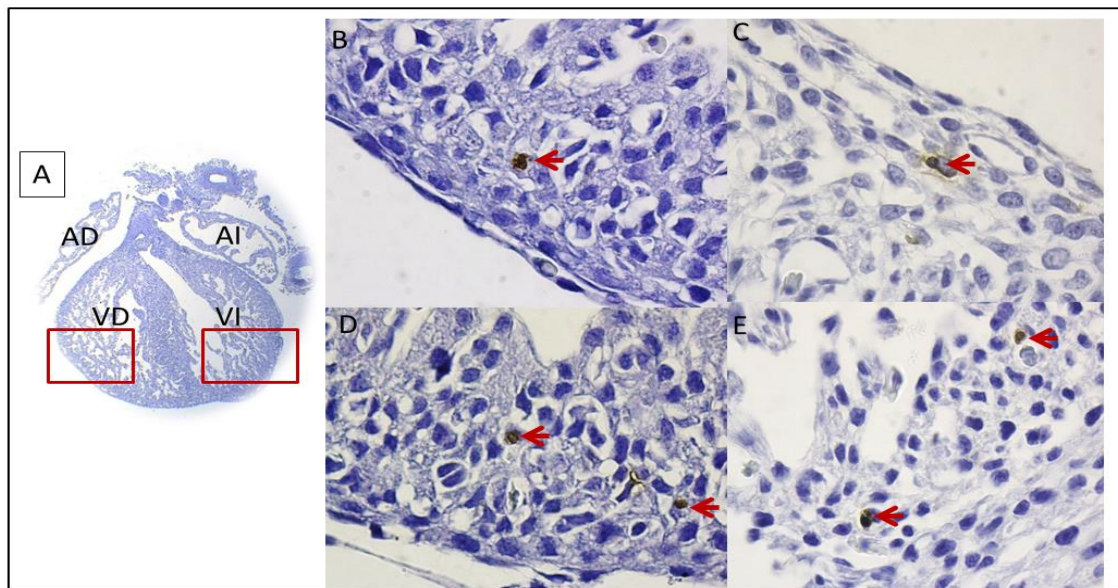


Figura 16. Microfotografía de cortes histológicos de corazón fetal día E16.5 a nivel de los ventrículos técnica TUNEL. Panel (A) vista completa del corazón fetal (4X). Se observan células TUNEL positivas en diferentes regiones de los ventrículos en corazón fetal del grupo control. Las células TUNEL positiva señaladas con flecha roja. Aumento 100X. (B-D) a nivel del ventrículo izquierdo. (C-E) a nivel del ventrículo derecho.

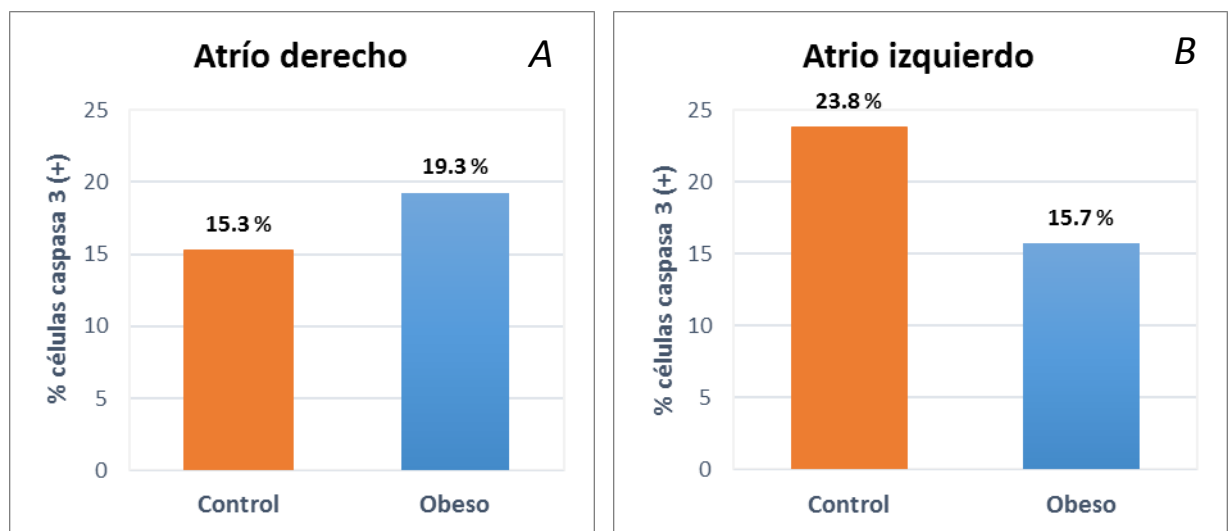
8.2.1 Apoptosis cardíaca E13.5

8.2.1.1 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en atrios corazón fetal E13.5

La cuantificación de las células inmunomarcadas positivas para la caspasa 3 activada en el atrio derecho, fue del 15.3% para el grupo control vs el 19.3% para el atrio derecho de corazones provenientes del grupo obeso (Figura 17A). Los datos fueron analizados aplicando la prueba U de Mann Witney, se obtuvo un valor $p \leq 0.0094$, superior al nivel de significancia establecido (5%).

Al evaluar y cuantificar en la región del atrio izquierdo, el porcentaje de inmunomarcación, fue menor en los biomodelos del grupo obeso en comparación con los biomodelos del grupo control 23.8% y 15.7% respectivamente. Siendo estas diferencias significativas ($p \leq 0.04$) (Figura 17B).

En cuanto a la evaluación y cuantificación del porcentaje de núcleos fragmentados por medio de la técnica de TUNEL en la región del atrio derecho (Figura 17C), fue mayor el porcentaje en los corazones provenientes del grupo obeso (45.1%) respecto al grupo control con un porcentaje del 33.6%. Detectándose diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.003$). Por el contrario, en el atrio izquierdo el porcentaje de células positivas fue similar en ambos grupos (36.5% y 35.6%). (Figura 17 D).



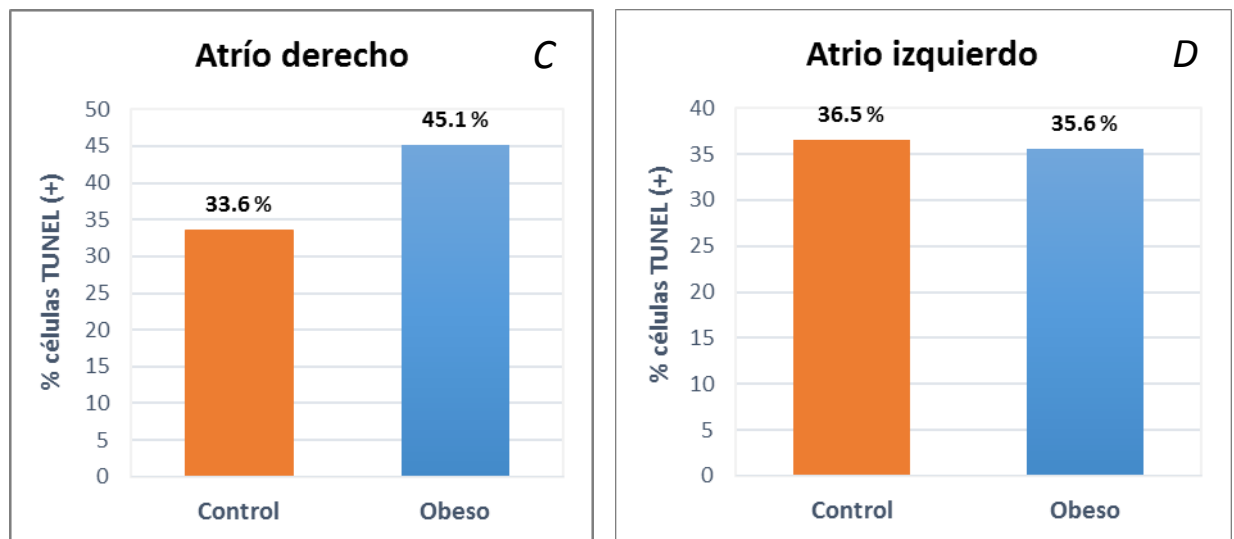


Figura 17. Porcentaje de células apoptóticas. Prueba caspasa 3 activada y TUNEL en atrios estadio E13.5. En el atrio derecho (A), fue mayor el porcentaje de células apoptóticas detectadas positivas para la caspasa 3 activada en atrios de corazones procedentes del grupo obeso. La diferencia no fue significativa estadísticamente (valor $p \leq 0.094$). A nivel del atrio izquierdo (B), se observa que fue menor la inmunomarcación de células caspasa 3 positivas en atrios del grupo obeso vs el grupo. Las diferencias fueron significativas ($p \leq 0.04$). A nivel de los atrios, solamente se observa niveles de significancia en los porcentajes de células TUNEL positivas en atrio derecho (C), siendo el porcentaje de fragmentación del ADN mayor en atrios de corazones fetales procedentes de madres obesas, con un nivel de significancia de (valor $p \leq 0.003$). En (D) porcentajes de cuantificación para el atrio izquierdo.

8.2.1.2 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en ventrículo corazón fetal E13.5

El porcentaje de células inmunomarcadas positivas para caspasa 3 en la región del ventrículo derecho, fue mayor en los corazones fetales procedentes del grupo control, con un porcentaje del 25.3% de células marcadas en comparación con el grupo obeso (17.6%). Siendo estas diferencias estadísticamente significativas con un valor $p \leq 0.000$ (Figura 18A). En la región del ventrículo izquierdo, se encontró una disminución del porcentaje de células positivas en los corazones de biomodelos del grupo obeso (13%) comparados con los del grupo control (18.8%). Detectándose diferencias significativas entre los grupos experimentales con un valor $p \leq 0.04$ (Figura 18B).

El porcentaje de núcleos TUNEL positivos en la región del ventrículo derecho, fue del 36% en el grupo control vs 34.8% en el grupo obeso, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (Figura 18C).

En el ventrículo izquierdo, los porcentajes de cuantificación entre los grupos, alcanzaron un 31.7% para el grupo control y el 33.6% en el grupo obeso sin existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. (Figura 18 D).

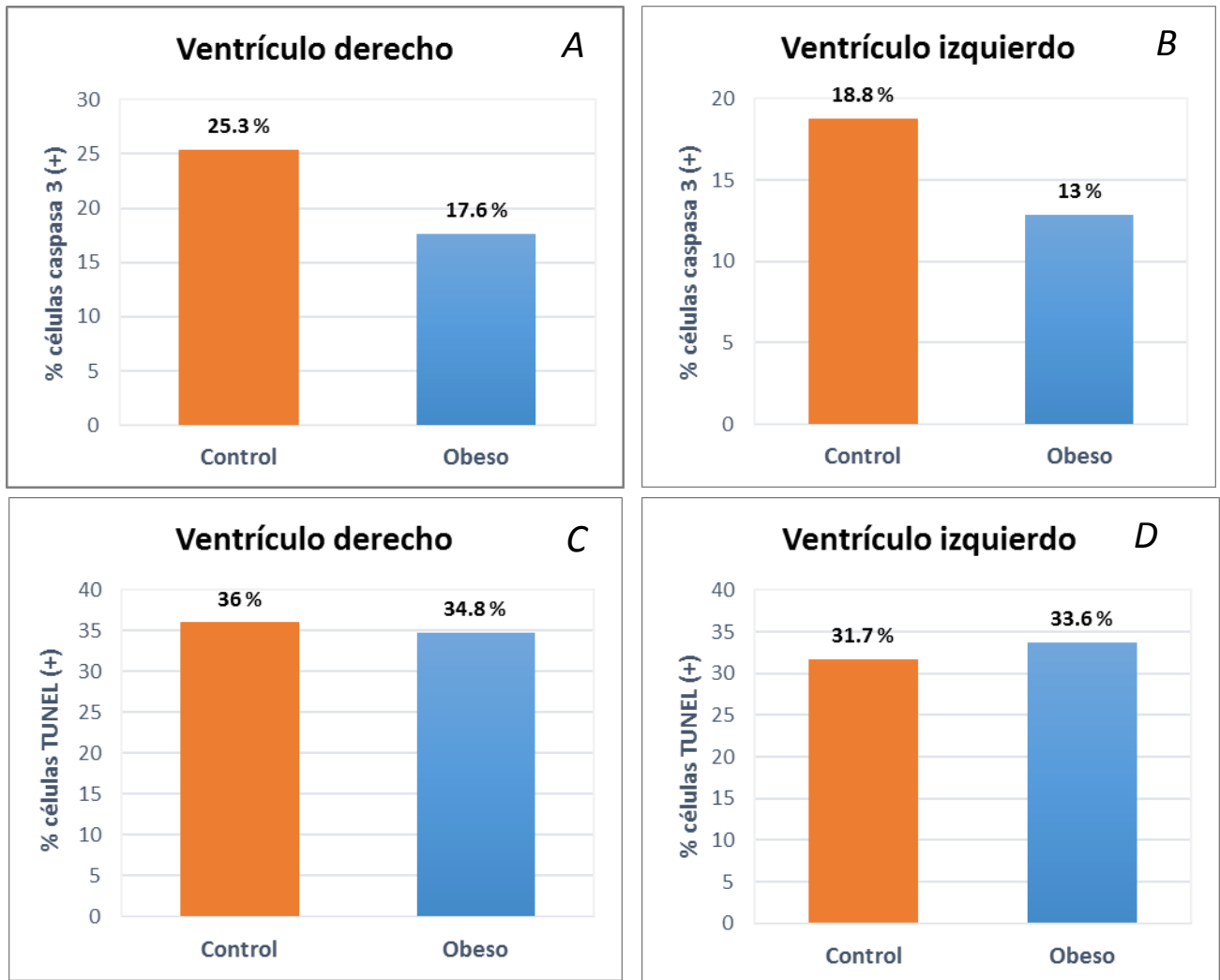


Figura 18. Porcentaje de células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL positivas a nivel de los ventrículos en el día 13.5 de gestación. El porcentaje de células caspasa 3 positivas en el ventrículo derecho (A) fue menor en corazones del grupo obeso vs grupo control. Con un valor de significancia de $p \leq 0.000$. Se observa porcentajes disminuidos en la cuantificación de células caspasa 3 positivas en región del ventrículo izquierdo de corazones del grupo obeso (B). Con un valor $p \leq 0.04$. A nivel de los ventrículos derecho e izquierdo, el porcentaje de células TUNEL positivas fue similar en el grupo control vs grupo obeso (C-D).

8.2.1.3 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en el tabique interventricular corazón fetal E13.5

La evaluación y cuantificación del porcentaje de células caspasa 3 positivas, en el tabique interventricular fue de 11% en el grupo control vs el 13% en el grupo obeso. No hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales (control vs obeso) (Figura 19A). La detección y cuantificación de núcleos fragmentados e inmunomarcados TUNEL positivos en esta región en corazones fetales de los grupos experimentales (grupo control vs grupo obeso), fue del 38.8% y 45.1% respectivamente. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 19B)

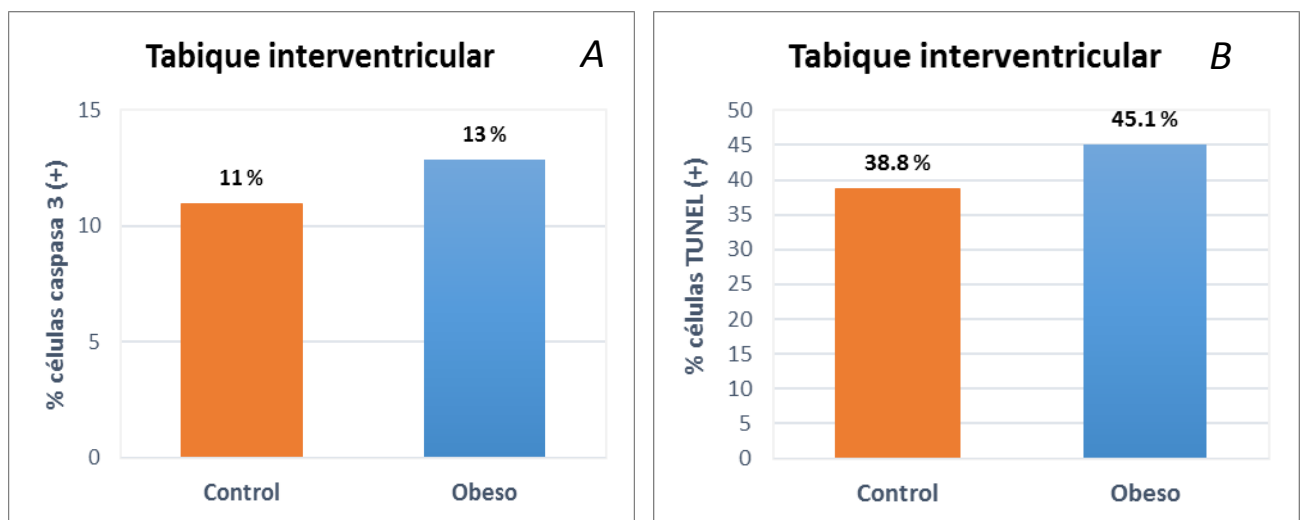


Figura 19. Células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL en el tabique interventricular de corazones fetales día 13.5. La gráfica (A) indica un mayor porcentaje de células caspasa 3 activada a nivel del tabique interventricular, para corazones del grupo obeso vs el grupo control. La diferencia porcentual no fue estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. Similar comportamiento se observa al cuantificar núcleos fragmentados (TUNEL) en la misma región (B), sin ser las diferencias estadísticamente significativas.

8.3 Apoptosis cardiaca E16. 5

8.3.1. Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en atrios corazón fetal E16.5

Realizada la evaluación y cuantificación del porcentaje de células caspasa 3 positivas en la región del atrio derecho, se obtuvo un porcentaje de células inmunomarcadas del 16% en los corazones de biomodelos del grupo control. Para

los corazones del grupo obeso, este porcentaje fue menor, alcanzando un 14.1%, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. (Figura 20A). En el atrio izquierdo el porcentaje de células marcadas fue del 16.3% en corazones procedentes del grupo obeso vs el porcentaje obtenido en la cuantificación para los biomodelos del grupo normopeso con un porcentaje del 25.4 %, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. (Figura 20 B).

El porcentaje de células TUNEL positivas en el atrio derecho fue menor (10.2%) para los corazones de los biomodelos procedentes del grupo control comparados a los del grupo obeso (19.5%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control vs el grupo obeso ($p \leq 0.001$) (Figura 20C). Para el atrio izquierdo con la misma técnica, el porcentaje de núcleos TUNEL positivos fue del 25.8% en el grupo control vs el 21.4% en el grupo obeso, sin existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 20 D).

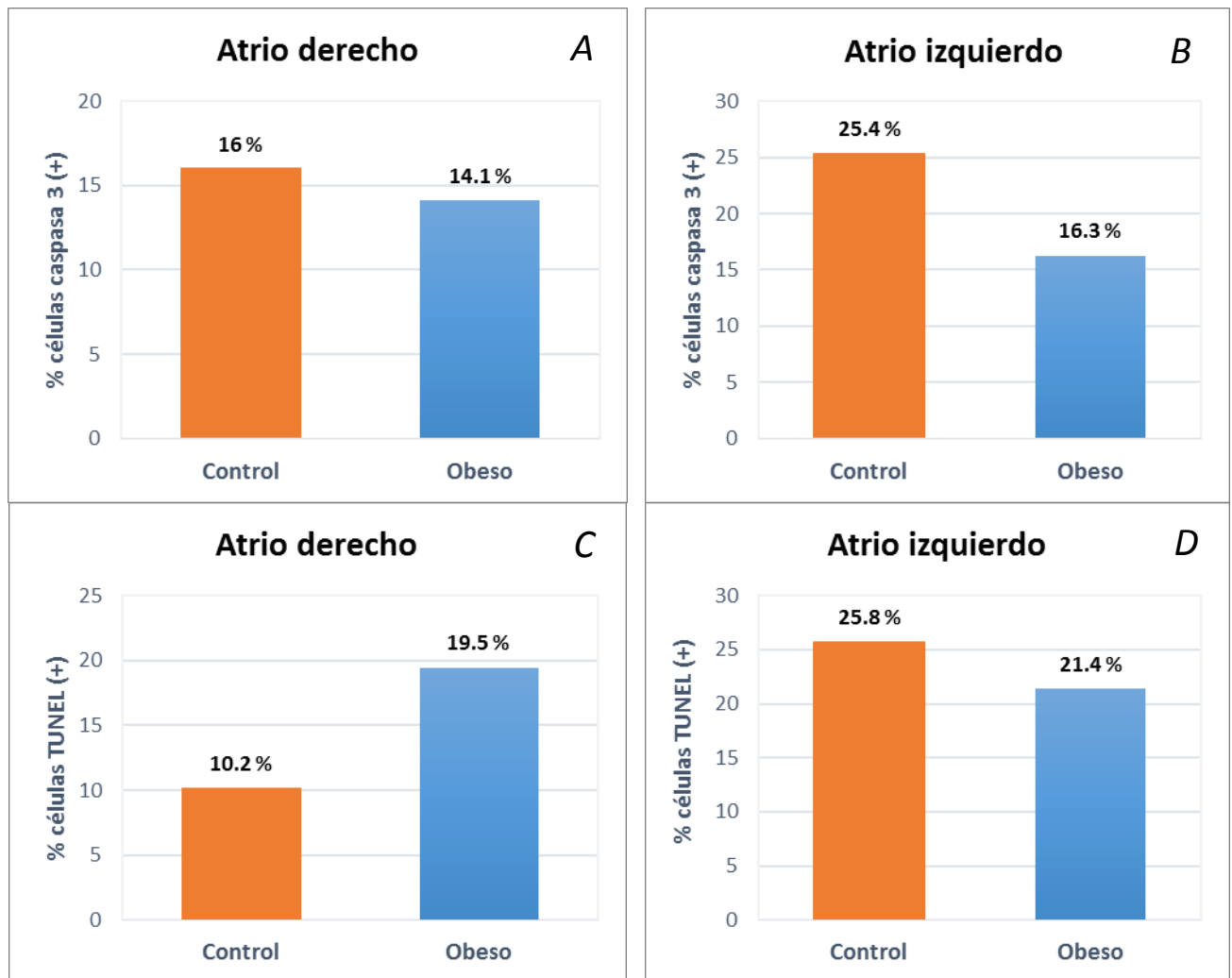
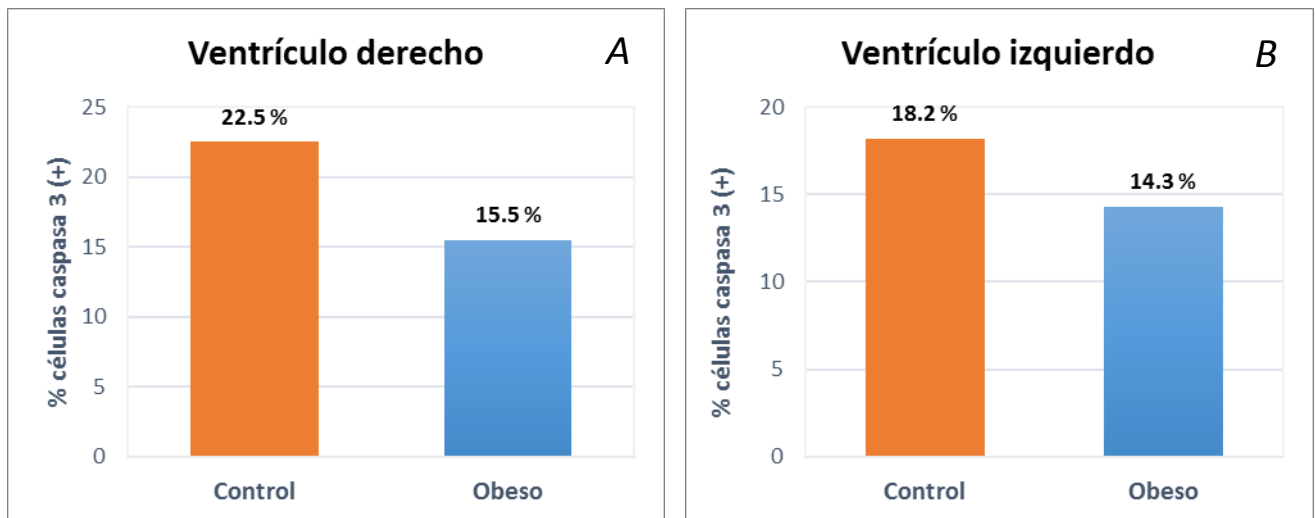


Figura 20. Porcentaje de células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL estadio E16.5 en atrios de corazones fetales. Las diferencias en los porcentajes de

caspasa 3 activada células TUNEL positivas a nivel del atrio derecho de los corazones fetales del grupo control vs el grupo obeso (C) fue estadísticamente significativa con un valor ($p \leq 0.001$). A nivel del atrio izquierdo (D), la diferencia no fue estadísticamente significativa.

8.3.2 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en ventrículos corazón fetal E16.5

El porcentaje de células caspasa 3 positivas que se detectaron en el ventrículo derecho, fue mayor en los corazones provenientes del grupo control (22.5%) en comparación al grupo obeso (15.5%). Las diferencias no fueron significativas al comparar entre los grupos experimentales (Figura 21A). Un resultado similar se presentó en la región del ventrículo izquierdo de los corazones fetales donde los corazones controles presentaron mayor inmuno marcación de caspasa 3 activada en comparación a los ventrículos derechos evaluados para los corazones procedentes de madres obesas (18,2% vs 14,3 %, respectivamente). Sin ser las diferencias significativas estadísticamente (Figura 21B). Para la región del ventrículo derecho e izquierdo, se encontró que entre los grupos experimentales (normopeso y obeso) el porcentaje de núcleos TUNEL positivos en el ventrículo derecho fue mayor (28.6%) en el grupo normopeso en comparación con los del grupo obeso (15.6%) (Figura 21C). Sin ser estas diferencias significativas. A su vez, la cuantificación de TUNEL para el ventrículo izquierdo de los corazones del grupo obeso se presentó disminuida (16%) en comparación con el grupo control (30%). No siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 21D).



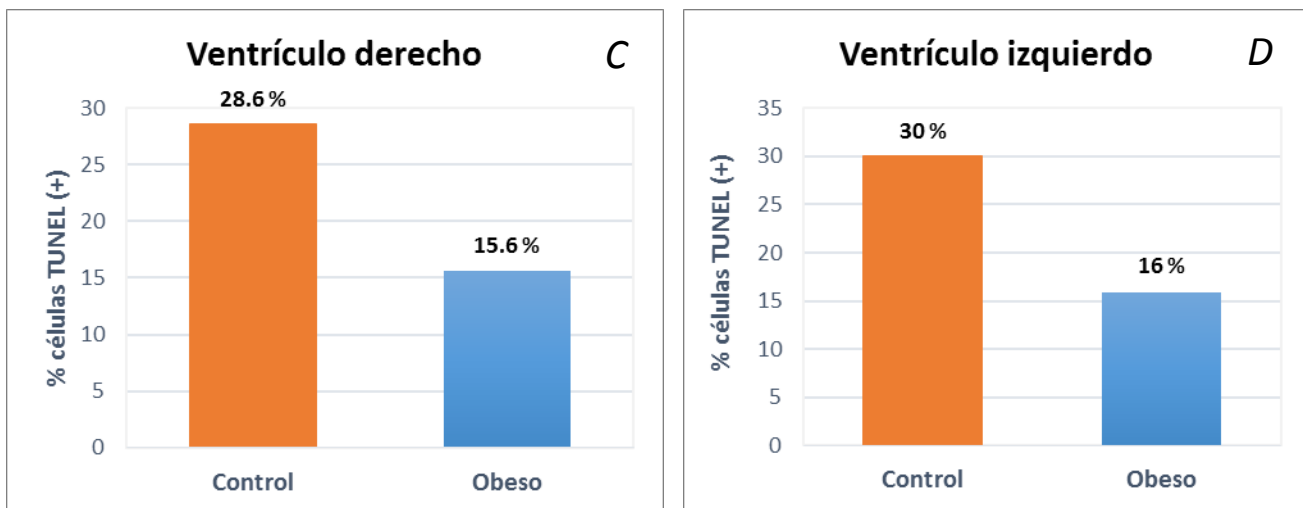


Figura 21. Cuantificación de células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL en ventrículos de corazones fetales estadio E16.5. En (A) se observa menor proporción de células inmunomarcadas caspasa 3 activadas a nivel del ventrículo derecho de los corazones fetales del grupo obeso. Igualmente, a nivel del ventrículo izquierdo (B), la proporción de inmunomarcación fue menor para este grupo experimental. Las células TUNEL positivas, estuvieron disminuidas tanto en el ventrículo derecho e izquierdo (C) y (D) de corazones fetales provenientes del grupo obeso en el estadio evaluado. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

8.3.3 Evaluación caspasa 3 activada y TUNEL en tabique interventricular del corazón fetal E16.5

En la región del tabique interventricular para el día E16.5 el porcentaje de marcación para caspasa 3 fue del 20.5% en los corazones de biomodelos del grupo control y del 15.5% para el grupo obeso, las diferencias no fueron significativas entre los grupos experimentales (Figura 22A). En cuanto al porcentaje de células TUNEL positivas detectadas en esta misma región, el 24.4% correspondió a los corazones del grupo control vs un 9.7% para el grupo obeso. (Figura 22B). Siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.000$).

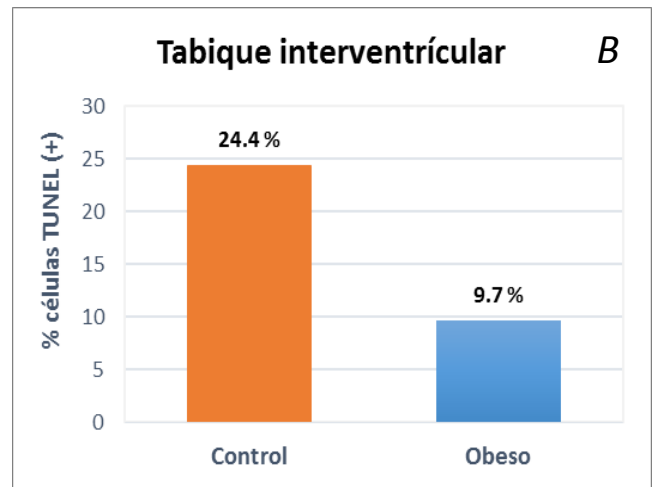
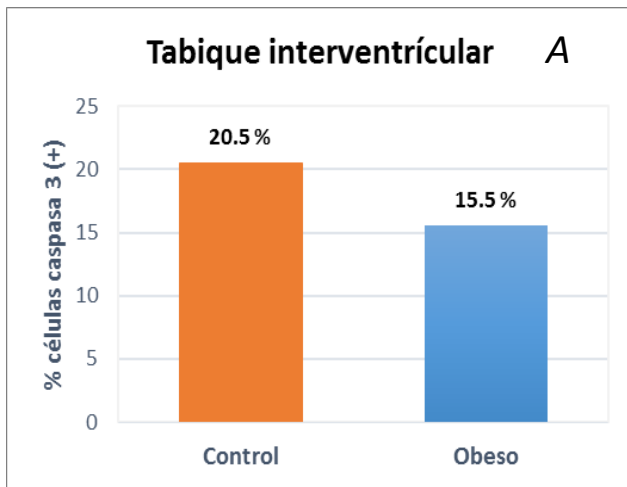


Figura 22. Porcentaje de células inmunomarcadas para caspasa 3 activada y TUNEL positivas en el tabique interventricular de corazones fetales estadio E16.5. Se evidencio, menor proporción de células inmunomarcadas a nivel del tabique interventricular (A), en los corazones de fetos procedentes de madres del grupo obeso vs grupo control. Las diferencias no son significativas. Una disminución de núcleos fragmentados (TUNEL), es observado en la misma región, en corazones procedentes de madres obesas vs el control. (A-B). Las diferencias son significativas ($p \leq 0.000$).

Hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, por lo tanto se opta por la hipótesis alterna que dice:

La obesidad materna en ratas *Wistar* genera cambios en el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía de su descendencia.

9. DISCUSIÓN

La correlación entre sobrepeso y obesidad con las alteraciones cardíacas congénitas ha sido demostrada por diversos autores como Cerdergren et al., 2003, Stothard et al., 2009 y Mills et al., 2010, quienes han referenciado y sugerido que el sobrepeso y la obesidad contribuyen a una mayor incidencia de daños congénitos del corazón, a nivel de ventrículos, atrios, tabique, anomalías septales e hipertrofia ventricular, entre otros (9)(20)(69). Mills evaluó una base de datos de 1.536.828, recién nacidos en Nueva York entre 1993-2003 teniendo en cuenta el Índice de Masa Corporal (IMC). En dicho estudio, la obesidad fue definida como un IMC igual o mayor a 29 kg/m², y en el grupo control fue representado por las mujeres con IMC entre 19,8 a 26 kg/m². Encontrando que el mayor porcentaje de malformaciones cardíacas correspondió a la descendencia proveniente del grupo de madres obesas, presentándose alteraciones como Síndrome de hipoplasia de corazón izquierdo, presencia de ventrículo solo, atresia de válvula tricúspide, atresia pulmonar, doble salida del ventrículo derecho, defectos de los cojines endocárdicos, Tetralogía de Fallot, defectos de septación ventricular y defectos septales a nivel atrial (69).

El estudio de Cedergren et al., 2003, compara la descendencia de mujeres obesas vs la descendencia de mujeres con peso normal. Los datos analizados incluyeron 6.801 mujeres que tuvieron hijos con defectos cardiovasculares. Este estudio reportó que la presencia de sobrenutrición materna incrementa el riesgo de malformaciones cardíacas en su descendencia, siendo significativamente importantes los defectos de tracto de salida, septación ventricular y atrial (9).

Queda demostrado entonces que la obesidad materna se asocia con un mayor riesgo de defectos congénitos del corazón, pero dado que esta patología responde a una amplia gamma de anomalías metabólicas, poco se sabe sobre su mecanismo de teratogenicidad.

Además se debe tener en cuenta que la etiología de la obesidad es multifactorial, involucra interacciones complejas entre los antecedentes genéticos, hormonas y diversos factores sociales y ambientales, como el sedentarismo y los hábitos alimenticios inadecuados, que incluyen las dietas altas en grasas e hipercalóricas, las cuales se convierten en factores que contribuyen a la creciente tasa de obesidad entre las mujeres en edad reproductiva y su descendencia (1)(70). Igualmente, la ingesta de alimentos procesados de alto consumo y en ocasiones más económicos que las comidas frescas y compuestas de ingredientes ricos en nutrientes elementales, han aumentado la tasa de obesidad (71). **Sin embargo cabe resaltar una vez más, que se desconoce, el mecanismo preciso que conecta la obesidad materna y la prevalencia de malformaciones cardíacas fetales.**

Para dar apoyo a los resultados obtenidos en los estudios epidemiológicos, las investigaciones biomédicas han incorporado la utilización de los animales de laboratorio como biomodelos naturales o inducidos de diversas enfermedades o procesos mórbidos, los cuales semejan lo sucedido en los humanos, con el fin de orientar y esclarecer los estados iniciales de diferentes patologías, ayudando así al estudio y a la comprensión de la patogenia, fisiología y posibilidades de nuevos tratamientos (25).

Arias-Díaz et al 2007, en una investigación sobre Diabetes mellitus tipo 2, clasificó los principales biomodelos en espontáneos e inducidos, según su mecanismo de producción y distinguió dos categorías en cada uno de ellos: modelos análogos que intentan imitar a la enfermedad humana, y modelos intrínsecos, con los que se pretende contestar preguntas concretas de aspectos específicos de la misma (72).

En este sentido, nuestro estudio estableció un modelo murino de obesidad inducido y análogo en el que se utilizó una dieta de cafetería. Este modelo fue seleccionado dentro de un variado grupo de biomodelos de obesidad establecidos en roedores, entre los que se destacan: 1) Los modelos genéticos que presentan defectos en el camino de señalización de la leptina como son los ratones ob/ob y db/db y las ratas Zucker que heredan la obesidad como una enfermedad autosómica presente en el gen “fatty” en el cromosoma 5; y 2). Los modelos de obesidad inducida por dieta, entre ellos las dietas altas en grasa, las dietas altas en carbohidratos y la dieta de cafetería (73)(74).

La dieta de cafetería se basa en la oferta de alimentos procesados de tipo “snack”, e imita la llamada dieta occidental de los seres humanos. Bajo esta dieta los animales se vuelven obesos por comer en exceso alimentos de alto contenido calórico (74). **La ventaja de establecer y utilizar este biomodelo, fue la obtención de animales obesos en corto tiempo, que semeja lo sucedido en los humanos que adquieren un aumento de peso corporal, por el consumo dietario de alimentos procesados hipercalóricos de fácil adquisición.**

Este biomodelo está orientado al estudio del impacto de la obesidad sobre la reproducción y el desarrollo embriofetal, e inicia su gestación con valores normales de colesterol, triglicéridos, glucosa y proteína C reactiva (75)(76).

El presente estudio se enfocó en determinar la presencia de alteraciones cardíacas en un biomodelo de obesidad materna adquirida por dieta, que permitió evaluar, de manera inicial, las características macroscópicas del corazón en desarrollo. Esto se realizó a través del análisis descriptivo de corazones fetales en estadio E16.5, momento en el cual el corazón de la rata presenta sus estructuras principales completamente desarrolladas (77). Las alteraciones encontradas en los corazones fetales de ratas obesas se relacionan con lo reportado en los estudios epidemiológicos antes descritos (9)(78)(69). En los biomodelos prevalecieron las alteraciones en el tamaño de los atrios, ventrículos y formación del tracto de

salida. **Estos hallazgos cobran importancia a la hora de relacionar la obesidad materna pregestacional y la presencia de alteraciones cardíacas, demostrando que el biomodelo de obesidad establecido es una buena herramienta para el estudio mecanístico de los efectos de la obesidad sobre la formación del corazón.**

A modo de profundizar en los hallazgos morfológicos externos se evaluó el grosor de la pared ventricular de los corazones fetales del E16.5, en los cuales se observó un incremento en el grosor de la pared ventricular derecha, sin llegar a ser significativo estadísticamente, en los corazones de los fetos de madres obesas. Estos resultados se relacionan con lo establecido por Wang et al 2010 que empleó un modelo de obesidad materna desarrollado en ovejas, donde observa un peso mayor relativo del ventrículo izquierdo, pero sin cambios en el grosor de la pared ventricular (79). **Es evidente que los cambios externos evidenciados en la evaluación macroscópica parecen no estar relacionados directamente con la hiperplasia del miocardio sino asociados a cambios de tamaño de las cámaras.**

Los médicos e investigadores han encontrado que la obesidad y la diabetes están conectadas, conduciendo a las personas obesas a un alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. (80). De manera puntual, la diabetes mellitus pregestacional, en su forma tipo 1 y 2, es un conocido inductor de malformaciones cardíacas. (81). Pero cuando se comparan los resultados obtenidos en nuestro estudio con los reportados para los biomodelos de diabetes se encuentran hallazgos diferentes Gutiérrez et al 2009, reporta una reducción total del miocardio en corazones fetales en estadio E17 de ratones diabéticos, estadio equivalente a la edad gestacional E16.5 de nuestro biomodelo (54). En este sentido, se presume que las vías teratogénicas de ambas patologías son diferentes.

A fin de responder, en parte, a los mecanismos involucrados en el establecimiento de alteraciones cardíacas producto de la obesidad materna, se evaluó el proceso de apoptosis, en dos etapas del desarrollo cardíaco, correspondientes a los días E13.5 y E16.5 procedentes de ratas normopeso y obesas. El estudio del perfil de apoptosis en este órgano fue seleccionado dado a su importancia durante el desarrollo cardíaco normal, en el cual modula temporo-espacialmente los diferentes procesos relacionados con la homeostasis tisular, por medio de la eliminación de células no deseadas. Igualmente, regula la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular, las cuales rigen la formación y remodelado de las diferentes estructuras en desarrollo (16)(38)(82). En el sistema cardiovascular, como en otros sistemas del organismo, este tipo de muerte es un fenómeno fisiológico durante el desarrollo embrionario y fisiopatológico en la vida adulta. En el primer caso permite la eliminación de estructuras vestigiales y en el segundo caso, su desregulación estaría implicada en la aparición y participación en la fisiopatología de diversas enfermedades cardíacas(14)(15). En este sentido estudios realizados en biomodelos obesos adultos muestran un aumento en la

apoptosis que sería responsable del incremento en la fibrosis cardiaca y fallas en la contractilidad del corazón (83)(55)(79). **Es claro entonces , que el proceso de apoptosis durante el desarrollo embrionario, y específicamente en la cardiogénesis, puede sufrir modificaciones por influencia de la obesidad materna, incrementándose así la probabilidad de alteraciones en las vías de señalización que pueden resultar en la desregulación del proceso, generando desordenes en la formación y maduración de las diferentes estructuras cardiacas (37).**

En nuestro estudio, se evaluó el proceso de apoptosis por medio de dos técnicas, inmunomarcación de caspasa 3 activada y TUNEL. Los hallazgos permitieron establecer en el estadio E13.5, que la actividad de la caspasa 3 fue menor a nivel del atrio izquierdo y ambos ventrículos, en los corazones de los fetos del grupo obeso. Las mismas regiones evaluadas por la técnica de TUNEL, en general, no mostraron diferencias con los corazones del grupo control. Esto se puede explicar dado que, a pesar de evaluar las mismas regiones y el mismo proceso, la diferencia en los resultados radica en el fundamento de ambas técnicas, ya que la caspasa 3 activada detecta el proceso en etapas iniciales mientras que el TUNEL detecta la fase final (84)(85)(86).

Para el día E16.5, los resultados permitieron establecer que la caspasa 3 activada a nivel de los atrios, ventrículos y el tabique interventricular, no mostró diferencias entre los grupos experimentales. Por el contrario, la evaluación por medio de la técnica de TUNEL mostró un aumento de la apoptosis en el atrio derecho y una disminución en el tabique interventricular en los corazones fetales del grupo obeso. No existen, hasta el momento, investigaciones previas con las cuales podamos comparar nuestros resultados sobre el proceso de apoptosis y el desarrollo cardíaco en condiciones de obesidad materna. Pero trabajos realizados durante el desarrollo normal en murinos indican que los compartimentos ventriculares y atriales del corazón se agrandan sin mostrar altos niveles de apoptosis en los cardiomicitos de estas cámaras, donde primarían los mecanismos de proliferación celular (16). Solo algunos miocitos apoptóticos fueron identificados por TUNEL y microscopía electrónica de transmisión en la zona trabecular del ventrículo en el corazón de ratón E11 a E16 (87). Al contrario a lo detectado en el crecimiento de las cámaras cardíacas, el proceso de apoptosis sería fundamental en el acortamiento y reestructuración del tracto de salida, evento que se origina temprano en el desarrollo del corazón (88) (89).

Con base en estos antecedentes, es claro que el proceso de apoptosis se encuentra alterado en los corazones fetales expuestos a condiciones obesogénicas maternas; y que dicho proceso está regulado de forma espacio-temporal en el desarrollo cardiaco. Esto se puede visualizar en las expresiones diferenciales de los marcadores de muerte celular programada evaluados en este trabajo, cuando comparamos la inmunomarcación para caspasa 3 activada y la detección de fragmentos de ADN entre los estadios E13,5

y E16,5. Mientras que caspasa 3 activada expresa diferencias en la inmunomarcación al día E13,5, la detección de los fragmentos de ADN por TUNEL, muestra mayores diferencias en el estadio E16,5. Es importante destacar que ambas técnicas coinciden en determinar la existencia de una disminución en el número de células apoptóticas en el tabique interventricular de los corazones obesos al día E16,5. Esto cobra importancia dado que, la formación del septo interventricular es un proceso complicado que implica la división del ventrículo común en dos cámaras, una derecha y otra izquierda, y la separación de la parte distal del bulbo cardíaco en la aorta y la arteria pulmonar (90). Por lo tanto defectos en esta estructura se relacionan con Tetralogía de Fallot, defectos completos del canal atrio ventricular y transposición de grandes vasos (69)(21). **Con base en los anteriores hallazgos podemos concluir que la obesidad materna en este biomodelo generó alteraciones en el proceso de apoptosis en los corazones fetales que son compatibles con malformaciones cardíacas descritas para humanos.**

10. CONCLUSIONES

1. El proceso de apoptosis se encuentra alterado en los corazones fetales que fueron expuestos a condiciones obesogénicas maternas; siendo este proceso regulado de forma espacio-temporal durante la cardiogénesis.
2. Las expresiones de los marcadores de muerte celular programada evaluados; caspasa 3 activada y detección de fragmentos de ADN fueron diferenciales entre los estadios E13,5 y E16,5. Mientras que caspasa 3 activada expresa diferencias en la inmunomarcación al día E13.5, la detección de los fragmentos de ADN por TUNEL, indicó mayores diferencias en el estadio E16,5.
3. La presente investigación permitió un acercamiento en la identificación, evaluación e interpretación de cambios histológicos ocurridos durante el proceso de apoptosis en la cardiogénesis y su relación con la obesidad pregestacional, si bien no podemos ligar de manera directa estos cambios con la anatomía macroscópica, si podemos relacionar la obesidad materna con el incremento de alteraciones en las cámaras cardíacas fetales.

11. RECOMENDACIONES

1. Incorporar a la evaluación macroscópica del corazón fetal, herramientas digitales que permitan realizar análisis morfométricos cuantitativos.
2. Se considera importante la futura evaluación a nivel del tabique interventricular de los marcadores de apoptosis por medio de otra metodología, como microscopía confocal que permita diferenciar los núcleos totales de los núcleos positivos para este proceso, ya que la gran celularidad de esta región dificulta la observación directa de las células inmunomarcadas.
3. Ampliar el estudio hacia la proliferación celular y su relación con los procesos de muerte celular durante el desarrollo cardíaco en condiciones de sobrealimentación materna.

ANEXO: 1. POE PARA ANESTESIA Y DISECCIÓN DE ÚTERO DE RATA WISTAR E IMPLANTACIONES

	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA ANESTESIA Y EXTRACCIÓN DE ÚTERO CON IMPLANTACIONES Y DE ÓRGANOS MATERNOS DE RATA WISTAR PREÑADA	CÓDIGO:
		VERSIÓN: 01
		FECHA DE VIGENCIA
Laboratorio de Histología		PÁGINAS: 1 DE 11
Realizado por: María Eleonora Tejada	Revisó Liliana Salazar Monsalve Carolina Pustovrh	Aprobó
Fecha	Fecha	Fecha

Observación: Este protocolo fue elaborado en el Marco del Proyecto de Investigación “Consecuencias de la Obesidad Materna sobre el Desarrollo Cardíaco Fetal” el cual cuenta con aprobación por parte del Comité de Ética de la Universidad del Valle. Este documento abarca la Anestesia del Biomodelo, la extracción del útero con sus implantaciones, así como de ciertos órganos maternos. Para la disección del útero y obtención de fetos y corazones fetales véase el POE respectivo.

Introducción

En los procedimientos de experimentación con animales la adecuada manipulación de los biomodelos es tan importante como la obtención de las muestras. Es un imperativo científico y ético durante un experimento evitar cualquier dolor y sufrimiento innecesario a los especímenes, de manera que la manipulación y realización del respectivo procedimiento no debe ir en detrimento de estos.

Por lo anterior, con el objetivo de dar un trato humanitario al animal, facilitar su manipulación y poder llevar a cabo la realización del procedimiento de extracción de fetos y órganos maternos se expone en este texto como método anestésico el Isoflurano (ISOFLURANO USP® - Baxter, frasco 100ml) administrado por vía inhalatoria. Adicionalmente, debido a que la muerte del biomodelo hace parte del protocolo experimental, se emplea la misma sustancia para inducir el cese de funciones del animal. La rápida y fácil alteración en los niveles de éste anestésico permite producir la muerte sin ocasionar dolor cuando se da una sobreexposición al inhalante, pues se genera hipotensión, depresión respiratoria y posterior cese de las funciones vitales. Este método es indoloro, rápido, evita la excitación, reproducible, irreversible, sencillo de administrar y seguro, cumpliendo con los criterios primordiales, en términos del bienestar del animal, para la realización de la eutanasia.

Métodos físicos para la eutanasia, como la dislocación cervical o la decapitación, no se consideran en este experimento, pues están indicados cuando los métodos químicos invalidan los resultados, y no es el caso.

En consideración con el principio de las tres R, creado por Russell y Burch, que postula el concepto de ciencia humanitaria y sensible para el trabajo científico garantizando el uso racional y respetuoso del animal experimental, reduciendo el número de animales usados en los proyectos de investigación, reemplazando el animal siempre que es posible por otro tipo de modelos, y refinando los procedimientos de manipulación mediante el uso de su etología; se ha presentado como parte del proyecto de investigación en el que se enmarca este protocolo la creación de un “Banco de Órganos Maternos de Ratas *Wistar* del Proyecto”, como alternativa de reducción en el número de animales empleados en investigación con la posibilidad de investigación de los cambios tisulares en grupos de ratas *Wistar* sometidos a tipos de dieta diferentes.

Objetivo.

Dar una guía para la realización de Anestesia y Extracción de útero con implantaciones en estadio E13.5 y 16.5 de Rata *Wistar*

Realizar las correspondientes extracciones y disecciones de implantaciones, obtención de fetos y explantación de corazones fetales.

1. Alcance.

Facilitar a todo el personal del Laboratorio de Histología de la Universidad de Valle un protocolo de Procedimiento Operacional Estándar (POE) para la Anestesia y Extracción de útero con implantaciones y de órganos maternos de Rata *Wistar* preñada.

2. Autoridad y Responsabilidad.

El coordinador del laboratorio y el comité de ética animal son la autoridad del documento. La responsabilidad es de cada persona que desarrolla este protocolo.

Para cualquier procedimiento que implique el uso de biomodelos es necesario la aprobación por parte del comité de ética animal de la universidad del Valle.

3. Biomodelos

Ratas Wistar preñadas, procedentes de un grupo Control y obeso, con embriones en estadio dpc, 13.5 dpc o 16.5 dpc, de acuerdo a la programación de los investigadores del proyecto.

Materiales

1. Papel servilletas absorbentes
2. Cajas Petri grandes y pequeñas
3. Vasos de precipitado
4. Recipientes de plástico para pesar
5. Tijera curva
6. Tijeras mosquito (Microcirugía) Pinza lisa
7. Pinza con garra
8. Pinza Kelly
9. Tijera de punta
10. Aguja 21 G
11. Frascos para almacenaje de embriones con respectivo fijador (PLP)
12. Hielo
13. Goteros
14. Nevera de icopor
15. Jeringa 10 ml
16. Tubos cónicos para muestra de sangre

Anestésico:

1. Isoflurano

Elementos de protección

1. Guantes desechables
2. Tapaboca
3. Gorro
4. Bata

Equipos

Cámara fotográfica

Balanza

Reactivos:

1. Fijador PLP
2. Solución fisiológica
3. Agua destilada
4. Alcohol al 70%
5. Hipoclorito
6. Heparina

Procedimiento: Disección Útero de Rata *Wistar* día 13.5 y 16.5 de gestación

1. Toma de medidas murinométricas del biomodelo materno correspondientes a peso, Talla 1, Talla 2 y circunferencia abdominal.

³Talla A: hocico - base de la cola

⁴Talla B: hocico - punta de cola

Talla C: Circunferencia abdominal



Imagen 1. Evaluación del peso del biomodelo (A). Toma de medida en centímetros desde punta del hocico-base de la cola y base de la cola –punta de la cola (B). Evaluación de la medida de la circunferencia abdominal (C).

1. Anestesia del biomodelo: ubicar algodón humedecido con isofluorano en jaula y depositar el biomodelo



Imagen 2. Biomodelo en proceso de anestesia vía inhalatoria

2. Ubicar el biomodelo en la mesa de disección
3. Seguir suministrando isofluorano vía inhalatoria hasta sedación profunda.
4. Realizar el respectivo seguimiento de pérdida de movilidad y sensibilidad del biomodelo monitoreando con pinzas en extremidad inferior la ausencia de respuesta a estímulo.



Imagen 3. Procedimiento de mantenimiento de anestesia vía inhalatoria biomodelo en gestación día E13.5.

5. Posterior a la verificación de pérdida de reflejos y movilidad del biomodelo colocarlo en posición de cubito supino, proceder a realizar tricotomía (corte de pelo) en el área abdominal, seguido de la limpieza de la zona con alcohol al 70%.



Imagen 4: Proceso de Cricotomía región abdominal de biomodelo en día gestacional E13.5

6. Realizar incisión lateral a nivel de la pelvis



Imagen 5: Incisión en abdomen inferior a nivel de la línea media.

7. Realizar abordaje y disección de las estructuras pélvicas (músculos) utilizando tijera

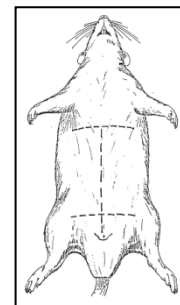


Imagen 6: Líneas de incisión para una completa exposición de la cavidad abdominal. Esquema modificado www.bosco.org.

8. Disecada la región pélvica se procede a separar y limpiar con algodón el tejido adiposo, con el fin de visualizar la vena abdominal, de donde se

realiza la toma de muestra de sangre con jeringa previa heparinización de la aguja (Imagen 7).



Imagen 7. Retroperitoneo disecado para exposición de grandes vasos y toma de muestra sanguínea (vena abdominal) en Rata *Wistar* preñada del grupo obeso con fetos en E13.5 dpc. Nótese el abundante tejido adiposo.

9. Obtenida la muestra se deposita en tubo plástico, dejando en reposo para posteriormente obtener el sobrenadante y realizar el respectivo centrifugado por 10 minutos, para la posterior obtención de la muestra de suero.
10. Localizar, visualizar, y cortar a nivel de los cuernos el útero con las implantaciones.

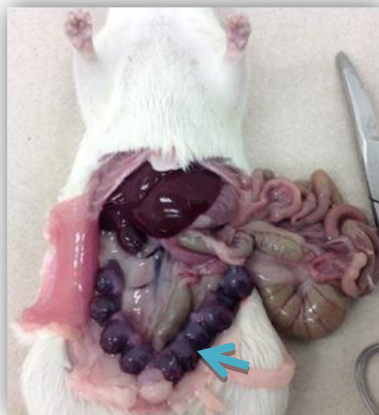


Imagen 8. Movilización del bloque intestinal y exposición de grandes vasos retroperitoneales en Rata *Wistar* preñada del grupo control con implantaciones.



Imagen 9. Zona de corte para la extracción completa del útero con sus respectivas implantaciones. Rata *Wistar* preñada del grupo obeso con fetos en E13.5 dpc.

11. Extracción del útero y traslado a servilleta de papel para separar el tejido adiposo

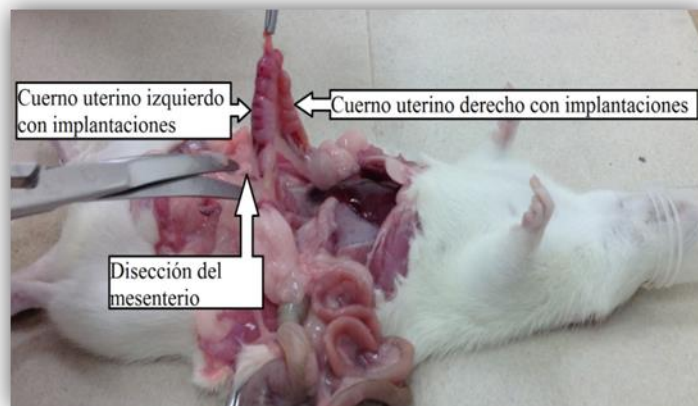


Imagen 10. Disección del mesenterio uterino en Rata *Wistar* Preñada del grupo obeso con fetos en E13.5 dpc.



Imagen 11. Bloque uterino con implantaciones. Izquierda: Se ubica la lateralidad de los cuernos en la servilleta. Observe los restos de grasa peri-ovárica así como los ovarios. Derecha: Bloque en caja de Petri con solución fisiológica.

12. Finalizado la limpieza de tejido adiposo del útero, este se deposita en placa petri con solución fisiológica para realizar el respectivo lavado.



Imagen 12. Lavado de útero en día 13.5 de gestación en solución fisiológica

13. Identificar y contar número de implantaciones existentes y registrar en el formato teniendo en cuenta la ubicación de cada implantación.



Imagen 13. Útero de Rata *Wistar* con 12 implantaciones. A la derecha se muestra el esquema de numeración estándar para la identificación y posición de las implantaciones.

14. Separación de implantaciones y disección de membranas para la obtención de fetos.
15. Ubicar las implantaciones separadas en cajas petri con solución fisiológica fría.
16. Se separan la totalidad de implantaciones y se depositan en solución fisiológica fría hasta la respectiva disección y obtención del feto.

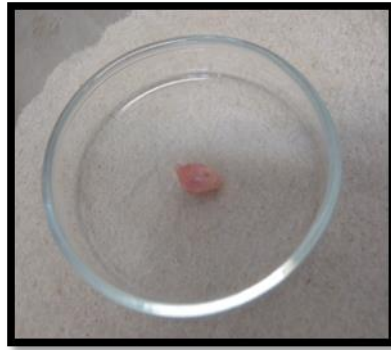


Imagen 14. Implantación procedente de rata *Wistar* en día gestacional E13.5.

17. Para cada una de las implantaciones en el día E13.5 y E16.5 se procede bajo estereomicroscopio a realizar la respectiva disección de implantaciones.
18. Con agujas delgadas o tijeras de microcirugía, hacer una incisión en el borde del saco embrionario.
19. Con la ayuda de micro pinzas se expone el feto.

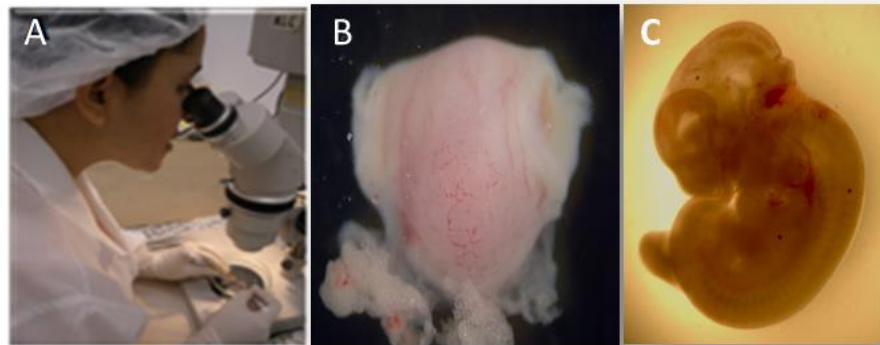


Imagen 15. Disección de deciduas para obtención de fetos y corazones fetales. (A) Disección de implantaciones bajo estereoscopia (B) Implantación para obtención de feto. (C) Feto en estadio 13.5

20. Obtenido el feto en día E13.5/E16.5, se colocan en tubos eppendorf con PLP (solución fijadora) y previa rotulación con los datos establecidos, durante 2 (dos) horas.
21. Terminado el tiempo de fijación, se hace cambio a alcohol al 70%.
22. Almacenamiento en nevera a 4°C.
23. Tener en cuenta que los fetos obtenidos en día E13.5 se fotografían en estereoscopia y sus respectivas placentas se fijan en PLP durante 24 horas.

24. Las placentas de día E16.5 se deben pesar y posteriormente fijar en PLP durante 24 horas.

25. Los fetos obtenidos se pesan y fotografían en caja Petri pequeña con solución fisiológica fría.

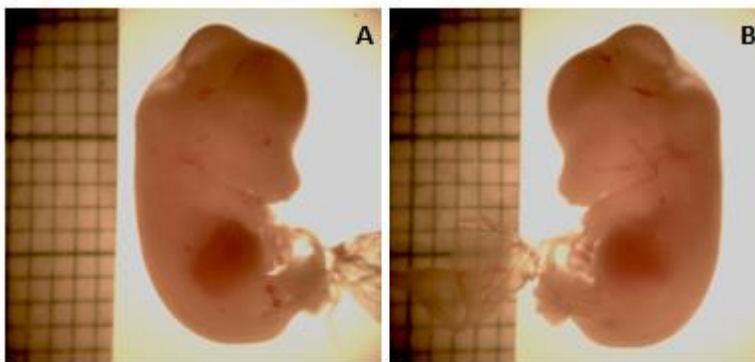


Imagen 16. Fotografía de fetos en día E16.5 de gestación observados en Estereoscopio. (A) Se observa un feto procedente de RWC5-16.5-06 -0.5X.10.1X. (LD)= lateral derecho. **(B)** RWC5-16.5-06 -0.5X.10.1X. (LI)=lateral izquierdo.

26. Terminada la toma de fotografías se procederá a la respectiva disección y extracción del corazón fetal en día E13.5 y E16.5.

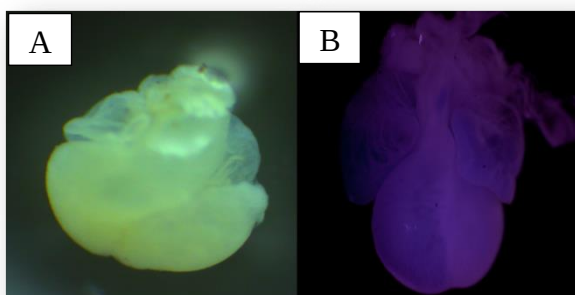


Imagen 17. Fotografía de corazones fetales en día 13.5 de gestación (A) y 16.5 (B) Posterior a la explantación. Procedimiento realizado bajo estereomicroscopio.

Finalizados los procedimientos, se procede a:

- Limpieza del área de trabajo.
- Lavado de instrumental.
- Inactivación de residuos de sangre con hipoclorito.
- Cernido de residuos de tejidos fetales, para el debido descarte en bolsas rojas al igual que los procedentes de la madre, los cuales deberán ser depositados en la nevera destinada a residuos biológicos.

ANEXO 2. POE PROCESO ESTANDAR DE DESHIDRATACIÓN, INCLUSIÓN EN PARAFINA Y CORTE DE CORAZON FETAL DE RATA *WISTAR* ESTADIO 13.5 Y 16.5

 Universidad del Valle	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA DESHIDRATACION – INCLUSION-CORTE DE CORAZONES FETALES DE RATA <i>WISTAR</i> EN ESTADIO 13.5 Y 16.5	CÓDIGO:
		VERSIÓN: 01
		FECHA DE VIGENCIA
Laboratorio de Histología		PÁGINAS: 1 DE 7
Realizado por: María Eleonora Tejada	Revisó Liliana Salazar Monsalve Carolina Pustovrh	Aprobó
Fecha	Fecha	Fecha

Introducción:

La inclusión es un método que permite el endurecimiento de las muestras y sus tejidos, infiltrando las muestras con sustancias líquidas (parafina) que después de un proceso de enfriamiento se solidifican, sin afectar las características de esta y sus componentes. Con este método se pueden obtener cortes (finos y sin romperse) del orden de μm a nm ; además de preservar la muestra por un largo periodo de tiempo.

Después de la fijación, las muestras deben ser incluidas para permitir la realización de cortes delgados. Tal dureza se obtiene embebiendo las muestras con sustancias líquidas que posteriormente se solidifican, como la parafina. La parafina no es hidrosoluble, entonces se debe sustituir el agua de los tejidos de la muestra por un solvente orgánico liposoluble (xilol). El agua se retira de los tejidos utilizando alcoholes en concentración ascendente (70%, 80%, 95% y 100%), luego

se infiltra con xilol y por último se añade la parafina que ocupa los lugares donde estaba el agua.

1. Objetivo.

- Realizar la deshidratación e inclusión en parafina de corazones fetales de rata *Wistar* en estadio 13.5 y 16.5.

2. Alcance.

Este procedimiento está dirigido a todo el personal del Departamento de Morfología que requiera deshidratar e incluir muestras, para su posterior corte y tinción.

3. Autoridad y Responsabilidad.

El coordinador del departamento es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el proceso.

Materiales

1. Pinzas lisas
2. Pinza Kelly
3. Toallas absorbentes
4. Canastillas de inclusión metálicas
5. Canastilla metálicas
6. Lápiz

Elementos de protección

- 1- Guantes desechables
- 2- Tapaboca
- 3- Gorro
- 4- Bata

Equipos

- 1- Cámara extractora (FEX 120)
- 2- Procesador de tejidos (Leica TP 1020)
- 3- Estación de inclusión (Histocentre 3)
- 4- Estufa

Reactivos:

- 1- Alcohol de 70%
- 2- Alcohol de 95%
- 3- Alcohol 80%
- 4- Alcohol 100%
- 5- Xilol
- 6- Parafina (Paraplast)
- 7- Hipoclorito de sodio 0.5%

4. Procedimiento

Antes de iniciar el procedimiento se debe realizar la limpieza del sitio de trabajo, y tener listo el material que se utilizara (corazones fetales). Dar inicio al procesador de tejidos una hora antes, para que la parafina esté totalmente derretida.

4.1 Preparación del lugar de trabajo:

El procedimiento de disposición de los corazones fetales (muestras) antes de su deshidratación se realiza en la campana extractora, ésta debe estar limpia y con los materiales a utilizar listos y ordenados, para el caso:

1. Pinzas lisas
2. Pinza Kelly
3. Toallas absorbentes
4. Canastillas metálicas para procesar muestra
5. Lápiz
6. Recipiente con alcohol de 70%

4.2 Obtención de los corazones fetales recipientes (tubos)

Extraer los corazones de los tubos eppendorf en los que encuentran almacenados para proceder a:

- Marcar con lápiz en papel filtro los respectivos datos de la muestra y depositar en la canastilla.
- Depositar el corazón a procesar en la respectiva canastilla metálica

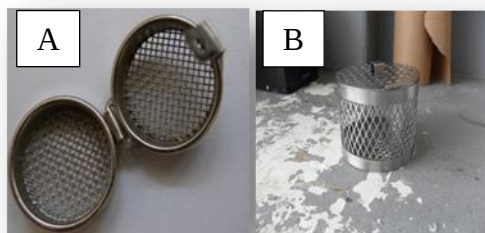


Imagen 1. Materiales para el procesamiento de corazones fetales estadio 13.5 y 16.5. (A) Canastilla metálica para depositar la muestra. **(B)** Recipiente para disponer las muestras a procesar.

- Pasarlo al recipiente que contiene alcohol de 70% (disponer todas las muestras).
- Llevar el recipiente al procesador de tejidos.



Imagen 2. Procesador de tejidos (Leica TP 1020)

4.3 Procesador de tejidos

El procesador de tejidos es un equipo que permite la deshidratación y la parafinización de los tejidos. Este equipo consta de 12 vasos:

Reactivos	Cantidad de vasos	Tiempo para corazones fetales
Alcohol 70%	1	20 minutos
Alcohol 80%	1	20 minutos
Alcohol 95%	2	20 minutos
Alcohol 100%	4	20 minutos
Xilol	2	20 minutos
Parafina	2	30 minutos

Se puede programar el equipo a diferentes tiempos para permitir una mejor deshidratación y parafinización de cada tipo de tejido.

4.4 Inclusión final en parafina.

Después de que salen las canastillas del procesador de tejidos, se pasan a la estación de inclusión; la cual debe de estar funcionando mínimo dos horas antes para que la parafina esté totalmente derretida (temperatura 60 °C); la placa fría y zona fría pueden estar funcionando media hora antes.

1. Las canastillas metálicas, después de sacarlas del procesador de tejidos se depositan en un zona caliente dentro de la estación junto con los moldes metálicos.
2. Verificar que la llave reguladora de parafina este abierta lo suficiente y se procede a llenar los moldes metálicos de parafina líquida.

3. Tomar la muestra de las canastillas con un pinza lisa y colocarla en el molde metálico ubicándola en la forma que se requiera.
4. Desplazar el molde hacia la zona fría haciendo presión negativa sobre la muestra; sostener el molde en la zona fría hasta que el fondo se solidifique.
5. Rápidamente colocar la base del cassette sobre el molde metálico (la tapa se descarta), agregar más parafina líquida; sin dejar que se rebose.
6. Pasar a la placa fría para que la parafina se solidifique. Después de que la parafina esté solidificada, se retira el molde metálico y queda lista la muestra para el proceso de corte.

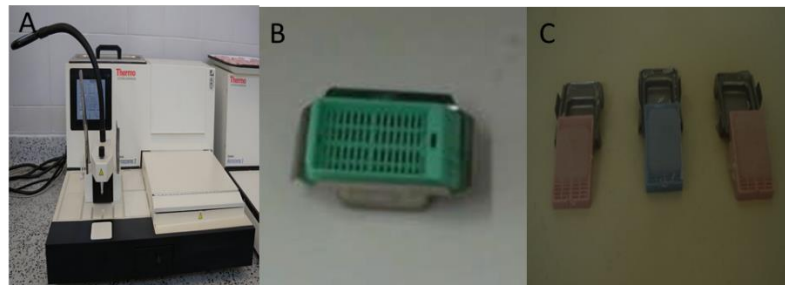


Imagen 3. Procedimiento inclusión en parafina de corazones fetales. En (A), se observa estación de inclusión (Histocentre 3). Elaboración de bloques con corazones fetales (B y C), para el respectivo proceso de corte.

Nota: El tanque de parafina se puede dejar a 56 °C cuando no se utilice; si se deja a 60 °C la parafina se puede quemar; si no se va a utilizar por un periodo prolongado, la estación debe apagarse por completo.

4.5 Procesamiento de corte en micrótopo de rotación

Se procede a previo calentamiento del baño María, posteriormente:

1. Se agrega 2g de gelatina al agua, en el cual se depositaran los cortes de las muestras obtenidas del corte del bloque de parafina para permitir su estiramiento.
2. Ubicar cual será la cara que primero se ponga en contacto con la cuchilla. Esta cara deberá ser más ancha que la opuesta, y ambas han de ser paralelas.
3. Trimar el bloque hasta hacer una pirámide en la parafina.
4. Con todo ello se consigue una buena orientación de la muestra en las secciones, que cada nuevo corte arrastre sin problemas al previamente cortado y que se puedan obtener tiras rectas de cortes.

5. Los bloques retallados se colocan en una cubeta de hielo.
6. Preparación del micrótopo para el corte:
 - Colocar la cuchilla, para lo cual se saca de su contendor y se limpia con alcohol para eliminar la sustancia grasosa con la que viene.
 - Orientación de la cuchilla respecto a la superficie de corte de la pirámide: Orientar la cuchilla en un ángulo de uno 10° respecto a la superficie de corte.
 - Seleccionar el grosor de corte de los tejidos para microscopia de luz: 4 micras de espesor.
 - Ubicar la muestra en el porta muestras y llevar éste soporte hacia atrás (para evitar llevarse el tejido por un corte accidental)
 - Al manipular la muestra la manivela del micrótopo debe de estar asegurada para evitar accidentes.

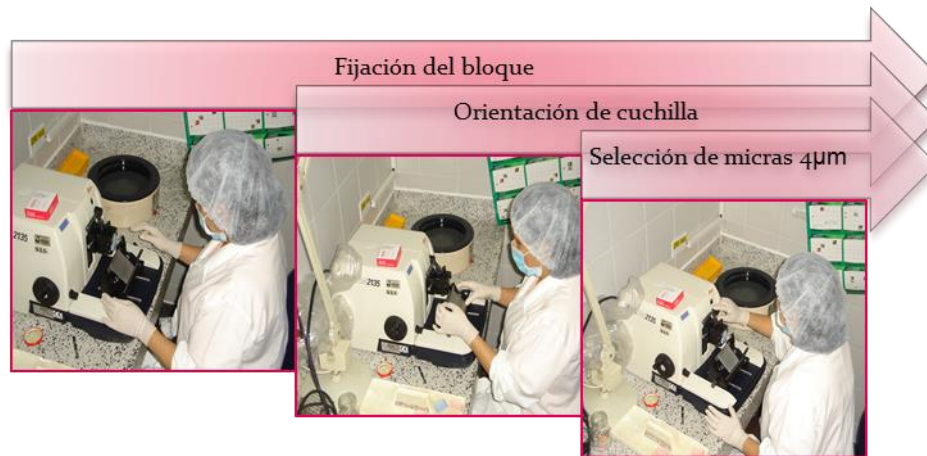


Imagen 4. Disposición y calibración del micrótopo de rotación.

7. La muestra retallada no está en contacto directo con la cara superior o de corte, por lo que es necesario un proceso de desbastado, utilizando el micrótopo.
8. Una vez comenzado el corte de la muestra se obtienen tiras de secciones unidas por las caras paralelas a la cuchilla. Estas tiras se manipulan con pinceles y, antes de su fijación definitiva en la superficie de un portaobjetos, han de estirarse para que el tejido quede perfectamente extendido.
9. Ubicar las secciones cortadas sobre el agua calentada y con gelatina a unos 35 °C a 40 °C ya que el calor las hace extender sin llegar a su punto de fusión. Antes de extender la muestra en el portaobjetos, éste debe de estar debidamente marcado con un código, que logre su identificación, para esto se utiliza el lápiz de punta diamante.
10. Una vez que el agua se ha escurrido y están extendidas las tiras de cortes de parafina sobre el portaobjetos, se procede a un secado

exhaustivo en una estufa a una temperatura de entre 35 °C y 40 °C durante toda la noche.

4.4 Desinfección y eliminación de residuos

Residuos de alcohol: estos residuos deben descartarse en los recipientes asignados o marcados como desechos de formol.

Los restos de muestra: Estos deben colocarse en bolsa roja y ser almacenado en nevera para ser llevados luego al sitio de recolección o directamente llevar al sitio.

Material usado debe ser desinfectado con hipoclorito de sodio y bien lavado con jabón neutro. Dejar secar y organizar en su sitio respectivo. El recipiente metálico del procesador de tejidos y los moldes metálicos deben lavarse con agua-jabón caliente para que le salga la parafina.

Los elementos de protección usados: Debe descartarse en bolsa roja.

Nota: El sitio de trabajo debe quedar limpio y listo para usar.

Referencias

1. Chacín, B. Curso Básico de Técnicas histológicas. Sesión III. Universidad de los Andes, Facultad de Medicina, Colombia. p.42
2. Kuhlmann, W. 2007. Dehydration and paraffin embedding of tissues for histology. Deutsches Krebsforschungszentrum DKFZ. p. 2
3. Montalvo, C. 2010. Técnica Histológica. En línea:
http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/Doc/Repaso_I/Apuntes%20bloque%20I/3_tecnica_histologica.pdf
4. Torres Fernando. Manual de técnicas en histología y anatomía patológica. Barcelona: Editorial Ariel .S.A; 2002. pág 45-52.
5. Molist, P. Pombal, M. & Megias, M. 2011. Atlas de histología vegetal y animal, técnicas histológicas. Universidad de Vigo.

ANEXO 3. POE PARA LA DETECCION INMUNOHISTOQUIMICA DE CASPASA 3 ACTIVADA EN CORTES DE CORAZONES FETALES INCLUIDOS EN PARAFINA ESTADIO 13.5 Y 16.5

	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA DETECCION INMUNOHISTOQUIMICA DE CASPASA 3 ACTIVADA EN CORTES DE CORAZONES FETALES INCLUIDOS EN PARAFINA ESTADIO 13.5 Y 16.5	CÓDIGO:
		VERSIÓN: 01
		FECHA DE VIGENCIA
Laboratorio de Histología		PÁGINAS: 1 DE 9
Realizado por: María Eleonora Tejada	Revisó Carolina Pustovrh	Aprobó
Fecha	Fecha	Fecha

Introducción

Las caspasas son esenciales para la apoptosis en las células, uno de los principales tipos de muerte celular programada en desarrollo y en otras etapas de la vida adulta. Son enzimas o proteasas que desempeñan un papel esencial en el proceso de apoptosis y la inflamación. Como proteasas, las caspasas son enzimas que escinden otras proteínas. Son denominadas proteasas de cisteína, puesto que utilizan un residuo de cisteína para cortar o escindir proteínas en el residuo de ácido aspártico. Se han identificado 14 diferentes, (12 caspasas en humanos y 2 en murinos). La determinación de la activación de la caspasa-3 presenta la ventaja que es un evento que tiene una alta correlación con la inducción de apoptosis, ya que con esta técnica se puede cuantificar el número y distribución de células apoptóticas, por lo tanto la activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de este proceso. Según la clasificación, existen caspasas iniciadoras como la CASP1, CASP2, CASP8, CASP9, CASP10, CASP12) y caspasas efectoras (CASP3, CASP6, CASP7, CASP14).

Objetivo.

Realizar el procedimiento para la determinación de la caspasa 3 activada, en cortes de corazones fetales en estadio 13.5 y 16,5 incluidos en parafina.

4. Alcance.

- Este procedimiento está dirigido a todo el personal del Departamento de Morfología que requiera realizar determinación de caspasa 3 activada en muestras fijadas en formol e incluidos en parafina.

5. Autoridad y Responsabilidad.

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el proceso.

6. Elementos de protección

Elementos de protección personal: Bata en material anti fluido de manga larga, guantes de nitrilo, careta, tapabocas, gafas de protección, zapatos cerrados, bata quirúrgica desechable, gorro, tapabocas y polainas.

Elementos de protección colectiva: cámara de flujo laminar.

7. Equipos, Instrumentos, Materiales y Reactivos

Equipos

1. Horno microondas
2. Agitador de Mazzini

Materiales

1. Cortes de corazones fetales en estadio 13.5 y 16.5.
2. Cámara húmeda
3. Pipetas automaticas
4. PAN PEN

Reactivos

1. Alcohol a diferentes concentraciones
2. Xilol
3. Buffer citrato Ph 6.0
4. PBS-T
5. Peroxidasa (H_2O_2)
6. Metanol
7. Suero de bloqueo Ultra V block (Kit Ultravision LP Value)

8. Anti cuerpo primario monoclonal anti caspasa-3 activado goat (SC22171).
9. Rabbit-antigoat IgG-B: SC Biotinilado 2774
10. Avidina-Biotina (Staining Sistem SC-2023)
11. Twin 20
12. Etanol grado reactivo
13. Alcohol etílico grado reactivo
14. Hematoxilina
15. Medio de montaje

Procedimiento

1. Desparafinar los cortes en 2 cambios de xilol durante 3 minutos cada cambio
2. Hidratar los cortes:
 - 2 cambios de alcohol al 100% durante 2 minutos
 - 2 cambios de alcohol al 95 % durante 2 minutos
 - 1 cambio de alcohol al 70% durante 1 minuto
3. Eliminar el alcohol y pasar a agua corriente durante 3 minutos.
4. Disponer las muestras en un coplin con Buffer citrato pH 6.0, para realizar la Recuperación antigénica. Tiempo 25 minutos utilizando microondas a una Potencia de 10
5. Terminada la recuperación antigénica, dejar atemperar las láminas con las muestras
6. Lavar 3 veces las láminas con PBS, durante 5 minutos cada lavado (usar agitación)
7. Bloquear la actividad de la peroxidasa endógena agregando al coplin, tampón de H₂O₂ /Metano al 3 % e incubar durante 20 minutos
9. Terminado el tiempo de bloqueo de la peroxidasa, lavar 3 veces con PBS durante 5 minutos cada lavado
10. Retirar las láminas del coplin, secarlas y marcar las muestras concéntricamente con PAN PEN
11. Indicar los cortes para control negativo, los cuales no llevaran anti-cuerpo primario, solamente PBS
12. Aplicar a los demás cortes, anticuerpo anti-caspasa 3 activada preparado así: Dilución 1/100 TBS-T (5 µl caspasa 3 en 500µl de PBS-T)
13. Incubar las muestras con anti cuerpo primario durante 5 minutos y guardar en nevera (realizar incubación en cámara húmeda) durante toda la noche a 4°C

Al día siguiente:

1. Recuperar el anti- cuerpo primario, lavar 3 veces con PBS durante 5 minutos (no usar agitación)
2. Secar las muestras y agregar a los cortes Rabbit–Antigoat biotinilado Dilución 1/200 e incubar 1hora y 15 minutos a temperatura ambiente (sin agitación) y en cámara humeda.

3. Recuperar el Rabbit–Antigoat. Realizar 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno
4. Finalizado el tiempo de incubación retirar el Rabbit-Antigoat (Recuperar)
5. Lavar 3 veces con PBS durante 5 minutos cada uno
6. Incubar 30 minutos con Avidina-Biotina (no recuperar)
7. Lavar 3 veces con PBS durante 5 minutos cada lavado
8. Preparar revelador DAB (Diaminobencidina), utilizando la botella del Kit
9. Agregar revelador a las láminas e incubar durante 15 minutos
10. Finalizado el tiempo de incubación con la DAB, realizar 3 lavados así:
Primer lavado durante 10 minutos utilizando agua destilada
Segundo y tercer lavado durante 5 minutos
Nota: Inactivar y DAB con hipoclorito y descartar en el respectivo recipiente dispuesto para esto.
11. Realizar contra tinción con hematoxilina (tiempo 3 segundos solamente en el colorante dispuesto en un coplin)
12. Lavar con agua destilada 2 veces durante 5 minutos cada lavado
13. Deshidratar (utilizar batería de IHQ)
Alcohol al 70% (un cambio)
Alcohol al 95 % (3 cambios)
Alcohol al 100% (3 cambios)
Xilol (4 cambios)
15. Realizar el respectivo montaje

ANEXO 4. POE PARA LA TECNICA DE TUNEL EN CORTES DE CORAZONES FETALES INCLUIDOS EN PARAFINA ESTADIO 13.5 Y 16.5

	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA TECNICA DE TUNEL EN CORTES DE CORAZONES FETALES INCLUIDOS EN PARAFINA ESTADIO 13.5 Y 16.5	CÓDIGO:
		VERSIÓN: 01
		FECHA DE VIGENCIA
Laboratorio de Histología		PÁGINAS: 1 DE 4
Realizado por: María Eleonora Tejada	Revisó Carolina Pustovrh	Aprobó
Fecha	Fecha	Fecha

Introducción

La valoración de la apoptosis por el método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado o técnica de TUNEL (TDT-mediated d-UTP nick end labelling) tiene su fundamento en la detección de la rotura del ADN internucleosomal, característica de la apoptosis. La técnica se basa en la incorporación de nucleótidos modificados, llevada a cabo por la enzima trasferrasa terminal (TdT), en los extremos 3'-OH libres que se generan al fragmentarse el ADN. Los núcleos de células no apoptóticas presentan un número muy bajo de extremos 3'-OH libres, por tanto no resultan positivas para TUNEL.

En células apoptóticas, los nucleótidos unidos a dioxigenina son detectados a continuación, utilizando anticuerpos antidioxigenina conjugados con peroxidasa; obteniéndose una marca nuclear positiva luego del revelado con diaminobencidina (DAB).

Objetivo.

Realizar el procedimiento para la determinación y cuantificación de células TUNEL positivas en cortes de corazones fetales en estadio 13.5 y 16.5 incluidos en parafina.

8. Alcance.

- Este procedimiento está dirigido a todo el personal del Departamento de Morfología que requiera realizar determinación y cuantificar células *TUNEL* positivas muestras incluidas en parafina.

9. Autoridad y Responsabilidad.

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el proceso.

10. Elementos de protección

Elementos de protección personal: Bata en material anti fluido de manga larga, guantes de nitrilo, careta, tapabocas, gafas de protección, zapatos cerrados, bata quirúrgica desechable, gorro, tapabocas y polainas.

Elementos de protección colectiva: cámara de flujo laminar.

11. Equipos, Instrumentos, Materiales y Reactivos

Equipos

1. Horno microondas
2. Agitador de Mazzini
3. Microscopio de luz

Muestras: cortes de corazón fetales en estadio 13.5 y 16.5.

Reactivos

1. Alcohol de 70%
2. Alcohol de 95%
3. Alcohol 80%
4. Alcohol 100%
5. Xilol
6. Buffer citrato pH 6.0
7. Peroxidasa (H_2O_2)
8. Metanol

9. PBS
10. ApopTag Fluorescein In Situ (S7110) que incluye:
11. Buffer de equilibrio
12. Working Strenght TdT
13. Stop Wash Buffer
14. Working strength anti-digoxigenin conjugate
15. Antifluoresceina HPR (Roche) 111426346910
16. Diaminobencidina (DAB)
17. Hematoxilina
18. Medio de montaje

Procedimiento

Para la realización de esta técnica, se utilizaron cortes de 4µm de espesor de corazones fetales en estadio E13.5 y E16.5, se procedió a:

1. Desparafrinar los cortes:

- 3 cambios de xilol durante 3 minutos cada cambio
- 2 cambios de etanol absoluto (100%) durante 5 minutos
- 1 cambios de etanol al 95 % durante 5 minutos
- 1 cambio de etanol al 70% durante 5 minutos
- 1 cambio a agua destilada durante 3 minutos

2. Proceder a realizar rrecuperación antigénica (microondas), para lo cual las placas con las muestras se ubican en un coplín con buffer citrato pH 6.0, se programa el microondas a una Potencia de 10. Tiempo de la recuperación antigénica 25 minutos.

3. Lavar 2 veces las láminas con PBS, durante 5 minutos cada lavado usando agitación)

4. Bloquear la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ /CH₄ al 3% durante 20 minutos.

Preparar así:

- 10 ml de agua oxigenada (H₂O₂)
- 90 ml de metanol (CH₄)

5. Terminado el tiempo de bloqueo de la peroxidasa endógena, lavar 3 veces con PBS durante 5 minutos cada lavado

6. Aplicar buffer de equilibrio (Tapa azul), para lo cual se debe quitar el exceso de líquido alrededor de los cortes y aplicar aproximadamente 30µl a cada corte

7. Incubar por menos de 10 segundos a temperatura ambiente, seguidamente secar con servilleta con suaves golpes para eliminar el buffer de equilibrio. Posteriormente aplicar Working Strenght TdT enzima (tapa roja), preparándolo así:

77 μ l de buffer de reacción (ref: 90417)
33 μ l de TdT enzima (tapa amarilla)

Aplicar y colocar papel film transparente e incubar durante una hora

Nota: Los controles negativos fueron cortes incubados sin TdT, incubarlos con PBS

8. Aplicar Stop/Wash Buffer, preparándolo previamente y luego de usarlo recuperarlo. Utilizando coplín y agitación durante 15 segundos e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Lavar tres veces durante un minuto cada lavado con PBS.

9. Aplicar Working/Strenght anti-digoxigenín conjugate (tarro café), para lo cual se debe hacerse primero dos (2) lavados de la solución de bloqueo

Preparándola así:

68 μ l x 2 = 136 μ l de la solución de bloqueo

62 μ l x 2 = 124 μ l de anti-digoxigenin conjugate

Luego aplicar a las placas 26 μ l del compuesto, colocar papel film, incubar durante 30 minutos evitando la luz (utilizar cámara húmeda)

10. Terminado el tiempo de incubación, lavar cuatro (4) veces con PBS por espacio de 2 minutos cada vez

11. Aplicar anti fluoresceína (cantidad de 50 μ l en cada placa) luego tapar por espacio de 45 minutos para su incubación a temperatura ambiente y oscuridad, terminado el tiempo hacer tres (3) lavados con PBS durante cinco (5) minutos cada uno

12. Revelar con Diamino benzidina (DAB), prepararlo así:

1.6 ml de buffer sustrato

1 gota de DAB

1 gota de Peroxidasa

13. Incubar durante 15 minutos y hacer lavados así: primero con agua destilada durante 10 minutos, segundo y tercer lavado por espacio de cinco (5) minutos cada uno

14. Finalmente hacer contra tinción con hematoxilina durante tres (3) segundos solamente para cada lámina en coplín, y lavar con agua destilada dos (2) veces por espacio de cinco (5) minutos cada lavado

15. Deshidratar los cortes utilizando batería para inmunohistoquímica por cuatro (4) minutos cada cambio, utilizando:

Alcohol	70%	1 cambio
Alcohol	95%	3 cambios
Alcohol	100%	3 cambios
Xilol		4 cambios

16. Realizar el respectivo montaje de las placas.

**ANEXO 5. POE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS CASPASA 3
ACTIVADA POSITIVAS (PRUEBA DE CONCORDANCIA)**

	CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNOMARCADAS CASPASA 3 ACTIVADA EN MUESTRAS PARAFINADAS DE CORAZONES FETALES EN ESTADIO E13.5 Y E16.5. (PRUEBA DE CONCORDANCIA)	CÓDIGO:
		VERSIÓN: 01
		FECHA DE VIGENCIA
Laboratorio de Histología		PÁGINAS: 1 DE 7
Realizado por: María Eleonora Tejada	Revisó Carolina Pustovrh	Aprobó
Fecha	Fecha	Fecha

Independientemente del diseño de investigación, la validez de un estudio puede verse afectada si se utilizan mediciones poco fiables. Una importante fuente de error de medición es producto de la variabilidad inter observador, cuya magnitud es posible de estimar a través de los llamados estudios de concordancia, los cuales tienen como objetivo estimar hasta qué punto dos observadores coinciden en su medición¹. Por lo tanto, los métodos estadísticos de evaluación de concordancia permiten determinar la fiabilidad en la evaluación de la repetición de un evento. En este caso, se realizara la cuantificación de células inmunomarcadas caspasa 3 activada positivas. Para lo cual se realizara una prueba piloto para determinar la concordancia entre experto e investigador. Serán evaluadas el porcentaje de células inmunomarcadas caspasa 3 activada, en muestras de corazones fetales de Rata *Wistar* en edad gestacional 13.5 y 16.5, para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Por lo tanto, es fundamental contar con un protocolo de identificación y cuantificación de células que incluya los parámetros a estudiar.

Objetivo

Determinar el grado de concordancia intra observador e inter observador en la cuantificación de células inmunomarcadas caspasa 3 activada.

Materiales

- Microscopio Leica DM 750
- Cámara Leica DFC 295
- Programa LAS V3
- Computador de escritorio Dell
- Contador manual para células de una tecla Marca Tokio

Muestra

De la muestra total de cortes de corazones $n=12$ correspondientes a (6 del grupo control y 6 del grupo obeso), se seleccionaron al azar cuatro (4) cortes de $4\mu\text{m}$ de espesor de corazones que estuvieran completos, según distribución (Ver tabla 1).

Tabla 1. Distribución de muestras de cortes de corazones fetales en estadio 13.5 y 16.5

	Edad Gestacional			
	E13,5		E16,5	
	Control	Obeso	Control	Obeso
Total cortes	1	1	1	1
Áreas a evaluar	5	5	5	5
Total de conteos por área	3	3	3	3
Total de mediciones	15	15	15	15

Posterior a el procesamiento inmunohistoquímico para los preparados histológicos, se realiza la cuantificación directa de las células inmunomarcadas por campo de visión utilizando un microscopio óptico Leica DM 750 adaptado a su respectiva cámara Leica DFC 295 a aumento de 100X, el microscopio está ubicado en el departamento de morfología.

La evaluación se realiza en cinco (5) áreas específicas (atrios derecho e izquierdo, ventrículos derecho e izquierdo y tabique interventricular), teniendo en cuenta en

cada región seleccionar un área al azar en la cual se realiza siempre la cuantificación por triplicado (Imagen 1).

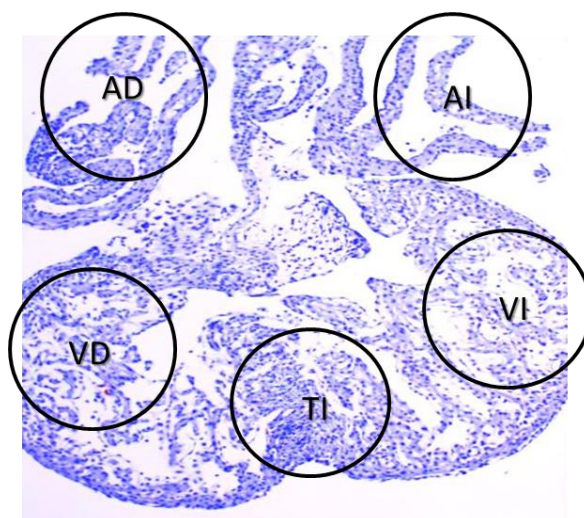


Imagen 1: Regiones a evaluar y cuantificar en el corazón fetal estadio E13.5. AD= atrio derecho. VD=ventrículo derecho. TI=tabique interventricular. VI=ventrículo izquierdo. AI= atrio izquierdo.

Para certificar que siempre es la misma región en la que se realiza la cuantificación de células inmunomarcadas, se tendrá en cuenta las coordenadas de posición de la placa con la muestra y los respectivos valores en milímetros en los correspondientes ejes X y Y (**Ver tabla 2 y 3**).

Tabla 2. Coordenadas para la ubicación de las placas con muestras del estadio E13.5

Biomodelo	Código corazón	Ventrículo derecho		Tabique Interventricular		Ventrículo izquierdo		Atrio derecho		Atrio izquierdo	
		Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)
1	RWO-FIII-1-H13.5-08	10	140	10	142	10	142	10	141	10	140
5	RWCPII-18-H13.5-05	9	137	9	137	10	137	9	136	9	138

Tabla 3. Coordenadas para la ubicación de las placas con muestras del estadio E16.5

Biomodelo	Código corazón	Ventrículo derecho		Tabique Interventricular		Ventrículo izquierdo		Atrio derecho		Atrio izquierdo	
		Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)
2	RWOFII-03-H16.5-05	5,2	135	6	137	6	135	4	135	6	135
5	RWCPI-11-H16.5-11	12	135	12	155	12	135	11	136	13	135

Posteriormente, en los mismos campos de visión se identifican y se registran la cantidad de células marcadas caspasa 3 activada positivas. Para la determinación

del grado de concordancia se utilizan los mismos datos durante la cuantificación en los cortes y en las áreas especificadas (Tabla 2 y 3) las cuales fueron revisadas por el experto y el investigador

Áreas de medición

Se encuentran establecidos en la tabla 4 y 5 de la matriz de recolección de datos en la que se realiza el registro respectivo.

Tabla 4. Matriz de recolección de datos cuantificación células caspasa 3 activada estadio 13.5

Biomodelo	Código Corazón	CT-AD/CTC (+)AD	CT-AD/ CTC(+AD)	CT-AD/ CTC(+AD)	CT-VD/ CTC(+VD)	CT-VD/ CTC(+VD)	CT-VD/ CTC(+VD)	CT- TI/CTC(+TI)	CT- TI/CTC(+TI)	CT- TI/CTC(+)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-AI/ CTC(+AI)	CT-AI/ CTC(+AI)	CT-AI/ CTC(+AI)
1	RWO-FIII-1-H13.5-08															
5	RWCFII-18-H13.5-05															

Tabla 5. Matriz de recolección de datos cuantificación células caspasa 3 ativada estadio 16.5

Biomodelo	Código Corazón	CT-AD/ CTC(+AD)	CT-AD/ CTC(+AD)	CT-AD/ CTC(+AD)	CT-VD/ CTC(+VD)	CT-VD/ CTC(+VD)	CT-VD/ CTC(+VD)	CT-TI/CTC(+TI)	CT-TI/CTC(+TI)	CT-TI/CTC(+TI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-AI/ CTC(+AI)	CT-AI/ CTC(+AI)	CT-AI/ CTC(+AI)
2	RWOFI-3-H16.5-02															
5	RWCFI-11-H16.5-11															

Abreviaturas

CT_AD	Número de células totales en el campo de visión del atrio derecho
CT_VD	Número de células totales en el campo de visión del ventrículo derecho
CT_TI	Número de células totales en el campo de visión del tabique interventricular
CT-VI	Número de células totales en el campo de visión del ventrículo izquierdo
CT_AI	Número de células totales en el campo de visión del atrio izquierdo
CTT(+)	
AD	Número de células caspasa 3(+) en el campo de visión del atrio derecho
CTT(+)	Número de células caspasa 3 (+) en el campo de visión del ventrículo derecho
VD	
CTT(+)	Número de células caspasa 3(+) en el campo de visión del tabique interventricular
TI	
CTT (+)	Número de células caspasa 3(+) en el campo de visión del ventrículo izquierdo
VI	
CTT(+)	Número de células caspasa 3 (+) en el campo de visión del atrio izquierdo
AI	

Parámetros estadísticos

Con base en las cuantificaciones realizadas por el experto y el investigador, se procede a calcular: el coeficiente correlación de concordancia (CCC), índice de Linn.

Procedimiento:

Cuantificación de células inmunomarcadas caspasa 3 activada positivas

Se tendrá en cuenta las siguientes pautas:

1. Seleccionar el corte completo del corazón fetal en estadio específico
2. Ubicar la placa con el corte en el microscopio, visualizar en aumento de 10X. Identificar en el campo el área a evaluar (atrio derecho, ventrículo derecho, tabique interventricular, ventrículo izquierdo, y atrio, izquierdo).
3. Colocar aceite de inmersión y visualizar con aumento de 100X la región de interés.
4. Posicionar la placa utilizando la reglilla ubicada en la platina del microscopio, según coordenadas dadas para cada región (Ver tabla 2 y 3)

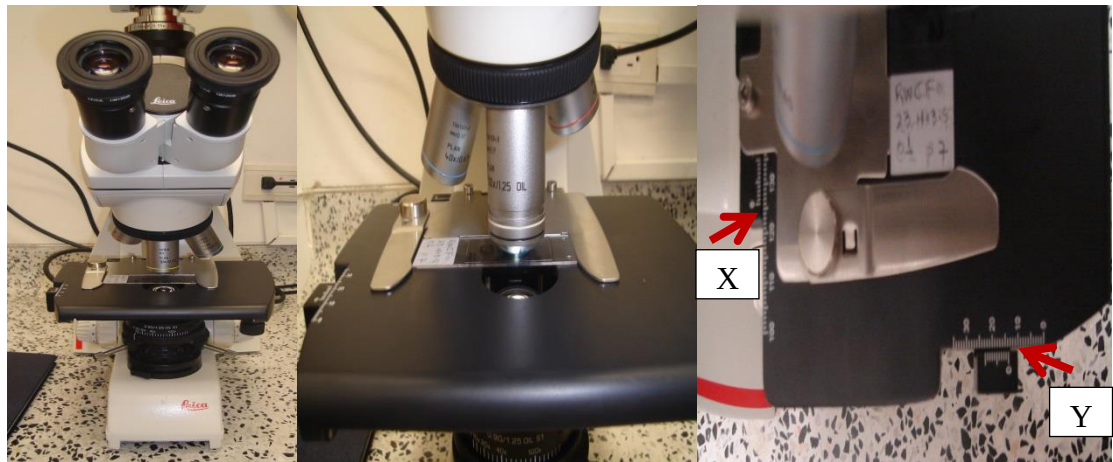


Imagen 2. (A) Ubicación muestra aumento 10X. (B) Enfoque aumento 100X. (C) coordenadas de ubicación de las respectivas muestras.

5. Enfocar y realizar el conteo del total de células en el campo de visión utilizando el contador manual de células de una tecla. Registrar la cantidad de células en la respectiva matriz de recolección de datos.

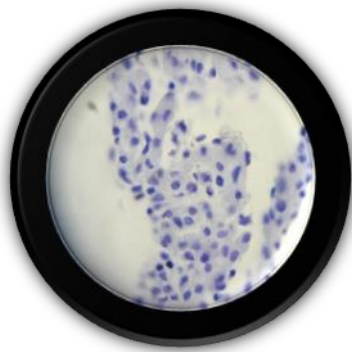


Imagen 3. Vista microscópica en el atrio izquierdo de corazón fetal estadio E13.5 a aumento de 100X.



Imagen 4. (A) Cuantificación de células inmunomarcadas caspasa 3 activada. En (A) se indica el total de células en el campo de visión en un área específica. (B) Total de células inmunomarcadas caspasa 3 activada positivas en el campo de visión en el área correspondiente indicada en (A).

6. En el mismo campo de visión realizar la identificación y respectiva cuantificación de células caspasa 3 activada positivas (+). Para lo cual se tiene en cuenta las células marcadas tinción citoplasmáticas y/o nuclear teñidos de color marrón (Imagen 4).
7. Finalmente, registrar los valores obtenidos en la matriz de recolección de datos respectiva (Tablas 4 y 5)
8. Realizar la cuantificación por triplicado en cada región bajo las mismas condiciones y criterios establecidos en tres momentos diferentes.

ANEXO 6. POE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNOMARCADAS CASPASA 3 ACTIVADA Y TECNICA DE TUNEL EN MUESTRAS PARAFINADAS DE CORAZONES FETALES ESTADIO E 13.5 Y E16.5

	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA CUANTIFICACION DE CELULAS INMUNOMARCADAS CASPASA 3 ACTIVADA Y TECNICA DE TUNEL EN MUESTRAS PARAFINADAS DE CORAZONES FETALES ESTADIO E 13.5 Y E16.5	CÓDIGO:
		VERSIÓN: 01
		FECHA DE VIGENCIA
Laboratorio de Histología		PÁGINAS: 1 DE 10
Realizado por: María Eleonora Tejada	Revisó Carolina Pustovrh	Aprobó
Fecha	Fecha	Fecha

Introducción

Son varios los métodos desarrollados para detectar células apoptóticas, sin embargo, la mayoría no son aplicables a secciones histológicas de tejidos embebidos en parafina. Los avances en la comprensión de los eventos moleculares ocurridos en el proceso de apoptosis han llevado a la búsqueda de diferentes técnicas de detección de dicho evento. Por lo cual, la realización de ensayos que detecten la caspasa 3 activada es uno de los métodos ampliamente descritos, siendo este uno de los indicadores específicos para la detección de este mecanismo de suicidio celular (85). Las caspasas, son una serie de cistein-proteasas que se encuentran en forma de zimógeno en todas las células, utilizándose la activación de la caspasa 3 como marcador temprano de la apoptosis (61). Se expresan ampliamente en una forma de pro enzima inactiva en la mayoría de las células y una vez activadas puede activar otras procaspasas, permitiendo la iniciación de una cascada de proteasas. Algunas procaspasas

también tienen la capacidad de auto activarse. Esta cascada proteolítica, en la que una caspasa puede activar otras caspasas, amplifica la vía de señalización de apoptosis (38).

La expresión morfológica de apoptosis se caracteriza por la condensación de la heterocromatina nuclear, la disminución de tamaño celular y la condensación citoplasmática, lo que da lugar a la imagen morfológica que se conoce como cuerpo apoptótico. Este proceso ocurre tan rápidamente, que se hace difícil observarlo y cuantificarlo utilizando solamente la morfología. Otro método directo útil para estudiar la apoptosis es la técnica de TUNEL (*TdT-mediated x-dUTP nick end labeling*) (91); por lo tanto la técnica se basa en analizar las características de fragmentación del ADN, fenómeno posible de observarlo por medio de la técnica de TUNEL, permitiendo de esta manera, observar las células apoptóticas y su localización en un órgano a estudiar. El fundamento del ensayo radica en marcar los extremos de los fragmentos nucleosomales, con predominio de terminales 3'OH libres en cadenas simples o dobles de ADN, que pueden ser detectados mediante la incorporación de nucleótidos marcados con digoxigenina por acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). De esta manera los fragmentos de ADN que se generan durante el proceso de apoptosis pueden identificarse y localizarse "*in situ*". Teniendo en cuenta las bien conocidas características morfo típicas descritas y caracterizadas por Kerr y Wyllie (63).

En este sentido, es indispensable establecer criterios claros para la cuantificación de células inmunomarcadas caspasa 3 activada y TUNEL positivas en cortes parafinados de corazones fetales de Rata *Wistar* en edad gestacional E13.5 y E16.5.

Objetivo

Establecer el protocolo de cuantificación de células inmunomarcadas caspasa 3 activada y TUNEL positivas en corazones fetales de rata *Wistar* en estadio E13.5 y E16.5 provenientes de un grupo control y un grupo obeso.

Materiales

- Microscopio Leica DM 750
- Cámara Leica DFC 295
- Programa LAS V3
- Computador de escritorio Dell
- Contador manual para células de una tecla Marca Tokio

Muestra

Cortes de 4 µm de grosor de corazones fetales de rata *Wistar* en estadios E13.5 y E16.5. Los corazones completos fueron incluidos en parafina y procesados para obtener cortes de espesor, según distribución (Ver tabla 1 y tabla 2).

Tabla 1. Distribución de muestras evaluadas por medio de la técnica de inmunohistoquímica para detección de caspasa 3 activada.

Parámetro	Caspasa 3 activada			
	Edad E13.5		Edad E16.5	
	Grupo control	Grupo obeso	Grupo control	Grupo obeso
Total cortes	3	3	3	3
Áreas a evaluar	5	5	5	5
Total de conteos por área	3	3	3	3
Total de mediciones	90	90	90	90

Tablas 2: Distribución de muestras evaluadas por medio de la técnica de TUNEL

Parámetro	TUNEL			
	Edad E13.5		Edad E16.5	
	Grupo control	Grupo obeso	Grupo control	Grupo obeso
Total cortes	3	3	3	3
Áreas a evaluar	5	5	5	5
Total de conteos por área	3	3	3	3
Total de mediciones	90	90	90	90

Posterior a la realización del procesamiento inmunohistoquímico para los preparados histológicos, se realiza la cuantificación directa de las células inmunomarcadas **caspasa 3 activada** por campo de visión y células **TUNEL positivas**, utilizando un microscopio óptico Leica DM 750 adaptado a su

respectiva cámara Leica DFC 295 a aumento de 100X ubicado en el departamento de morfología.

La evaluación se realiza en cinco (5) regiones específicas (atrios derecho e izquierdo, ventrículos derecho e izquierdo y tabique interventricular), teniendo en cuenta en cada región seleccionar un área al azar en la cual se realizó siempre la cuantificación por triplicado. (Ver figura 1).

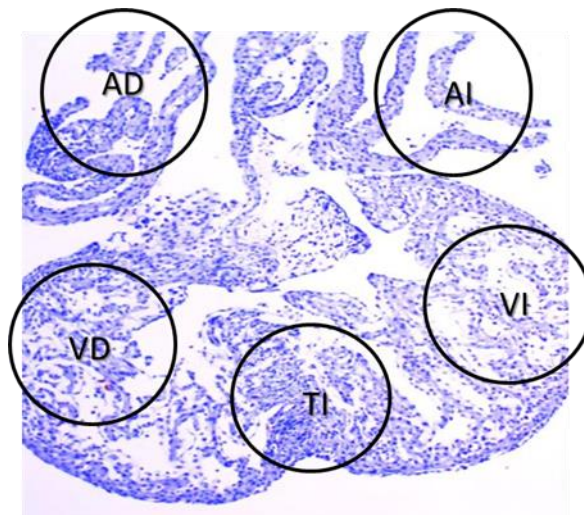


Figura 1: Regiones a evaluar en el corazón fetal estadio E13.5. AD= atrio derecho. VD=ventrículo derecho. TI=tabique interventricular. VI= ventrículo izquierdo. AI= atrio izquierdo.

Para certificar que siempre es la misma región en la que se realiza la cuantificación de células inmunomarcadas caspasa 3 activada y células TUNEL positivas, se tendrá en cuenta las coordenadas de posición de la placa con la muestra seleccionada y los respectivos valores en milímetros en los correspondientes ejes (Tabla 2 y 3) para las muestras correspondientes a caspasa 3 y (Tabla 4 y 5), para TUNEL.

Las coordenadas de posición de las muestras en el microscopio, se encuentra referenciadas en las respectivas tablas, según la prueba de caspasa 3 a evaluar y TUNEL.

Tabla 2. Coordenadas para la ubicación de muestras caspasa 3 día 13.5

Biomodelo	Código corazón	Ventrículo derecho		Tabique Interventricular		Ventrículo izquierdo		Atrio derecho		Atrio izquierdo	
		Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)
1	RWO-FIII-1-H13.5-08	10	140	10	142	10	142	10	141	10	139,5
2	RWOFII-16-H13.5-05	7	139	6,5	139	7	139	6,5	138	7	138
3	RWOFII-14-H13.5-06	14,5	136	14	136	13	136,5	10,5	150	13	135,5
4	RWCFII-9-H13.5-01	20	137	20	136	21	132	19,8	136	21	136
5	RWCFII-18-H13.5-05	9	137	9	137	9,5	137	9	136	9	138
6	RWCFII-23-H13.5-01	14,5	126	14	126,5	14	127	14	126	13,5	126

Tabla 3. Coordenadas para la ubicación de muestras caspasa 3 día 16.5

		Ventrículo derecho		Tabique Interventricular		Ventrículo izquierdo		Atrio derecho		Atrio izquierdo	
Biomodelo	Código corazón	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)
1	RWOFII-19-H16.5-04	12	149,5	12	149,5	15	149	13	150	11	150
2	RWOFII-03-H16.5-05	5,2	134,5	6	137,7	6	135	4,5	135	6	135,5
3	RWOFII-13-H16.5-05	11	159	12	159	12,5	159	12,5	159,5	10	159,9
4	RWCFII-5-H16.5-10	14,5	15	15	139,5	15,9	140	13,5	140,5	15,5	145,5
5	RWCFI-11-H16.5-11	12	135	12,5	155	12	135	11	136	13,5	135,5
6	RWCFI-14-H16.5-09	10,5	146	10	136	14	146,5	13	146,5	14	149

Abreviaturas

CT_AD	Número de células totales en el campo de visión del atrio derecho
CT_VD	Número de células totales en el campo de visión del ventrículo derecho
CT_TI	Número de células totales en el campo de visión del tabique interventricular
CT-VI	Número de células totales en el campo de visión del ventrículo izquierdo
CT_AI	Número de células totales en el campo de visión del atrio izquierdo
CTT(+)	Número de células caspasa 3(+) en el campo de visión del atrio derecho
CTT(+)	Número de células caspasa 3 (+) en el campo de visión del ventrículo derecho
CTT(+)	Número de células caspasa 3(+) en el campo de visión del tabique interventricular
CTT (+)	Número de células caspasa 3(+) en el campo de visión del ventrículo izquierdo
CTT(+)	Número de células caspasa 3 (+) en el campo de visión del atrio izquierdo

Tabla 4. Coordenadas para la ubicación de muestras TUNEL día 13.5

		Ventrículo derecho		Tabique Interventricular		Ventrículo izquierdo		Atrio derecho		Atrio izquierdo	
Biomodelo	Código corazón	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)
1	RWO-FIII-1-H13.5-08	10	140	10	142	10	142	10	141	10	139,5
2	RWOFII-16-H13.5-05	7	139	6	139	7	139	6	138	7	138
3	RWOFII-14-H13.5-06	14	136	14	136	13	136	10	150	13	135
4	RWCFII-9-H13.5-01	20	137	20	136	21	132	19	136	21	136
5	RWCFII-18-H13.5-05	9	137	9	137	9	137	9	136	9	138
6	RWCFII-23-13.5-01	14	126	14	126	14	127	14	126	13	126

Tabla 5. Coordenadas para la ubicación de las muestras TUNEL día 16.5

		Ventrículo derecho		Tabique Interventricular		Ventrículo izquierdo		Atrio derecho		Atrio izquierdo	
Biomodelo	Código corazón	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)	Eje Y (mm)	Eje X (mm)
1	RWOFII-19-H16.5-04	12	149	12	149,5	15	149	13	150	11	150
2	RWOFII-03-H16.5-05	5	134	6	137	6	135	4	135	6	135
3	RWOFII-13-H16.5-05	11	159	12	159	12	159	12	159	10	159
4	RWCFII-5-H16.5-10	14	15	15	139	15	140	13	140	15	145
5	RWCFI-11-H16.5-11	12	135	12	155	12	135	11	136	13	135
6	RWCFI-14-H16.5-09	10	146	10	136	14	146	13	146	14	149

Abreviaturas

CT_AD	Número de células totales en el campo de visión del atrio derecho
CT_VD	Número de células totales en el campo visión del ventrículo derecho
CT_TI	Número de células totales en el campo de visión del tabique interventricular
CT-VI	Número de células totales en el campo de visión del ventrículo izquierdo
CT_AI	Número de células totales en el campo de visión del atrio izquierdo
CTT(+AD)	Número de células TUNEL (+) en el campo de visión del atrio derecho
CTT(+VD)	Número de células TUNEL (+) en el campo de visión del ventrículo derecho
CTT(+ TI)	Número de células TUNEL (+) en el campo de visión del tabique interventricular
CTT(+VI)	Número de células TUNEL (+) en el campo de visión del ventrículo izquierdo
CTT(+AI)	Número de células TUNEL (+) en el campo de visión del atrio izquierdo

Procedimientos

Cuantificación de células inmunomarcadas Caspasa 3 activada (+) y TUNEL

Se tendrá en cuenta las siguientes pautas:

1. Seleccionar el corte completo del corazón fetal estadio específico 13.5 o 16.5 (teniendo en cuenta la técnica)
2. Ubicar la placa con el corte en el microscopio, visualizar en aumento de 10X. Identificar en el campo el área a evaluar (atrio derecho, ventrículo derecho, tabique interventricular, ventrículo izquierdo, y atrio, izquierdo).

3. Colocar aceite de inmersión y visualizar con aumento de 100X la región de interés.
4. Posicionar la placa utilizando la reglilla ubicada en la platina del microscopio, según coordenadas dadas para cada región teniendo en cuenta (Tabla 2 y 3) para muestras de caspasa 3 activada y (Tabla 4 y 5) técnica de TUNEL.

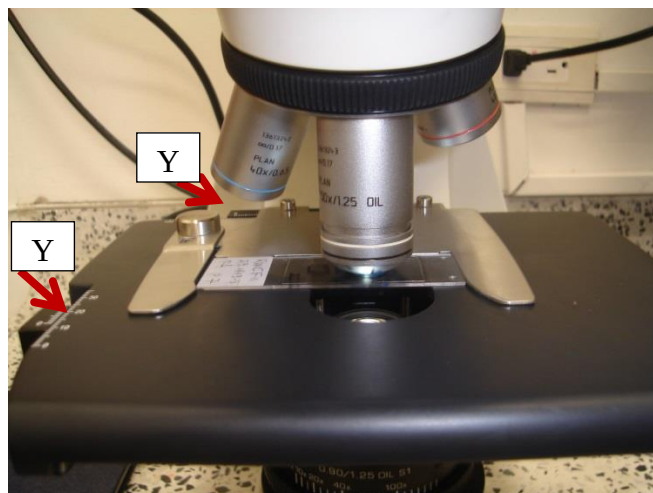


Figura 2. Ubicación muestra aumento 100X, teniendo en cuenta las respectivas coordenadas.

5. Enfocar y realizar el conteo del total de células en el campo de visión utilizando el contador manual de células de una tecla Marca Tokio (Figura 3). Registrar la cantidad de células totales en la respectiva matriz de recolección de datos. (Tablas 6 y 7).

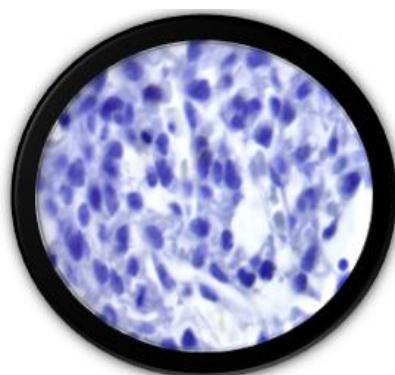


Figura 3. Vista microscópica en la región del tabique interventricular de corazón fetal día 16.5 a aumento de 100X.

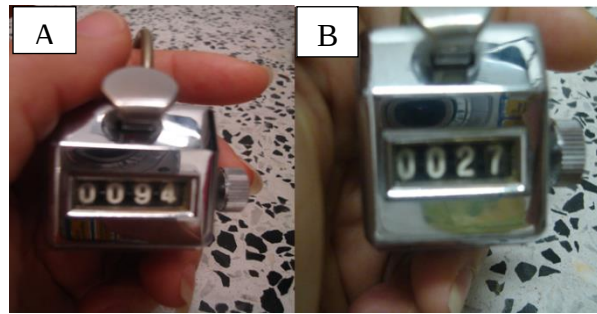


Figura 4. En (A), se indica el número total de células cuantificadas en el campo de visión. El panel (B) indica el número de células TUNEL positivas cuantificadas en el mismo campo de visión.

6. En el mismo campo de visión realizar la identificación y respectiva cuantificación de células caspasa 3 activada positivas o TUNEL positivas según sea el caso. Se tienen en cuenta, las células marcadas caspasa 3 y con núcleos fragmentados como células TUNEL positivas (Figura 5). Registrar los datos obtenidos en la matriz de recolección de datos respectiva (Tabla 6 y 7).
7. Con base en las cuantificaciones realizadas para cada técnica se procede a procesar los datos y realizar el análisis estadístico.

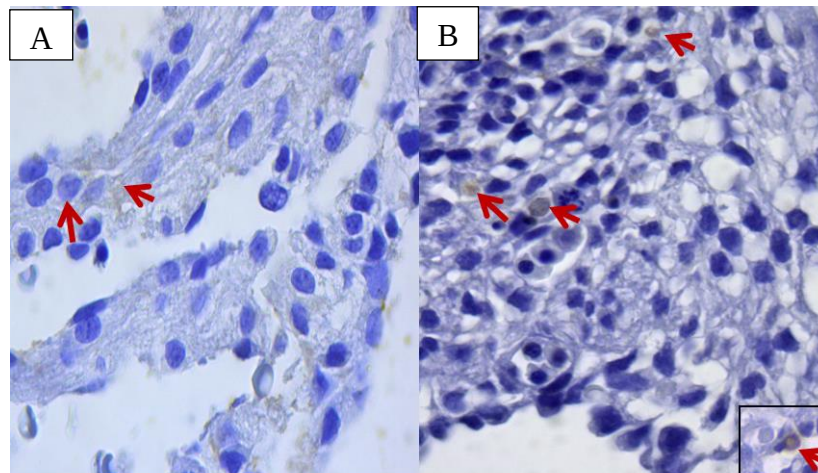


Figura 5. En el panel (A), se observan células inmunomarcadas caspasa 3 en la región del atrio derecho de corazón fetal día 16,5 (Flechas rojas). En el (B) se observan célula TUNEL positivas (flechas rojas). Aumento 100X.

8. Realizar la cuantificación por triplicado en cada región bajo las mismas condiciones y criterios establecidos en tres (3) momentos diferentes.

Tabla 6: Matriz de recolección de datos prueba caspasa 3 día 13.5 y TUNEL

Biomodelo	Código Corazón	CT-AD/ CTC (+JAD)	CT-AD/ CTC(+JAD)	CT-AD/ CTC(+JAD)	CT-VD/ CTC(+JVD)	CT-VD/ CTC(+JVD)	CT-VD/ CTC(+JVD)	CT-TI/CTC(+TI)	CT-TI/CTC(+TI)	CT-TI/CTC(+TI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-AI/ CTC(+AI)	CT-AI/ CTC(+AI)	CT-AI/ CTC(+AI)
1	RWO-FIII-1-H13.5-08															
2	RWOFII-16-H13.5-05															
3	RWOFII-14-H13.5-06															
4	RWCFFI-9-H13.5-01															
5	RWCFFI-18-H13.5-05															
6	RWCFFI-23-13.5-01															

Tabla 7: Matriz de recolección de datos caspasa 3 TUNEL día 16.5

Biomodelo	Código Corazón	CT-AD/ CTC(+JAD)	CT-AD/ CTC(+JAD)	CT-AD/ CTC(+JAD)	CT-VD/ CTC(+JVD)	CT-VD/ CTC(+JVD)	CT-VD/ CTC(+JVD)	CT-TI/CTC(+TI)	CT-TI/CTC(+TI)	CT-TI/CTC(+TI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-VI/ CTC(+VI)	CT-AI/ CTC(+AI)	CT-AI/ CTC(+AI)	CT-AI/ CTC(+AI)
1	RWOFII-19-H16.5-04															
2	RWOFI-3-H16.5-02															
3	RWOFII-13-H16.5-05															
4	RWCFFI-5-H16.5-10															
5	RWCFFI-11-H16.5-11															
6	RWCFFI-14-H16.5-09															

ANEXO 7. POE PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL GROSOR DE LA PARED VENTRICULAR CORTES DE CORAZONES FETALES ESTADIO E16.5

	PROCEDIMIENTOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DELGROSOR DE LA PARED VENTRICULAR EN CORAZONES FETALES ESTADIO E16.5	CÓDIGO:
		VERSIÓN: 01
		FECHA DE VIGENCIA
Laboratorio de Histología		PÁGINAS: 1 DE 6
Realizado por: María Eleonora Tejada	Revisó Carolina Pustovrh	Aprobó
Fecha	Fecha	Fecha

Introducción

ImageJ es un programa informático para el procesamiento digital, que se constituye en una herramienta muy interesante para el tratamiento de imágenes, orientado principalmente hacia el ámbito de las ciencias de la salud. Este software es de dominio público y de código abierto desarrollado en lenguaje Java en las instituciones del National Institutes of Health de Estados Unidos. Incluye por defecto potentes herramientas para editar, procesar y analizar imágenes de casi cualquier tipo y formato. Su mayor virtud reside en su extensibilidad, su funcionalidad pueden ampliarse hasta resolver casi cualquier problema de tratamiento digital de imagen mediante macros, scripts y, especialmente, plugins programables en lenguaje Java; permite hacer diferentes operaciones sobre determinada imagen, ajustar el contraste, transformar el color en una imagen, transformar en una imagen blanco y negro. Puede ser utilizado para la realización de cuantificaciones de áreas o regiones en una determinada imagen a evaluar (92)(93).

Objetivo

Establecer el protocolo de medición para estimar el grosor de la pared ventricular en cortes de corazones fetales en estadio E16.5.

Materiales

- Cámara Leica DFC 295
- Programa LAS V3
- Computador de escritorio Dell
- Software Image J
- Imágenes de corazones fetales en aumento 10X y 40X

Muestra

De los cortes de corazones fetales en estadio E16.5, de grosor 4µm y debidamente procesados para histoquímica, se obtuvieron las respectivas imágenes en aumento de 10X y 40X, utilizando un microscopio óptico Leica adaptado a cámara y software LASV3.5. Del total de imágenes se seleccionaron 5 imágenes de los corazones fetales control y 5 imágenes de corazones fetales del grupo obeso.

Parámetros de medición

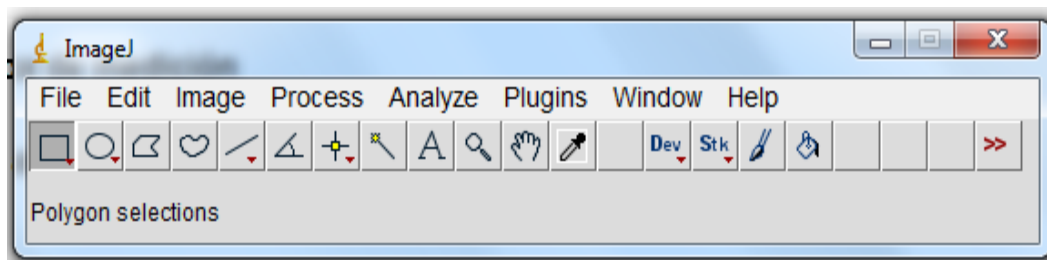
Estimar el grosor de la pared ventricular (derecha e izquierda) en cortes de corazones fetales en estadio E16.5. Para lo cual se realizaron 6 (seis) mediciones independientes en cada ventrículo a evaluar, seleccionando el respectivo aumento (10X o 40X) que permitiera visualizar el campo microscópico completo.

Parámetros estadísticos

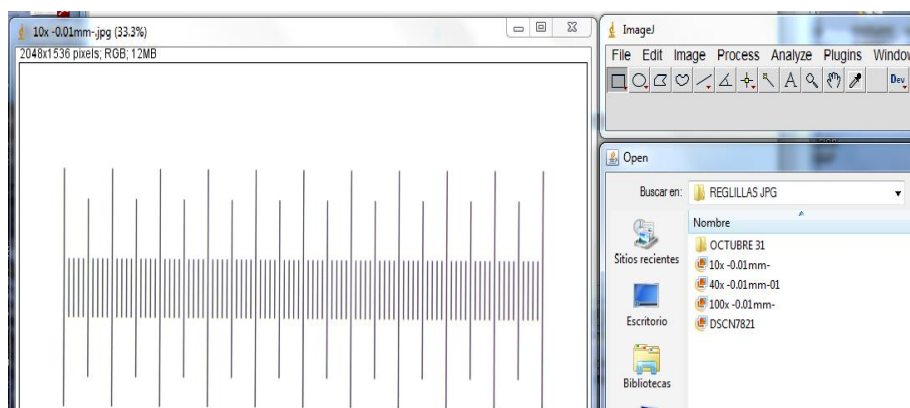
Con base en las mediciones del total de imágenes seleccionadas, se analizaron los datos aplicando la prueba U de Mann Withney a un nivel de significancia: 5%, esta prueba se basó en la comparación de las medianas por pares de muestras (independientes).

Técnica de medición

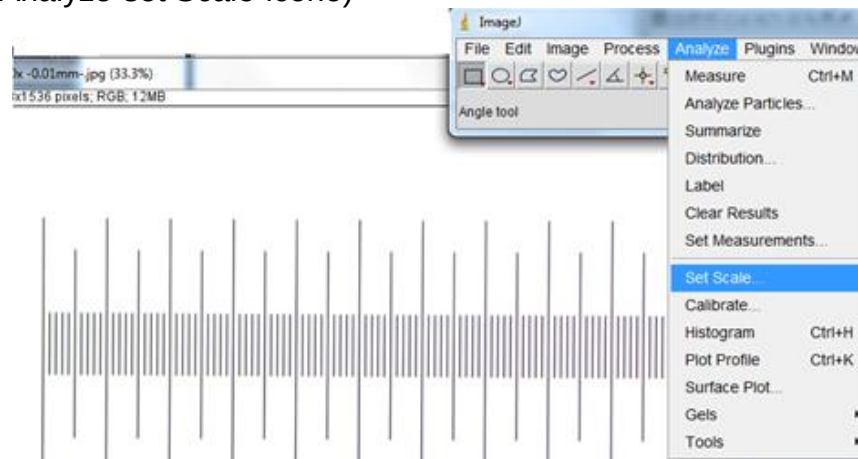
1. Iniciar el programa

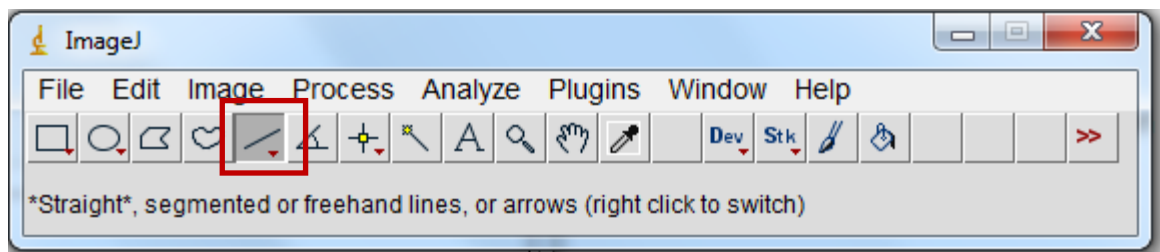


2. Calibrar correctamente el programa, teniendo en cuenta el aumento de la imagen.
3. Ubicar la respectiva reglilla, la cual debe corresponder al mismo aumento de la imagen a evaluar 10x o 40X , proceder así: (File –open-ubicar reglilla)

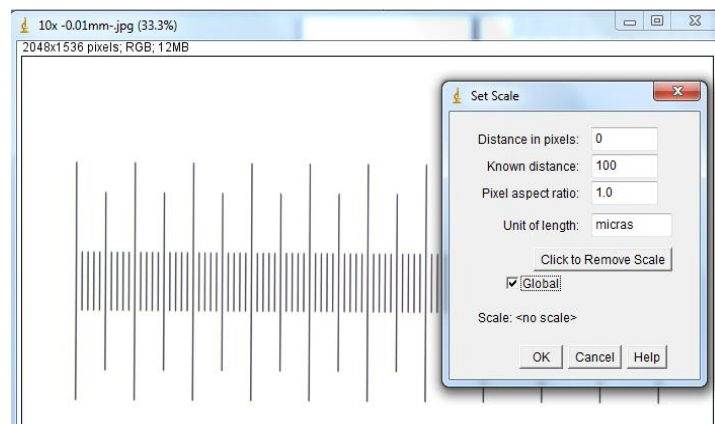


4. Calibración del programa: para lo cual se procede a seleccionar en la barra del menú (Analyze-set Scale-icono)

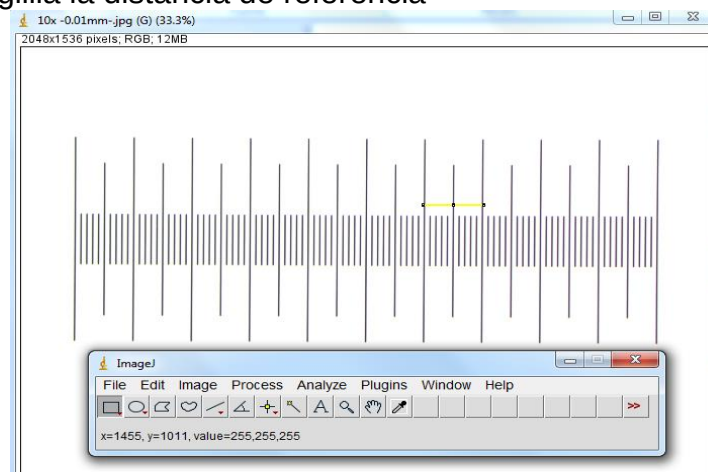




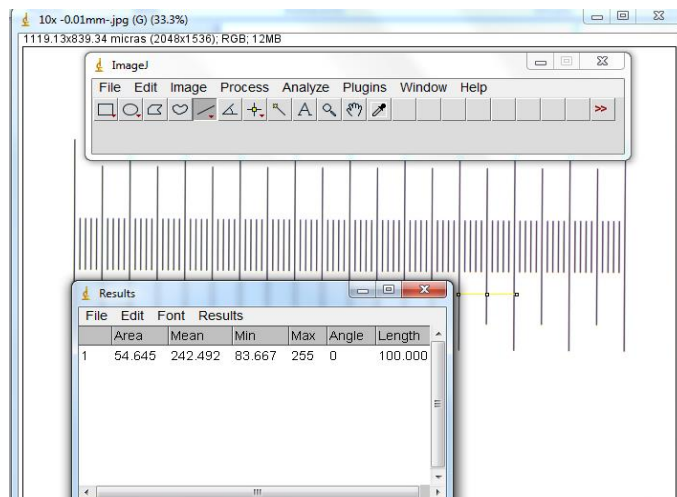
5. Selecciono Analyze Set Scale-Distancia en pixeles (distancia conocida 100 μ m), seleccionar global-ok.



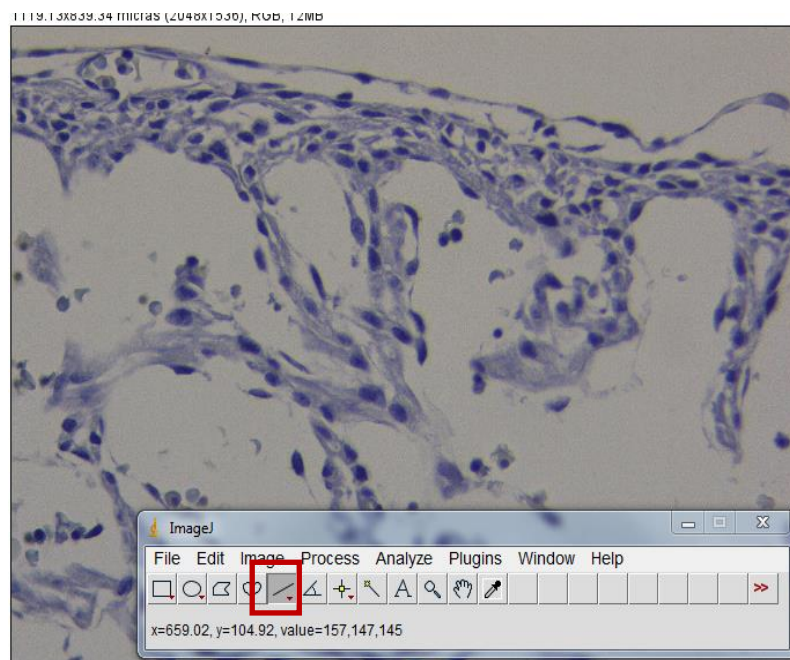
6. Medir en la reglilla la distancia de referencia



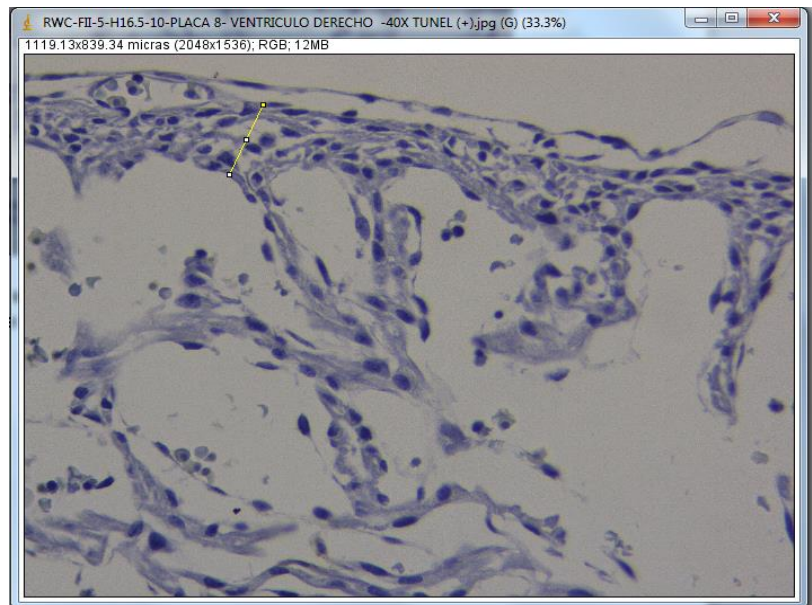
7. Se procede a seleccionar (Set scale-Distancia en pixeles e indicar distancia conocida 100 μ m –global-ok), luego seleccionar Analyze-Mesure, con lo cual se despliega la tabla con el valor correspondiente que indica el valor de la distancia



7. Finalmente se busca la imagen en la que se realizara la medida seleccionando en el menú: File-Open



7. Para medir en la imagen dar click y seleccionar icono (barra), medir el área a evaluar e indicar: Analyze- Measure-Editar –Draw-Analyze-Mesure.



8. Realizar seis (6) mediciones en la región del ventrículo a evaluar
9. Finalmente, visualizar la tabla de datos, seleccionar los datos a procesar para el respectivo análisis estadístico

A screenshot of a 'Results' window showing a table of data. The table has columns for 'Area', 'Mean', 'Min', 'Max', 'Angle', and 'L'. There are two rows of data.

	Area	Mean	Min	Max	Angle	L
1	54.645	242.492	83.667	255	0	1
2	65.096	122.634	62.570	156.401	-114.444	1

11. Establecer base de datos y registrar en matriz de recolección.

Tabla 1: Matriz de recolección de datos

MATRIZ RECOLECCION DE DATOS GROSOR PARED VENTRICULAR CORAZONES ESTADIO E16.5											
GRUPO CONTROL						GRUPO OBESO					
RWCFII-5- H16.5-10	RWCFII-5- H16.5-10	RWCFI-11- H16.5-11	RWCFI-11- H16.5-11	RWCFI-14- H16.5-09	RWCFI-14- H16.5-09	RWOFI-3- H16.5-0.2	RWOFI-3- H16.5-0.2	RWOFI-13- H16.5-05	RWOFI-13- H16.5-05	RWOFI-19- H16.5-04	RWOFI-19- H16.5-04
VD-10x	VI-10x	VD-10X	VI-40x	VD-10X	VI-10X	VD-10X	VI-10X	VD-10X	VI-10X	VD-10X	VI-10X
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ANEXO 8. AVAL COMITE DE ETICA

Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales en Experimentación



Facultad de Salud

ACTA DE AVAL A PRACTICA DEL AREA BIOMEDICA N° 03-013

Proyecto: EPIGENÉTICA NUTRICIONAL Y DAÑO CARDIACO FETAL. EFECTO DE LA OBESIDAD MATERNA SOBRE EL PATRÓN DE APOPTOSIS EN LA CARDIOGÉNESIS DE LA RATA
Línea biomédica:
Sometido por: MARÍA ELEONORA TEJADA LÓPEZ, CAROLINA PUSTOVRH, LILIANA SALAZAR, MARIO ALEJANDRO ORTIZ Y EL ASESOR: VETERINARIO MAURICIO VILLALOBOS

Código Interno: **011-013** Fecha en que fue sometido: **24** **06** **2013**

Fecha Certificación CEAS: **20** **08** **2013**

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha delegado en el Comité Institucional de Revisión de Ética con animales de experimentación biomédica (CEAS) mediante Resolución No. 27-A de Marzo 10 de 1997, el cual está regido por la Ley 84, de 1989 y la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, sobre protección de Animales en experimentación y con esa garantía de cumplimiento, se da el AVAL en los aspectos Éticos para la experimentación, establece las recomendaciones y exigencias que aparecen consignadas adelante.

Este Comité **certifica que:**

- Sus miembros revisaron los siguientes **documentos** del presente proyecto:

☒	Protocolo de Practicas	Resultado de aval otros comités (si aplica)
☒	Formato de evaluación CEAS 02	Cartas de las instituciones participantes
	Consentimiento Experto Veterinario	Otro:

- El presente proyecto fue evaluado y certificado por el Comité:
Según las categorías de riesgo establecidas en el manual de experimentación con animales de la Facultad de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo: C**

A	Procedimientos que no ocasionan malestar al animal o que lo minimizan.	B	Procedimientos que pueden causar molestias momentáneas y que se pueden obviar con la utilización de analgésicos o anestesia	C	Animales que serán sometidos a una manipulación significativa como cirugía, perfusión de órganos y que serán sacrificados al terminar el procedimiento o durante la ejecución del mismo.
D	Animales que serán sacrificados sin ningún tratamiento o manipulación de ensayo. (por ejemplo: para la obtención de tejidos, células, etc.	E	Otro no contemplado antes:		

ANEXO 9. Valores p obtenidos en la prueba para caspasa 3 activada

CASPASA 3								
Regiones	Estadio 13.5				Estadio 16.5			
	Mediana del grupo		Estadístico de prueba		Mediana del grupo		Estadístico de prueba	
	Control	Obeso	U calc.	Valor p	Control	Obeso	U calc.	Valor p
Atrio derecho	15,3	19,3	21	0,094*	16,0	14,1	26	0,222
Ventrículo derecho	25,3	17,6	0	0,000**	22,5	15,5	22	0,113
Tabique interventricular	11,0	12,9	40	0,990	20,5	15,5	20	0,077*
Ventrículo izquierdo	18,8	12,9	17	0,040**	18,2	14,3	23	0,136
Atrio izquierdo	23,8	15,7	17	0,040**	25,4	16,3	25	0,190

ANEXO 10. Valores p obtenidos en ensayos de TUNEL

TUNEL								
Regiones	Estadio 13.5				Estadio 16.5			
	Mediana del grupo		Estadístico de prueba		Mediana del grupo		Estadístico de prueba	
	Control	Obeso	U calc.	Valor p	Control	Obeso	U calc.	Valor p
Atrio derecho	33,6	45,1	8	0,003***	10,2	19,5	6	0,001***
Ventrículo derecho	35,9	34,8	38	0,863	28,6	15,6	28	0,297
Tabique interventricular	38,8	45,1	23	0,136	24,4	9,7	0	0,000***
Ventrículo izquierdo	31,7	33,6	34	0,605	30,0	15,9	23	0,136
Atrio izquierdo	36,5	35,6	38	0,863	25,8	21,4	39	0,931

***0.01 ** 0.05 *0.10

ANEXO 11

DIVULGACION

Obesidad materna inducida por dieta en un modelo murino y su impacto en el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía de la rata.

Presentación Oral. XXIV Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigación en Reproducción Humana (ALIRH).

Lima 2015

Obesidad Materna inducida por dieta y su impacto en el desarrollo embrionario

murino. Presentación modalidad POSTER. XI Congreso Colombiano de

Morfología ASCOM. Medellín Julio 2015

Perfil reproductivo de un biomodelo materno de obesidad adquirida por dieta.

Presentación Oral. X Congreso Colombiano de Morfología. ASCOM

Octubre 2015

Reproductive profile of a murine model of diet-induced obesity.

Ponente Modalidad POSTER. Simposio en Salud Universidad del Valle.

2015

Reproductive profile of a murine model of diet-induced obesity.

SLIM –LASRI 2015 Ponente Modalidad POSTER Mar del Plata (Argentina)

Abril 2015

Modelo Murino de Obesidad Materna Adquirida por Dieta de Cafetería para

Estudios de Alteraciones en el Desarrollo Embrio-fetal. (Autora POSTER)

XXIX Congreso Científico Internacional. Córdoba Argentina.

Septiembre 2014

Establecimiento de un modelo experimental de obesidad adquirida por dieta de

Cafetería en rata *Wistar*. Ponente Oral IX Congreso Colombiano de Morfología

ASCOM. Pereira. Octubre 2013.

Efecto de la obesidad materna sobre el patrón de apoptosis en la cardiogénesis de

la rata. VIII Congreso Colombiano de Morfología. ASCOM. TUNJA. Ponente

Modalidad Poster. Octubre 2012

12. REFERENCIAS

1. Chan RSM, Woo J. Prevention of Overweight and Obesity: How Effective is the Current Public Health Approach. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2010;7:765–83. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov
2. Gutiérrez, Juan David, Fortich R. Los Determinantes de la Obesidad en Colombia. 2011;155–82. Available from: <https://db.tt/RKKgx3pl>
3. Obesity : identification , assessment and management. 2014;(November):63. Available from: nice.org.uk/guidance/cg189
4. Plan Nacional de Desarrollo 2010-2014. 2014;1–51. Available from: <https://www.dnp.gov.co>
5. Tamara R. EFECTOS A CORTO Y LARGO PLAZO DE LA OBESIDAD DURANTE EL EMBARAZO [Internet]. UMAE HGO. 2007. Available from: docplayer.es/15625672
6. Committe. R of a WE. Physical estatus:the use and interpretation of antropometry. *World Health Organ*. 1995;854:p.1–452.
7. Reynolds RM, Allan KM, Edwin A. Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring : follow-up of 1 323 275 person years. 2013;347:f4539:1–10. Available from: www.bmj.com/content/347/bmj.f4539
8. Tenenbaum-Gavish K, Hod M. Impact of maternal obesity on fetal health. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2013;34(1):1–7. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774085
9. Cedergren MI, Källén B a J. Maternal obesity and infant heart defects. *Obes Res* [Internet]. 2003;11(9):1065–71. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972676
10. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* [Internet]. 2005;115(3):e290–6. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741354
11. Musa MG, Torrens C, Clough GF. The microvasculature: A target for nutritional programming and later risk of cardio-metabolic disease. *Acta*

Physiol [Internet]. 2014;210(1):31–45. Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23758932

12. Haghiac M, Vora NL, Basu S, Johnson KL, Presley L, Bianchi DW, et al. Increased Death of Adipose Cells, a Path to Release Cell-Free DNA Into Systemic Circulation of Obese Women. *Obesity* [Internet]. 2012;20(11):2213–9. Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22836687
13. Lu M-C, Tzang B-S, Kuo W-W, Wu F-L, Chen Y-S, Tsai C-H, et al. More activated cardiac mitochondrial-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)* [Internet]. 2007;15(11):2634–42. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070754
14. Cheng G, Wessels A, Gourdie RG, Thompson RP. Spatiotemporal and tissue specific distribution of apoptosis in the developing chick heart. *Dev Dyn* [Internet]. 2002;223(1):119–33. Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803575
15. Barbosky L, Lawrence DK, Karunamuni G, Wikenheiser JC, Doughman YQ, Visconti RP, et al. Apoptosis in the developing mouse heart. *Dev Dyn* [Internet]. 2006;235(9):2592–602. Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16881058
16. Fisher S a, Langille BL, Srivastava D. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res* [Internet]. 2000;87(10):856–64. Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11073880
17. Niculescu MD. Nutritional Epigenetics. *ILAR J* [Internet]. 2012;53 (3/4):270–8. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744966
18. Custodio J, Elizathe L, Murawski B, Rutsztein G. Obesity in Argentina : a remaining challenge . *Public. Rev Mex Trastor Aliment* [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.; 2015;6:137–42. Available from:
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2007152315000208
19. ENCUESTA NACIONAL DE LA SITUACIÓN NUTRICIONAL EN COLOMBIA 2010 [Internet]. 2010. Available from: <https://www.minsalud.gov.co>
20. Cai G-J, Sun X-X, Zhang L, Hong Q. Association between Maternal Body Mass Index and Congenital Heart Defects in Offspring: A Systematic Review. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. Elsevier Inc; 2014;211(April):91–117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631708>

21. RACUSIN, D., STEVENS, B., CAMPBELL, G., and AAGAARD-TILLERY K. OBESITY AND THE RISK AND DETECTION OF FETAL MALFORMATION. *Semin Perinatol* [Internet]. 2012;36(3):213–21. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22713503
22. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *BIOMEDICINA* [Internet]. 2006;2(3):252–6. Available from: www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3
23. Speakman J, Hambly C, Mitchell S. The contribution of animal models to the study of obesity. *SAGE Journals -Laboratory Animals* [Internet]. 2008;413–32. Available from: lan.sagepub.com/content/42/4/413
24. Papadimitriou D, Xanthos T, Dontas I, Lelovas P, Perrea D. The use of mice and rats as animal models for cardiopulmonary resuscitation research. *Rev Artic* [Internet]. 2008;42:265–76. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625581
25. Hernandorena, B. Hugues, C. J, Rodríguez. Temas de revisión ANIMALES DE LABORATORIO EN LA ENDOCRINOLOGÍA : BIOMODELOS DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1. *Revista Cubana de Endocrinología* [Internet]. 2001;168–77. Available from: scielo.sld.cu/scielo
26. Fernández M. Utilización de Modelos animales en investigación del Cáncer. *Salud Mil* [Internet]. 2012;31:55–8. Available from: www.revistasaludmilitar.com.uy
27. Briggs LE, Kakarla J, Wessels A. The pathogenesis of atrial and atrioventricular septal defects with special emphasis on the role of the dorsal mesenchymal protrusion. *Differentiation* [Internet]. 2012;84(1):117–30. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22709652
28. Kolditz Denise Pamela. Cardiac Development in Relation to Clinical Supraventricular Arrhythmias: Focus on Structure-Function Relations [Internet]. Leiden University Medical Center (LUMC); Available from: <https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/13721>
29. Veglia Trindade, MH. Civetta, JD. D. Re fojos, M. Morley G. Embriología Comparada del Sistema de Conducción Atrioventricular en embriones de rata albina y su correlación con el corazón humano en desarrollo [Internet]. Corrientes Argentina; 2001. Available from: www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/3-Medicina/M-015

30. Harris IS, Black BL. Development of the endocardium. *Pediatr Cardiol* [Internet]. 2010;31(3):391–9. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov
31. Bondue A, Tännler S, Chiapparo G, Chabab S, Ramialison M, Paulissen C, et al. Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol* [Internet]. 2011;192(5):751–65. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383076
32. Salazar GM. DESARROLLO NORMAL DEL CORAZÓN TETRACAMERAL EN RATA . [Internet]. 2005. Available from: <http://hdl.handle.net/123456789/3405>
33. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* [Internet]. 2008;451(7181):943–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06801>
34. Watanabe M, Choudhry a, Berlan M, Singal a, Siwik E, Mohr S, et al. Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. *Development* [Internet]. 1998 Oct;125(19):3809–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729489>
35. Franco D, Domínguez J, Castro P De, Aránega A. Regulation of myocardial gene expression during heart development. *Development* [Internet]. 2002;55(2)(X):167–84. Available from: www.revespcardiol.org
36. Christoffels VM, Moorman AFM. Basic Science for the Clinical Electrophysiologist Development of the Cardiac Conduction System Why Are Some Regions of the Heart More Arrhythmogenic Than Others ? *Circ Arrhythmia Electrophysiol* [Internet]. 2009;2:195–207. Available from: circep.ahajournals.org/content/2/2/195
37. Bialostozky D, Rodríguez-diez G, Zazueta C. Detección de apoptosis en enfermedades cardiovasculares mediante las imágenes SPECT de cardiología nuclear [Internet]. 2008. Available from: www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405
38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [Internet]. *Changes*. 2007. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483
39. Wongtrakool., C. Roman J. Apoptosis of mesenchymal cells during the pseudoglandular stage of lung development affects branching

morphogenesis. Changes [Internet]. 2012;29(6):997–1003. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

40. Hoff MJB Van Den, Eijnde SM Van Den, Viragh S, Moorman AFM. Programmed cell death in the developing heart. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2000;45:603–20. Available from: cardiovascres.oxfordjournals.org/content/45/3/603
41. Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas GH, Androutsos G. A brief history of apoptosis: From ancient to modern times. *Onkologie*. 2008;31(12):702–6.
42. Johnson BAA. Alberts B J., Lewis J, et al., *The Cell. - Molecular Biology of the Cell*.pdf.crdownload. 4 th ed, e. 2002.
43. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008;9(3):231–41. Available from: www.ppgorgsistem.ics.ufba.br
44. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* [Internet]. 1997;326 (Pt 1):1–16. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9337844
45. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2013;5(6). Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732469
46. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* [Internet]. 2005;115(1):1–20. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15819693
47. Rojas M, Salmen S, Berrueta L. Muerte celular programada : Activación y mecanismos de regulación. *Rev Médica la Extensión Port* [Internet]. 2009;4(3):92–106. Available from: www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/31375/1/articulo2.
48. Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2004;5(9):686–700. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322527
49. Poelmann RE, Molin D, Wisse LJ, Gittenberger-de Groot a C. Apoptosis in cardiac development. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2000 Jul;301(1):43–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928280>

50. Keyes WM, Sanders EJ. Regulation of apoptosis in the endocardial cushions of the developing chick heart. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2002;282(6):C1348–60. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997250
51. Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. Cardiac development. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2008 Jan [cited 2012 Nov 21];8:855–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758664>
52. Gittenberger-de Groot AC, Bartelings MM, Deruiter MC, Poelmann RE. Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart malformations. *Pediatr Res* [Internet]. 2005 Feb [cited 2012 Nov 19];57(2):169–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611355>
53. Savolainen., Saija M., Foley Julie F. ES. Histology Atlas of the Developing Mouse Heart with Emphasis on E11.5 to E18.5. NIEHS, Cell Mol Pathol Branch, Res [Internet]. 2009;37 (4):395–414. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19359541
54. Gutierrez Toro J, Holladay SD, Prater MR, Freeman LE, Smith BJ, Claudio J, et al. Improved Late-gestation Cardiac Morphology in Fetuses of Diabetic Mothers After Maternal Immune Stimulation: Potential Role of Dysregulated Apoptosis [Internet]. 2009. Available from: <https://theses.lib.vt.edu/>
55. Barouch L a., Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, et al. Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ Res* [Internet]. 2006;98(1):119–24. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339484
56. Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac Remodeling in Obesity [Internet]. 2008. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391168
57. Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME, Taegtmeyer H. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem J* [Internet]. 2007;406(3):457–67. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550347
58. Tejada, M.E; Pustovrh MCS. L. REPRODUCTIVE PROFILE OF A MURINE MODEL OF DIET-INDUCED OBESITY. *Placenta* 36 469-521 [Internet]. 2015;36:503. Available from: journal homepage: www.elsevier.com/locate/placenta

59. Pérez. IC. Apoptosis : una muerte silenciosa. Rev CENIC Ciencias Biológicas [Internet]. 2006;37(1):13–7. Available from: www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220542003
60. Gown AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. J Histochem Cytochem [Internet]. 2002;50(4):449–54. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897797
61. Moreno EA, Cuéllar CG, González AD. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Rev Inst Nal Cancerol [Internet]. 2000;46(4):275–80. Available from: www.medigraphic.com/pdfs/cancer/ca
62. Knaapen MW, Davies MJ, De Bie M, Haven a J, Martinet W, Kockx MM. Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. Cardiovasc Res [Internet]. 2001;51(2):304–12. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470470
63. NEGOESCU et al. TUNEL : Improvement and Evaluation of the Method for In Situ Apoptotic Cell Identification. J Histochem Cytochem [Internet]. 1997;44(9):959–68. Available from: https://lifescience.roche.com/.../BIOCHEMICA_97_
64. Lin, Hedayat S, Yang,(2002), and Lin, Hedayat and W (2012). Lin ' s Concordance Correlation Coefficient. Biometrics [Internet]. 2002;45:255–68. Available from: www.jstor.org/stable/2532051
65. Camacho J. Coeficiente de concordancia para variables continuas. Acta méd costarric [Internet]. 2008;50(4):211–2. Available from: www.scielo.sa.cr/scielo.php
66. Nickerson C a. E. A Note On “A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility.” Biometrics [Internet]. 1997;53(4):1503–7. Available from: <http://www.jstor.org/stable/2533516>
67. Romero Saldaña M. Contraste de Hipótesis Comparación de dos medias independientes mediante pruebas no paramétricas : Prueba U de Mann-Whitney. 2013;III:77–84. Available from: www.ub.edu/aplica_infor/spss/cap6-2
68. Wessels A, Sedmera D. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. Physiol Genomics [Internet]. 2003 Nov 11 [cited 2015 Dec 10];15(3):165–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14612588>

69. Mills JL, Troendle J, Conley MR, Carter T, Druschel CM. Maternal obesity and congenital heart defects : a population-based study. *Am J Clinincal Nutr* [Internet]. 2010;91(6):1543–9. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375192
70. Klenov VE, Jungheim ES. Obesity and reproductive function: a review of the evidence. *Curr Opin Obstet Gynecol* [Internet]. 2014;1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25254319>
71. Afman L, Müller M. Nutrigenomics: From Molecular Nutrition to Prevention of Disease. *J Am Diet Assoc* [Internet]. 2006;106(4):569–76. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002822306000022>
72. Arias-Díaz J, Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp* [Internet]. 2007;22:160–8. Available from: scielo.isciii.es/pdf/nh/v22n2/revision3
73. Kanasaki K, Koya D. Biology of Obesity: Lessons from Animal Models of Obesity. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011;2011:1–11. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/197636/>
74. Lutz, Thomas A. WS. Overview of Animal Models of Obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012;1–20.
75. Muñoz Cerón Yhoiss Smiht , Hidalgo Sirsa Aleyda , Moreno David Moreno PM, Carolina Pustovrh SL. Resúmenes xiv simposio de investigaciones de la facultad de salud de la universidad del valle octubre 17-19, 2012. cali, colombia. *Rev Gastrohnutp* [Internet]. 2014;Volumen 16:138–61. Available from: bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893
76. Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz D a., Elia EM. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reprod Biomed Online* [Internet]. Reproductive Healthcare Ltd.; 2015;31(5):655–67. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147264831500382X>
77. Salazar, Marcela SG, Cristina RMM, Angel PGM, Manuel AM, Sofía D-C, et al. Chronological and morphological study of heart development in the rat. *Anat Rec (Hoboken)* [Internet]. 2012;295(8):1267–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22715162>
78. Stothard Katherine J., Tennan Peter W.C., Bell Ruth. R judith. Maternal Overweight and Obesity and the Risk of Congenital Anomalies A systematic

Review and Meta-analysis. 2009;301:633–50. Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211471

79. Wang J, Ma H, Tong C, Zhang H, Lawlis GB, Li Y, et al. Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* [Internet]. 2010;24(6):2066–76. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2874473&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
80. Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine a. B, Nathan DM, Schwartz MW, et al. Obesity and Type 2 Diabetes: What Can Be Unified and What Needs to Be Individualized? *Diabetes Care* [Internet]. 2011;34(6):1424–30. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc11-0447>
81. Corrigan N, Brazil DP, McAuliffe F. Fetal cardiac effects of maternal hyperglycemia during pregnancy. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol* [Internet]. 2009;85(6):523–30. Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19180650
82. Rienks M, Papageorgiou AP, Frangogiannis NG, Heymans S. Myocardial extracellular matrix: An ever-changing and diverse entity. *Circ Res* [Internet]. 2014;114:860–71. Available from: circres.ahajournals.org/content/114/5/872
83. Kalpana Ballal, Christopher R. Wilson, Romain Harmancey and HT, The University of Texas Medical School at Houston, Department of Internal Medicine D of, Cardiology, Houston T. Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2010;344 (1-2)(9):221–30. Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676734
84. Biosciences B. Caspase-3 Activation: An Indicator of Apoptosis in Image-Based Assays [Internet]. Note Application. 2012. p. 1–5. Available from: <https://www.bdbiosciences.com/.../Bioimaging>
85. Gown a. M, Willingham MC. Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2002;50(4):449–54. Available from:
<http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/002215540205000401>
86. Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JF, Parnavelas JG. Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*

[Internet]. 1997;17(3):1075–85. Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994062

87. Abdelwahid E, Pelliniemi LJ, Niinikoski H, Simell O, Tuominen J, Rahkonen O, et al. Apoptosis in the pattern formation of the ventricular wall during mouse heart organogenesis. *Anat Rec* [Internet]. 1999;256(2):208–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10486519>
88. Ya J, van den Hoff MJ, de Boer P a, Tesink-Taekema S, Franco D, Moorman a F, et al. Normal development of the outflow tract in the rat. *Circ Res* [Internet]. 1998;82(4):464–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2576453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
89. Goor D a., Dische R, Lillehei CW. The Conotruncus: I. Its Normal Inversion and Conus Absorption. *Circulation* [Internet]. 1972;46(2):375–84. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.46.2.375>
90. Morris EWT. THE INTERVENTRICULAR SEPTUM. *Thorax* [Internet]. 1957;12:304–12. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../thorax00048-0038
91. Panizo Santos A. VVF. ESTUDIOS DE LA APOPTOSIS MEDIANTE LA TECNICA DE TUNEL. 1197. p. 243–5 Vol 30.Nº3.
92. Caraballo RI al programa IJ. Introducción al programa ImageJ [Internet]. Proyecto de voluntariado universitario DQAQF, FCEN-UBA. p. 1–10. Available from: difusion.df.uba.ar/ConectarIgualdad
93. Valenciano DS. Análisis del software ImageJ para el análisis científico de imágenes [Internet]. UNIVERSIDAD POLITECNICA; 2014. Available from: oa.upm.es/33069