

**EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MODULADORAS DE MATRIZ EXTRACELULAR
EN EL DESARROLLO DEL PALADAR EN UN MODELO MURINO DE
OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA**

ESTEFANÍA CUÉLLAR RIVAS

Estudiante Maestría en Ciencias Biomédicas

**Universidad Del Valle
Facultad De Salud
Escuela De Ciencias Básicas
Departamento De Morfología
2016**

**EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MODULADORAS DE MATRIZ EXTRACELULAR
EN EL DESARROLLO DEL PALADAR EN UN MODELO MURINO DE
OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA**

ESTEFANÍA CUÉLLAR RIVAS, OD
Est. Maestría en Ciencias Biomédicas

María Carolina Pustovrh Ramos
Biol, PhD en Ciencias
Tutora

Mario Alejandro Ortiz Salazar
Od, Ortodoncista, MSc.
Tutor

Liliana Salazar
Ft, MSc
Asesor Temático

Victor Cardona
Asesor estadístico

Universidad del valle
Facultad de salud
2016

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado 1

Firma del jurado 2

Firma del jurado 3

Ciudad y Fecha:

Dedicado a

... A la memoria de mi padre Hernán Cuéllar Polania

...a mi madre, a Diego y a todos mis seres queridos que estuvieron apoyándome en este proceso, porque todo lo que nos proponemos es posible.

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a mis profesores, Carolina Pustovrh, Liliana Salazar y Mario Alejandro Ortiz que tuvieron la paciencia y colaboración lograron que este trabajo fuera posible.

A mis profes de la Escuela de Odontología por su apoyo y consejos.

A las profesionales de laboratorio Nhora Holguín y Martha Lucía Ceballos por su ayuda en el manejo de los equipos de laboratorio y el procesamiento de las muestras. Al profesor Oscar Tamayo del departamento de Patología por la estandarización de las pruebas de inmunohistoquímica.

Y a todos mis compañeros del posgrado en Ciencias Biomédicas, que estuvieron siempre apoyándome.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen.....	16
1.1 Abstract.....	18
2. Introducción	20
3. Planteamiento del problema y justificación	22
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL CONOCIMIENTO	28
4.1 Generalidades del desarrollo craneofacial humano	28
4.1.1 Tercera semana de desarrollo	28
4.1.2 Cuarta semana de desarrollo	30
4.1.3 Arcos faríngeos	31
4.1.4 Bolsas faríngeas.....	33
4.1.5 Hendiduras faríngeas	34
4.1.6 Desarrollo craneofacial humano	34
4.2 Palatogénesis	35
4.2.1 Morfología del paladar.....	38
4.3 Metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores endógenos en el desarrollo del paladar	41
4.3.1 Estructura y función.....	41
4.3.2 Grupo de las gelatinasas	43
4.3.2.1 Gelatinasa A (MMP-2, Colagenasa tipo IV)	43
4.3.2.2 Gelatinasa B (MMP-9, colagenasa tipo V).....	44
4.3.3 Regulación de la activación de las MMPs.....	44
4.3.4 Inhibidor tisular de las metaloproteinasas 2 (TIMP-2).....	45
5. OBJETIVOS	47
5.1. Objetivo general	47
5.2. Objetivos específicos	47
6. Planteamiento de la hipótesis	47
7. DISEÑO METODOLÓGICO	48

7.1. Tipo de estudio	48
7.2 Unidad de análisis	48
7.3. Criterios de inclusión	50
7.4. Criterios de exclusión	50
7.5. Consideraciones éticas.....	50
7.6. Diseño experimental.....	50
7.6.1 Fase I- Estandarización de la dieta de cafetería	52
7.6.1.1 Organización de los cubículos y espacio físico.....	52
7.6.1.2 Toma de medidas morfométricas de los biomodelos del grupo control y grupo experimental.....	53
7.6.1.3 Administración de la dieta de cafetería.....	54
7.6.2 Apareamiento, preñez y eutanasia de los biomodelos hasta el estadio E16.5	57
7.6.2.1 Sacrificio de los biomodelos y disección del útero	58
7.6.3 Fase II- Procesamiento histoquímico.....	59
7.6.3.1 Disección, fijación e inclusión en parafina de la cabeza fetal de rata Wistar estadio E16.5.....	60
7.6.3.2 Corte de las cabezas fetales en micrótopo de rotación	61
7.6.3.3 Procedimiento de coloración por hematoxilina - eosina.....	62
7.6.4 Fase III- Procesamiento Inmunohistoquímico.....	62
7.6.4.1 Fijación, inclusión, y corte de la cabeza embrionaria de rata Wistar en estadio E 16.5	62
7.6.4.2 Procedimientos de inmunohistoquímica para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2.....	63
7.6.5 Fase IV.....	63
7.6.5.1 Análisis de imágenes	63
7.6.5.2 Toma y almacenamiento de las imágenes	63
7.6.5.3. Morfometría lineal del feto	65
7.6.5.3.1 Medidas correspondientes al tercio medio y tercio inferior facial:	65
7.6.5.3.2 Medidas frontales de la cabeza fetal	66

7.6.5.3.3 Medidas coronales:.....	66
7.6.5.4. Determinación del estadio de Theiler	67
7.6.5.5. Densitometría óptica	67
7.6.5.6. Análisis estadístico.....	69
7.6.5.7 Plan de Análisis.....	69
7.6.5.8 Pruebas de concordancia intraobservador e intraobservador	73
8. RESULTADOS	76
8.1 Caracterización de los fetos procedentes de madres normopeso y obesas .	76
8.2. Peso placentario y fetal	76
8.3. Estadio fetal y longitud cráneo rabadilla	77
8.3.1. Distribución del estadio de Theiler.....	77
8.3.2 Distribución de la longitud cráneo rabadilla	81
8.4 Morfometría lineal de la cabeza fetal	79
8.4.1 Longitud bregma-Borde inferior de la mandíbula	79
8.5. Evaluación del tercio medio y tercio inferior facial.....	80
8.6 Evaluación frontal de la cabeza fetal	82
8.7 Evaluación coronal de la cabeza fetal.....	86
9. Morfología palatina de rata Wistar en el estadio E16.5	88
10. Distribución del estadio de la palatogénesis	89
11. Evaluación de las proteínas de matriz extracelular MMP2, MMP9 y TIMP2	89
11.1. Inmunomarcación en la región mesenquimática de las crestas palatinas derecha e izquierda para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de fetos procedentes del grupo control.	89
11.1.1 MMP2 en la región mesenquimal del paladar grupo control	90
11.1.2 MMP9 en la región mesenquimal del paladar del grupo control.....	90
11.1.3 TIMP2 en la región mesenquimal del paladar del grupo control	91
11.2 Región mesenquimal: correlación entre las crestas palatinas derecha e izquierda para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de fetos procedentes del grupo control.	93
11.2.1 Grupo control.....	93

11. 3 Inmunomarcación en la región mesenquimática de las crestas palatinas derecha e izquierda para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de fetos procedentes del grupo obeso	94
11.3.1 MMP2 en la región mesenquimal del grupo obeso	94
11.3.2 MMP9 en la región mesenquimal del grupo obeso	95
11.3.3 TIMP2 en la región mesenquimática del grupo obeso	96
11.4 Región mesenquimática: correlación entre las crestas palatinas derecha e izquierda para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de fetos procedentes del grupo obeso.	98
11.5 Correlación entre crestas para cada uno de los marcadores MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en la región epitelial	99
11.5.1 Grupo control.....	99
11.5.2 Inmunomarcación de MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región epitelial del paladar en estadio de crecimiento vertical para el grupo control	100
11.5.3 Grupo obeso.....	101
11.5.4 Inmunomarcación de MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región epitelial del paladar en estadio de crecimiento vertical para el grupo obeso	102
11.6 Correlación entre regiones mesenquimal y epitelial palatina según marcador MMP2, MMP9 y TIMP2	103
11.6.1 Grupo control.....	103
11.6.2 Grupo obeso.....	104
11.7 Correlación entre crestas y estadio de la palatogénesis según el marcador MMP-2, MMP-9 y TIMP-2	104
12. DISCUSIÓN	109
12.1 Modelo de obesidad inducida por dieta	109
12.2 Importancia de la nutrición materna en el desarrollo fetal	111
12.3 Peso placentario y peso fetal.....	113
12.4 Medidas de edad fetal: Longitud cráneo rabadilla y estadio de Theiler	113
12.5 Medidas lineales fetales	114
12.6 Estadio de la palatogénesis	115
12.7 Obesidad materna y metaloproteinasas de matriz en la palatogénesis....	116

12.7.1 Expresión de MMP-2 en el paladar de rata Wistar E16.5 para el grupo ctrol/Ob	117
12.7.2 Correlaciones de MMP2 para los grupos Ctrol/Ob.....	118
12.7.3 Expresión de MMP-9 en el paladar de rata Wistar E16.5 para el grupo ctrol/Ob	119
12.7.4 Correlaciones de MMP9 para los grupos Ctrol/Ob.....	120
12.7.5 Expresión de TIMP-2 en el paladar de rata Wistar E16.5 para los grupos Ctrol/Ob.....	120
12.7.6 Correlaciones de TIMP2 para los grupos Ctrol/Ob	121
12.8 Regulacion de micronutrientes en la expresion de MMPs/TIMPs	122
13. CONCLUSIONES	124
14. Recomendaciones	125
15. Divulgación	126
16. Referencias Bibliográficas	128

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
17. ANEXOS.....	149
17.1 POE para preparación de soluciones	149
17.2. POE para determinación del ciclo estral	155
17.3. POE eutanasia y disección de fetos de rata Wistar E16.5	161
17.4. POE toma de imágenes estereomicroscopio	165
17.5. POE Disección de cabeza fetal	168
17.6. POE Procesamiento histológico de las cabezas de rata Wistar en estadio E 16.5.....	170
17.7 POE Corte en el micrótopo de rotación.....	174
17.8. POE tinción de hematoxilina eosina	179
17.9. POE de inmunohistoquímica para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2	187
17.10. POE De medidas morfométricas fetales de rata Wistar E16.5.....	192
17.11. POE Estimación del estadio de Theiler.....	202
17.12. POE Densitometría óptica de las crestas palatinas	206
17.13. Aval de comité de ética animal de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle	220
17.14. Estudios publicados en biomodelos murinos sobre la expresión de MMP-2,-9 y TIMP-2 en la palatogénesis y los métodos empleados para su detección.	221
17.15 Ponencias y Publicaciones	222

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Derivados de los arcos faríngeos.....	32
Tabla 2. Derivados de las bolsas faríngeas.	33
Tabla 3. Estructura de los dominios y la función de las MMPs ¹²⁶	42
Tabla 4. Especie rata Wistar, creada a partir del género rattus, para la investigación biomédica.....	42
Tabla 5. Lista de alimentos suministrados incluido pellet y dieta de cafetería	56
Tabla 6. Características del ciclo estral de la Rata Wistar.....	57
Tabla 7. Parámetros de la toma de imágenes.....	60
Tabla 8. Parámetros adquisición de las imágenes de hematoxilina eosina	64
Tabla 9. Parámetros de la adquisición de las imágenes de inmunohistoquímica ..	64
Tabla 10. Clasificación de las variables de estudio	71
Tabla 11. Análisis de normalidad y la respectiva comparación entre experto y estudiante para cada una de las variables.....	74
Tabla 12. Matriz de correlación entre las crestas y el estadio de palatogénesis según marcador TIMP-2, MMP-2 y MMP-9.....	105

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Porción dorsal del disco embrionario.	29
Figura 2. Plegamiento del embrión.	31
Figura 3. Palatogénesis en el ratón.	37
Figura 4. Morfología palatina, paladar anterior, medio y posterior.....	38
Figura 5. Morfología de las crestas palatinas de rata Wistar.	39
Figura 6. Epitelio del paladar embrionario de rata Wistar, etapa de crecimiento vertical.	39
Figura 7. Epitelio del paladar embrionario de rata Wistar, etapa de elevación.	40
Figura 8. Dominios de las MMPs.	42
Figura 9. Proceso de asignación de fetos para cada fase de investigación.	49
Figura 10. Fase I- Establecimiento de la dieta de cafetería.....	51
Figura 11. Fase II- Procesamiento histoquímico	51
Figura 12. Fase III- Procesamiento Inmunohistoquímico	51
Figura 13. Fase IV- Análisis de imágenes, análisis estadístico y escritura final. ...	52
Figura 14. Organización del cubículo para el grupo control.	52
Figura 15. Organización del cubículo para el grupo experimental.....	53
Figura 16. Toma de medidas morfométricas.....	54
Figura 17. Aumento de peso para el grupo de la dieta de cafetería (DC) y dieta estándar (DE).	54
Figura 18. Extendido vaginal en fresco.	58
Figura 19. Disección de biomodelo en estadio E16.5 y extracción del útero con implantaciones.....	59
Figura 20. Disección de los fetos de rata Wistar en estadio E16.5.....	59
Figura 21. Disección de la cabeza fetal de rata Wistar en estadio E16.5.	60
Figura 22. Procesamiento histoquímico de la cabeza fetal de rata Wistar E 16.5 .	61
Figura 23. Medidas lineales craneofaciales de tejidos blandos de rata Wistar E16.5.	68
Figura 24. Representación esquemática de las regiones epiteliales y mesenquimales seleccionadas para el análisis de las imágenes.	68
Figura 25. Diagrama de las regiones epitelial y mesenquimal de la cresta palatina.	69
Figura 26. Programa Image Pro Plus.....	69

Figura 27. Interpretación del coeficiente de correlación de Pearson.	72
Figura 28. Distribución de los fetos por grupo experimental.....	76
Figura 29. Diagrama de cajas del peso placentario grupos Ctról vs Ob.....	77
Figura 30. Diagrama de cajas del peso fetal grupos Ctról Vs Ob.....	77
Figura 31. Diagrama de frecuencias distribución del estadio de Theiler en rata Wistar E16.5.	78
Figura 32. Diagrama de cajas de la longitud cráneo rabadilla grupos Ctról vs Ob	79
Figura 33. Diagrama de cajas de la longitud bregma-borde inferior de la mandíbula Grupos Ctról vs Ob.....	80
Figura 34. Diagrama de cajas de medida de cartílago nasal-ángulo interno del ojo grupos Ctról vs Ob.....	81
Figura 35. Diagrama de cajas de medida nasion-protuberancia occipital ojo grupos Ctról vs Ob.....	81
Figura 36. Diagrama de cajas de longitud del hocico grupos Ctról vs Ob.....	82
Figura 37. Diagrama de cajas de la distancia intercantal grupos Ctról vs Ob.....	83
Figura 38. Diagrama de cajas de vertical verdadera grupos Ctról vs Ob.....	83
Figura 39. Diagrama de cajas de distancia del canto interno del ojo derecho VV.	84
Figura 40. Diagrama de cajas de distancia del canto interno del ojo izquierdo-VV	84
Figura 41. Diagrama de cajas de diferencia entre A y A´.....	85
Figura 42. Diagrama de cajas de distancia inter-temporal.....	85
Figura 43. Diagrama de cajas de perímetro cefálico.....	86
Figura 44. Diagrama de cajas de distancia interparietal.....	87
Figura 45. Diagrama de cajas de distancia antero-posterior.....	87
Figura 46. Vista coronal del paladar de rata Wistar E16.5 en biomodelos del grupo control y obeso.	88
Figura 47. Diagrama de frecuencias del estadio de la palatogénesis en el día 16.5.	89
Figura 48. Inmunohistoquímica para MMP-2 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 grupo control.	90
Figura 49. Inmunohistoquímica para MMP-9 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 grupo control.....	91
Figura 50. Inmunohistoquímica para TIMP2 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 grupo control.	92
Figura 51. Control negativo de cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 grupo control.....	93
Figura 52. Correlación entre CD y CI para MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región mesequimal palatina, en el grupo control.....	94
Figura 53. Inmunohistoquímica para MMP-2 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ob.	95

Figura 54. Inmunohistoquímica para MMP-9 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ob.	96
Figura 55. Inmunohistoquímica para TIMP2 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ob.	97
Figura 56. Control negativo de cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ob.	97
Figura 57. Correlación entre cresta derecha y cresta izquierda para MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región mesequimal palatina, en el grupo obeso.	98
Figura 58. Correlación entre CD y CI para MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región epitelial en el grupo control.	99
Figura 59. Inmunohistoquímica región epitelial para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de una cresta palatina perteneciente al grupo control.	100
Figura 60. Correlación entre cresta derecha y cresta izquierda para MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región epitelial en el grupo obeso.	101
Figura 61. Inmunohistoquímica región epitelial para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de una cresta palatina perteneciente al grupo Ob.	102
Figura 62. Correlación entre región mesequimal y epitelial para MMP2, MMP9 y TIMP2 en el grupo control.	103
Figura 63. Correlación entre región mesequimal y epitelial para MMP2, MMP9 y TIMP2 en el grupo obeso.	104
Figura 64. Diagrama de dispersión para TIMP2 en la cresta derecha, con el estadio de la palatogénesis.	105
Figura 65. Diagrama de dispersión para TIMP2 en la cresta izquierda, con el estadio de la palatogénesis.	105
Figura 66. . Diagrama de dispersión para MMP2 en la cresta izquierda, con el estadio de la palatogénesis.	106
Figura 67. Diagrama de dispersión para MMP2 en la cresta derecha, con el estadio de la palatogénesis	106
Figura 68. Diagrama de dispersión para MMP9 en la cresta derecha, con el estadio de la palatogénesis	106
Figura 69. Diagrama de dispersión para MMP9 en la cresta izquierda, con el estadio de la palatogénesis.	106
Figura 70. Expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el estadio de crecimiento vertical y elevación del paladar en rata Wistar E16.5. Aumento 10X.	107
Figura 71. Comparación de la expresión celular de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el EBM en el estadio de elevación de las crestas palatinas de rata Wistar E16.5. Aumento de 100x.	107

EXPRESIÓN DE PROTEINAS MODULADORAS DE MATRIZ EXTRACELULAR EN EL DESARROLLO DEL PALADAR EN UN MODELO MURINO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

1. Resumen

Las fisuras labiopalatinas están entre los defectos más comunes al nacimiento. Alrededor del 70% se consideran de origen no sindrómico y el resto está asociado a síndromes mendelianos transmitidos genéticamente, lo que indica que los cambios medioambientales tienen una gran influencia en la ocurrencia de alteraciones en el cierre del labio-paladar. Estudios recientes evidencian la relación entre la obesidad durante el embarazo y la presencia de hendiduras labiopalatinas en la descendencia. Por tal motivo, se vuelve necesario profundizar en los procesos morfogénicos moleculares asociados al desarrollo palatino para contribuir con el conocimiento de los factores ambientales que tienen impacto negativo sobre la salud humana.

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs), son enzimas proteolíticas extracelulares vinculadas con múltiples procesos de desarrollo y remodelación tisular, juegan un papel importante durante la morfogénesis del paladar, principalmente MMP-2, MMP-9 y su inhibidor TIMP-2; cambios en la expresión de estos reguladores podrían generar alteraciones en las estructuras orofaciales.

Con base en estos antecedentes, el objetivo principal de este estudio fue determinar la expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en las crestas palatinas de rata Wistar en estadio E16.5 en un modelo experimental de obesidad materna adquirida por dieta. Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos específicos; para los fetos de rata normopeso y obesa en estadio E16.5: 1) Establecer medidas lineales de puntos blandos de tercio medio e inferior facial, 2) Determinar cambios en el estadio de la palatogénesis, 3) Caracterizar el patrón de expresión proteica de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el epitelio y mesénquima de las crestas palatinas.

Se utilizaron 8 ratas Wistar hembras adultas; 4 para el grupo control (ctrol) y 4 para el grupo obeso (Ob). El grupo Ctrol fue alimentado con dieta estándar y el grupo experimental con dieta de cafetería. Posteriormente, las hembras fueron apareadas con machos sanos y al día 16.5 de preñez los animales fueron sacrificados: se obtuvieron 41 fetos para el grupo Ctrol y 27 para el grupo Ob, los cuales fueron, fotografiados bajo estereomicroscopio. Las cabezas fetales fueron procesadas en cortes coronales para el estudio histoquímico del paladar por hematoxilina/eosina. El análisis de las medidas de tejidos blandos se realizó en el Software Image J. Para la detección de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 se realizó

inmunohistoquímica (IHQ) de los paladares fetales Las imágenes de IHQ fueron analizadas por densitometría óptica en el software Image Pro Plus versión 7.0.

Se encontró que las medidas lineales craneofaciales de tejidos blandos (sagitales, frontales, coronales), son una técnica sencilla, fácil, rápida y reproducible y pueden ser implementadas para el estudio de biomodelos. Sin embargo, no hubo diferencias significativas de las medidas evaluadas entre los grupos Ctról y Ob.

Por otro lado, la dieta de cafetería evidenció cambios en el patrón de expresión de la MMP-9 en el mesénquima de las crestas palatinas, y MMP-2 y TIMP-2 aumentaron su expresión a nivel de la región epitelial y mesenquimal en el grupo obeso comparado vs el control.

La obesidad materna genera cambios en la localización y niveles de expresión de las proteínas de matriz analizadas, e induce cambios en el balance de MMPs/TIMPs durante la formación del paladar.

Palabras claves: Metaloproteasas (MMPs), inhibidores endógenos (TIMPs), obesidad materna, palatogénesis.

EXPRESSION OF PROTEINS REGULATORS OF EXTRACELLULAR MATRIX IN PALATE DEVELOPMENT IN A BIOMODEL INDUCED BY CAFETERIA DIET

1.1 Abstract

Abstract Cleft lip and palate are among the most common birth defects. About 70% are considered of non-syndromic origin and the rest are associated with Mendelian genetically transmitted syndromes, indicating that environmental changes have a great influence on the occurrence of cleft and lip palate. Recent studies show the relationship between obesity during pregnancy and the presence of cleft lip and palate in the offspring. Therefore, the molecular processes associated with palate development contribute to the understanding of the environmental factors that have negative impacts on human health.

Matrix metalloproteinases (MMPs), extracellular proteolytic enzymes that are linked to multiple processes of development and tissue remodeling, play an important role during morphogenesis of the palate, especially MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 inhibitor; changes in expression of these regulators may generate disturbances in the orofacial structures.

The main objective of this study was to determine the expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in the Wistar rat palatal E16.5 stage in an experimental model of maternal obesity acquired by diet. And the specific objectives were; for normal weight and obese fetal rat E16.5 stage: 1) To establish lower linear measurements of facial soft tissues 2) to determine changes in the palatogenesis stages, 3) To characterize the pattern of expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in the epithelium and mesenchyme of the palatal shelves.

Eight rats were used Wistar adult females; 4 for the control group (Ctrl) and 4 for the obese group (Ob). The control group was fed a standard diet and the experimental group was fed a cafeteria diet. Subsequently, females were mated with healthy males and at day 16.5 of pregnancy the animals were sacrificed; 41 fetuses for Ctrl group and 27 for the Ob group, which were photographed under stereomicroscope. Fetal heads were processed in coronal sections for histochemical study of the palate by hematoxylin / eosin. The analysis of the measurements of soft tissues was performed using software Image J. For detection of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 were performed. Immunohistochemistry (IHC) of fetal palates images IHC were analyzed by optical densitometry Image Pro Plus on software version 7.0. It was found that craniofacial soft tissue (sagittal, frontal, coronal) linear measurements are a simple, easy, fast, and reproducible technique and can be implemented for the study of biomodels. However, there

were no significant differences between the measures assessed in Ctrl and ob groups. Cafeteria diet showed changes in the expression pattern of MMP-9 in the mesenchyme of the palatal, and MMP-2 and TIMP-2 increased the expression level of the epithelial region and mesenchymal the group obese compared vs control. Maternal obesity causes changes in the localization and expression levels of matrix proteins analyzed, and induces changes in the balance of MMPs / TIMPs during palate formation. Keywords: matrix metalloproteinases (MMPs), endogenous inhibitors (TIMPs), maternal obesity, palatogenesis.

Keywords: matrix metalloproteinases (MMPs), endogenous inhibitors (TIMPs), maternal obesity, palatogenesis.

2. INTRODUCCIÓN

Los cambios en la conducta de alimentación y actividad física se han transformado drásticamente en los últimos años, llevando a la obesidad al estatus de pandemia, condición que afecta con mayor frecuencia a la mujer en edad reproductiva¹. El sobrepeso y la obesidad son definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una acumulación de grasa anormal o excesiva que puede deteriorar la salud. El índice de masa corporal (IMC) es un indicador sencillo del peso para la talla que se usa generalmente al clasificar el sobrepeso y la obesidad en las poblaciones de individuos adultos. Se define como el peso en kilogramos dividido por la altura al cuadrado en metros (kg/m²). El IMC proporciona la medida más útil a nivel de población de sobrepeso y obesidad ya que es la misma para ambos sexos y para todas las edades de los adultos. La OMS define como sobrepeso a un IMC \geq a 25 y obesidad como un IMC \geq 30².

A nivel mundial el sobrepeso y la obesidad presentan una alta incidencia en las mujeres en edad reproductiva; en países industrializados, como en Estados Unidos el 35% de esta población son obesas^{3,4}. En Inglaterra el 33% de las mujeres embarazadas tienen sobrepeso u obesidad⁵. Por otro lado en países como la India el 26% de esta población tiene sobrepeso y el 8% obesidad⁶. El porcentaje de mujeres en edad reproductiva con sobrepeso u obesidad en la China es del 16%, en Ghana es del 64.7% y Australia del 35%⁷⁻⁹.

En países latinoamericanos la obesidad y el sobrepeso en las mujeres en edad reproductiva es una preocupación en salud pública: en México el 32% son obesas^{10,11}, en Brasil, el 50% y en Argentina el 32% tienen sobrepeso u obesidad¹²⁻¹⁴. En Chile la obesidad en la gestación tiene una prevalencia del 13 al 32%¹⁵.

En Colombia se estima que cerca de la mitad de la población sufre de sobrepeso u obesidad. Según las Encuestas Sobre la Situación Nutricional en Colombia, *entre el 2005 y el 2010 el sobrepeso en la edad adulta pasó de un 45,9% a 51,2%*. En el año 2010 el 16.5% de los adultos colombianos alcanzaron la obesidad¹⁶. Gamboa y Forero concluyeron que: *“ser mujer, habitar en zonas urbanas y vivir fuera de Bogotá tiene una mayor probabilidad de tener un IMC mayor a los niveles de normopeso”*¹⁷.

Según la OMS, aquellos individuos obesos tienen un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardíacas, hipertensión arterial, diabetes mellitus, cáncer de mama, cáncer de colon, litiasis vesicular y artritis. Para el año 2005, cerca de 1000 millones de personas presentaban sobrepeso, y 805 millones eran población

femenina y cerca de 300 millones eran personas obesas. Cada año alrededor de 2,6 millones de personas mueren a causa del sobrepeso u obesidad a nivel mundial¹⁸.

El sobrepeso y la obesidad pregestacional están asociados a un aumento en la morbimortalidad tanto para la madre como para su hijo, además de presentar defectos congénitos en su descendencia¹⁹. Entre los riesgos perinatales se encuentran infertilidad, diabetes gestacional, desórdenes hipertensivos y una mayor tasa de parto por cesárea, tromboembolismo venoso e infecciones postparto y complicaciones de cicatrización. Los efectos de la obesidad materna pueden ser transferidos al feto en desarrollo, demostrando el riesgo de ocurrencia de defectos del cierre del tubo neural, malformaciones cardíacas y fisuras oropalatinas²⁰⁻²⁸. Las anomalías fetales pueden conllevar a la mortalidad infantil, y en Estados Unidos 1 de cada 5 muertes infantiles se atribuye a dichas anomalías²⁵.

Hasta el momento, los estudios de las fisuras labiopalatinas se han centrado principalmente en los eventos morfogénicos macroscópicos, en tanto que las vías moleculares aún no se entienden completamente.

En el desarrollo normal del paladar las metaloproteinasas (MMPs) y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), de manera particular MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, participan activamente en su formación y cierre²⁹⁻³¹.

Se propone que alteraciones de estos reguladores, producto de la obesidad materna, podrían generar cambios en las estructuras labiopalatinas.

En el presente estudio, se estableció un biomodelo de obesidad materna inducida por dieta de cafetería, con el fin de caracterizar el desarrollo del paladar en el estadio E16.5 en un modelo de rata Wistar. Se realizaron las medidas craneofaciales de los fetos de rata normopeso y obesa. Posterior a esto, se realizó el estudio histológico del paladar y los ensayos de inmunohistoquímica para analizar la localización y nivel de expresión de las proteínas MMP-2, MMP-9 y TIMP-2.

Al establecer los riesgos de malformaciones labiopalatinas fetales asociados a la obesidad materna, se obtendrán nuevas herramientas que fortalezcan no solo el conocimiento científico a nivel nacional e internacional, sino además, la necesidad de generar programas de salud pública que involucre diversos actores como educadores, ginecólogos, obstetras, nutricionistas, en la responsabilidad de

abogar por un cambio en el estilo de vida potenciando las dietas saludables y la actividad física.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los cambios en los patrones de alimentación y actividad física han incrementado el desarrollo de la obesidad a nivel

El estado nutricional actual de la población colombiana presenta un periodo de transición; en la que persisten problemas de desnutrición y a su vez el problema del sobrepeso y obesidad van en aumento. En el estudio realizado por el Banco Interamericano de Desarrollo en el año 2010 se reporta que en Colombia, la población adulta presentó un aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad, siendo mayor del 60% en mayores de 45 años, estos datos fueron confirmados en la Encuesta Nacional de Salud Nutricional (ENSIN) realizada en el 2010, donde se demostró que el 34.6% de la población presentó sobrepeso y 16.5% obesidad. Con relación a la obesidad las mujeres presentaron casi el doble (16.6%) que los hombres un (8.8%)¹⁶. En particular, la población de mujeres gestantes presentó un 24,8 % de sobrepeso y un 9,8 % de obesidad, es decir que el 34,6 % presentó algún grado de exceso de peso para la edad gestacional¹⁶.

Estos datos son importantes ya que demuestran que el sobrepeso y la obesidad son factores a tener en cuenta en las mujeres en edad reproductiva, ya que estas prevalencias aumentan con la edad de las mujeres.

La obesidad, en especial la abdominal, se asocia con riesgos aumentados para diferentes enfermedades ³². En el embarazo la obesidad incrementa el riesgo materno promoviendo la ocurrencia de trabajo de parto pretérmino, cesárea primaria o parto instrumentado, morbilidad perioperatoria, estados o trastornos hipertensivos del embarazo, pre-eclampsia, trombo embolismo venoso, diabetes gestacional, ganancia de peso excesiva durante todas las etapas del embarazo, infección puerperal, disminución de las tasas de iniciación o continuación de la lactancia materna y riesgos con la anestesia perioperatoria ^{19,33-38}. También están descritos riesgos propios para el feto como son: mayor probabilidad de muerte intrauterina, macrosomía, restricción del crecimiento intrauterino, anomalías congénitas y neonatales y mayor probabilidad de muerte neonatal ^{37,39,40}. Todos estos riesgos incrementan en relación directa con la severidad de la obesidad, siendo incluso significativos en mujeres que presentan solamente exceso de peso ⁴¹.

Las anomalías congénitas son la principal causa de muerte fetal y de mortalidad infantil. En los últimos años se ha demostrado que la obesidad materna está

asociada con el incremento de defectos en la formación y cierre del tubo neural, el corazón y los grandes vasos, espina bífida, onfalocele, labio y paladar fisurado 25,42,43.

En un estudio de tipo caso y controles realizado en 1.000.000 mujeres, con una duración de 10 años, Cedergren et al., obtuvieron importantes resultados sobre la asociación entre la obesidad materna en el embarazo temprano y el incremento de presencia de hendiduras orofaciales en su descendencia ³³. Estos hallazgos fueron confirmados por Stott-Miller y col. en el 2010, quienes evaluaron a 2153 niños con fisuras labiopalatinas, reportando que el principal riesgo para la presencia de hendidura de labio y/o paladar se asocia con la obesidad materna y la diabetes preexistente o gestacional ⁴⁴.

Además de otros autores como Moore et al⁴⁵ concluyeron que los embarazos de mujeres obesas y diabéticas tenían una prevalencia mayor de ciertos defectos como las fisuras orofaciales, defectos cardiacos, hidrocefalia y defectos de la pared abdominal. Vujkovic et al en el 2007, realizaron un estudio de casos y controles, los casos fueron mujeres con hijos con labio y/o paladar fisurado, donde se monitoreó la ingesta nutricional materna por 14 meses y se encontró que el patrón de dieta occidental como por ejemplo pizza, papas y poco consumo de frutas fueron asociadas a un riesgo más alto de presentar una descendencia con labio y/o paladar fisurado no sindrómico⁴⁶. Stothard et al en el 2009, realizaron un metaanálisis donde evaluaron la evidencia actual de la asociación de sobrepeso y obesidad materna y anomalías congénitas; estos autores encontraron que las madres obesas tuvieron un mayor riesgo de presentar hijos con paladar hendido (OR 1:23; 95% CI 1.03-1.47) y labio y/o paladar fisurado (OR, 1.20;95% CI 1.03-1.40)²⁵. En Australia, Oddy et al en el 2009, realizaron un estudio con 418 controles y 111 casos de anomalías de desarrollo y encontraron que las mujeres que presentaron obesidad previa del embarazo tuvieron el doble de riesgo de tener infantes con defectos del tubo neural, defectos cardiacos y fisuras orofaciales⁴⁷. Blomberg y Kallen en el 2010, en un estudio realizado en Suecia evaluaron un total de 1.049.582 infantes nacidos entre 1995-2007, encontrando una prevalencia de 7.9% de malformaciones congénitas, concluyeron que la obesidad mórbida se asoció con defectos del tubo neural, defectos cardiacos y fisuras orofaciales (OR 1.90; 95% CI 1.27-2.86)⁴⁸. Estos resultados son confirmados en el metaanálisis realizado por Izedonmwun et al en el 2014, donde compararon el IMC con el riesgo de fisuras oropalatinas en la descendencia y encontraron que las mujeres obesas tienen un riesgo aumentado de tener hijos afectados con labio y paladar fisurado (OR=1.16; 95% CI 1,1.34) y paladar fisurado (OR=1.14: 95% CI 0.95, 1.37). ⁴⁹.

En Colombia, según el *Informe final del evento de Anomalías Congénitas del año 2012*, se notificaron 2412 casos de anomalías congénitas por medio del Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud (INS). Entre las anomalías congénitas más frecuentes se encontraron las cardiopatías (19.07%), y las fisuras orales (19,70%). Encontrándose el mayor número de casos reportados en la ciudad de Bogotá, seguido del Tolima, Nariño y el Valle del Cauca en sexto lugar. Sin embargo, el protocolo del evento requiere trabajar en la caracterización del tipo de agente teratogénico al cual se expone la madre en gestación y las características del estado de salud.⁵⁰

Duque y colaboradores en el año 2002, realizaron un estudio descriptivo en menores con labio y paladar fisurados atendidos en el Hospital Universitario del Valle entre los años de 1996-2001, la población constó de 192 menores de 14 años, y se ahondó sobre predisposiciones hereditarias, ambientales y posibles factores de riesgo durante el primer trimestre de embarazo (consumo de alcohol, cigarrillo, medicamentos, exposición a radiación y enfermedades), sin embargo no encontraron resultados estadísticamente significativos; el 13.5% de los niños presentó otros síndromes asociados. La falencia de este estudio se asoció a los pocos registros y carencia de información en las historias clínicas⁵¹. Otro estudio realizado en la misma institución prestadora de salud, entre los años de 2004-2008, evaluaron 32.995 nacimientos, de los cuales 735 presentaron un defecto congénito, la prevalencia encontrada fue de 2,22 por 10.000 nacimientos, y entre los defectos más frecuentes se encontró el labio y/o paladar hendido con una prevalencia de 10,9. En este estudio se tuvieron en cuenta características demográficas, maternas y paternas como la edad materna, escolaridad, ocupación, gravidez del embarazo, y las características del recién nacido, el sexo y el peso; sin embargo no se tuvo en cuenta el peso materno⁵². Nuevamente en el año 2014, Duque y colaboradores realizaron un estudio descriptivo transversal retrospectivo de las historias clínicas de los niños con labio y paladar hendido (LPH) entre los años 2002-2011, de 170 historias (105 niños y 65 niñas), evaluaron algunos antecedentes médicos de la madre como: hipertensión arterial (9,41%), enfermedades de la placenta (4,12%), infección urinaria (2,94%), demostrando la falta de información del IMC de la madre gestante⁵³.

En cuanto a las fisuras, estas pueden afectar sólo el labio, paladar o pueden ser labiopalatinas; afectando el paladar secundario (paladar duro y blando). A su vez se pueden clasificar como unilaterales o bilaterales, completas o incompletas y pueden afectar paladar duro y blando⁵⁴.

La etiología de las fisuras oropalatinas es multifactorial, asociadas a factores medioambientales y genéticos. Como se mencionó previamente, se estima que el 70% de los casos son de origen no sindrómico. Se ha reportado la asociación de genes como el TGF α , TGF β 3 y el AP2 con labio y paladar hendido⁵⁵⁻⁵⁷.

La aparición de labio y/o paladar hendido (LPH), se asocia con la exposición a agentes teratogénicos durante la gestación como la cortisona, anticonvulsivantes como la fenitoína, la carbamacepina, y el valproato de sodio, salicilatos, vitamina A, solventes orgánicos y alcohol durante la gestación, drogas antiepilépticas (fenitoína y ácido valproico), pesticidas, ácido retinoico y radiación⁵⁸⁻⁶⁴. Además también, la rubeola materna, la influenza y diabetes gestacional se han reportado como factor de riesgo⁶⁵.

Adicionalmente, la dieta materna es de gran importancia, se ha evidenciado que el suministro durante el primer trimestre de gestación de la vitamina B6 y el ácido fólico son factores protectores para la aparición de anomalías⁶⁶.

La incidencia más alta de fisuras oropalatinas está en la población nativa americana con 3,74 en 1000 nacidos vivos (NV), siguen los japoneses con 3,36 en 1000 NV. En cambio, la población afroamericana tiene la incidencia más baja de 0,5 niños por cada 1000 NV⁶⁷⁻⁶⁹. En Colombia, se ha reportado una prevalencia de 1 en 500 o de 1 en 1000, y varía de acuerdo a la zona geográfica y el nivel socioeconómico de la población⁷⁰. La tasa global de prevalencia de LPH es de 10,49 por 10.000 NV, encontrando las tasas más altas en Bolivia (23.7/10.000), luego Ecuador (14.96/10.000), Paraguay (13.3/10.000), Venezuela (7.92/10.000), Perú (8.94/10.000), Uruguay 9.37/10.000) y Brasil (10.12/10.000)⁷¹.

Los niños con LPH presentan diferentes alteraciones como incompetencia velofaríngea, trastornos de la succión y deglución, fonación, respiración oral, hipoplasias de esmalte, caries dental, anomalías dentales, retraso en la erupción dental, gingivitis, periodontitis, entre otros^{72,73}. Por tal motivo, es importante determinar cómo la obesidad materna puede ser un factor de riesgo para la incidencia de fisuras labiopalatinas, ya que la evidencia reportada demuestra la asociación directa entre el sobrepeso y obesidad en el embarazo y un mayor riesgo de presentar alteraciones como el labio y/o paladar fisurado en la descendencia^{33,44,46}. A pesar que la etiología es multifactorial, no se conocen los patrones moleculares que relacionan la obesidad materna con alteraciones en la palatogénesis.

La obesidad, se ha asociado a un aumento y crecimiento del tejido adiposo, con un incremento en la lipogénesis y almacenamiento de lípidos en los adipocitos,

llevando a la hipertrofia de estas células y una disminución de la lipólisis. Además, existe una proliferación de los preadipocitos que produce a la hiperplasia de adipocitos. Estos eventos requieren de estimulación angiogénica, permitiendo el suministro nutricional y de oxígeno requeridos para el tejido adiposo⁷⁴. Por tal motivo hay una modificación de la matriz extracelular (MEC) durante el crecimiento del tejido adiposo, y el establecimiento de la obesidad. Los adipocitos producen muchos factores, entre estos factores de crecimiento y citoquinas (actualmente conocidas como adipoquinas) que pueden cumplir una función paracrina en la remodelación del tejido adiposo. Entre los factores proangiogénicos se puede mencionar el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)⁷⁵, el factor de necrosis tumoral alfa⁷⁶, y la leptina⁷⁷. Además de estos factores, las proteasas y los componentes de la MEC juegan un papel importante en la remodelación del tejido adiposo, y la degradación de esta MEC es importante para el establecimiento vascular. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs), son una familia de proteinasas secretadas como proenzimas o zimógenos inactivos⁷⁸. Su actividad proteolítica es adquirida por la activación del zimógeno, y regulada por los inhibidores del tejido de metaloproteinasas (TIMPs)^{79,80}. Se ha encontrado que el tejido adiposo de ratones obesos inducidos por dieta tiene altas concentraciones de gelatinasa A (MMP-2)^{81,82}. La MMP-2 genera incremento en la hipertrofia de los adipocitos permitiendo la formación de tejido adiposo como respuesta a una dieta alta en grasa⁸³. Por otro lado, la gelatinasa B (MMP-9) se encontró en altas concentraciones en humanos obesos^{84,85}.

Estudios recientes demuestran también la participación de MMPs y TIMPs en el desarrollo del paladar, en modelos murinos, se ha evidenciado la participación de MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-25, ADAMTS9, ADAMTS20 y TIMPs. Sin embargo los estudios reportados en humanos son escasos y se asocian a polimorfismos en MMP-3 y MMP-25 asociados a la presencia de labio y paladar fisurado no sindrómico⁸⁶.

En la obesidad hay un estado metabólico alterado, que ha evidenciado provocar cambios en el desarrollo fetal; como son las fisuras oropalatinas, se ha demostrado que en el plasma de individuos obesos hay un incremento de gelatinasas como MMP-2 y MMP-9; MMPs que participan en el desarrollo palatino. Por tal motivo de los antecedentes desarrollados se desprende la siguiente pregunta de investigación: ¿La obesidad materna puede modificar el patrón de expresión de las metaloproteasas MMP-2, MMP-9 y su inhibidor endógeno TIMP-2 en el proceso de palatogénesis?

4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL CONOCIMIENTO

4.1 Generalidades del desarrollo craneofacial humano

4.1.1 Tercera semana de desarrollo

La tercera semana de desarrollo intrauterino es de vital importancia para el desarrollo craneofacial. Se caracteriza por la aparición de las tres capas germinativas; ectodermo, mesodermo, endodermo, donde éstas tienen un desarrollo acelerado. La aparición del epiblasto en la zona dorsal y caudal induce la formación de la línea o estría primitiva, formada por la proliferación de las células del epiblasto e invaginación de las mismas, junto con las células del hipoblasto, dando como resultado la formación del surco primitivo. En la porción rostral de esta línea hay un cúmulo de células que formarán el nódulo primitivo, que contiene una depresión conocida como nódulo primitivo. La estría primitiva establece los ejes longitudinales, rostral/caudal, derecho/izquierdo y dorsal/ventral del embrión⁸⁷.

Hacia el día diecinueve hay una proliferación de células mesodérmicas en la porción dorsal del nódulo primitivo, las cuales se dirigen rostralmente hacia la placa precordial formando el proceso notocordal hacia el día vigésimo. El mesodermo adyacente y la prolongación notocordal inducen la formación de la placa neural, el primordio del sistema nervioso central, en el ectodermo embrionario suprayacente. Una vez, la prolongación notocordal aumenta de longitud, la línea primitiva se acorta. Al finalizar la tercera semana, la prolongación notocordal se transforma en notocorda. El disco embrionario tiene inicialmente forma ovoide, pero pronto adquiere forma de pera y después de zapatilla a medida que la notocorda se desarrolla, ésta tiene un papel inductor en la formación del neuroectodermo y los cuerpos vertebrales ^{88,89}.

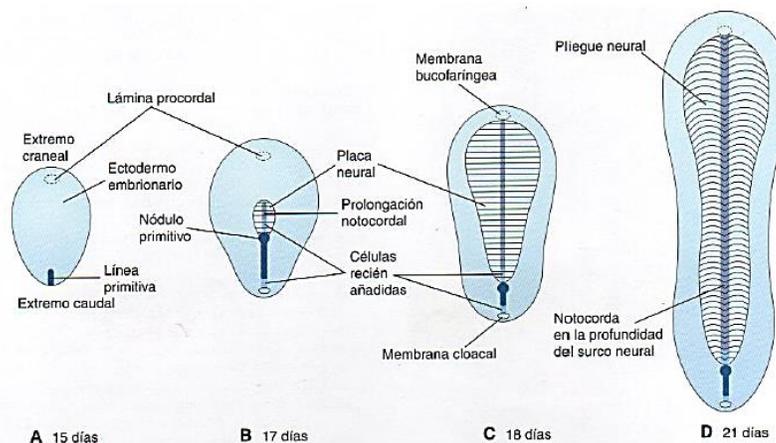


Figura 1. Porción dorsal del disco embrionario. Imagen tomada de: Moore y Persaud, Embriología clínica, 1996⁹⁰.

La notocorda produce diferentes moléculas como el noggin, folistatina y cordina que junto con el nódulo primitivo inducen al ectodermo superficial el cual se transforma en placa neural. Al final de la tercera semana la placa presenta un extremo cefálico y caudal, y los bordes laterales se elevan formando los pliegues neurales y en la mitad se forma el surco neural. Posteriormente los pliegues se juntan en la línea media y se fusionan, formando el tubo neural, excepto en la porción anterior o craneal y posterior o caudal que corresponden a los neuroporos, los cuales se cierran al vigesimoquinto y vigesimoséptimo día, respectivamente. Éste proceso se conoce como neurulación primaria que termina en la cuarta semana de desarrollo, dando como resultado la formación del tubo neural, que formará el sistema nervioso central⁹¹.

En el momento de la neurulación, algunas células de origen neuroectodérmico ubicadas a lo largo de estas crestas neurales migran a diferentes lugares del cuerpo, denominadas células de la cresta neural (CCN), que originan la mayor parte del sistema nervioso periférico, ganglios y nervios craneales, raquídeos y autónomos, las glándulas suprarrenales y el sistema nervioso autónomo, el cual es el encargado de regular el músculo estriado cardíaco y músculo liso⁹².

Al lado de la notocorda se forma una condensación cilíndrica llamada mesodermo paraxial que formará el esqueleto axial, la musculatura voluntaria y parte de la dermis; lateral a él está el mesodermo intermedio; que formará el sistema urinario y parte del sistema genital. Por último está el mesodermo lateral, el cual al día decimoséptimo se divide en dos capas el ventral y la dorsal⁹³.

4.1.2 Cuarta semana de desarrollo

Esta semana se caracteriza por un desarrollo rápido del embrión, donde hay varios cambios morfogénéticos; que producirán los órganos principales, aparatos y sistemas, además el embrión sufre un plegamiento en sentido cefalocaudal⁹⁴.

Con relación al plegamiento cefalocaudal, es el resultado del crecimiento del sistema nervioso central, la formación de los somitas además de la evolución del mesodermo. Se forman dos pliegues: el cefálico y el caudal.⁹⁵

La cavidad revestida por endodermo es incorporada al embrión y forma el intestino anterior, que origina la faringe primitiva. Finalizando esta semana, las paredes laterales y ventrales de la faringe forman los arcos faríngeos o braquiales, constituidos por las tres capas germinativas; en la parte externa, revestida por ectodermo, con un centro mesequimal y una parte interna de endodermo⁹⁰.

Una consecuencia del plegamiento del embrión en la porción más caudal, por debajo de la eminencia cerebral anterior se forma el estomodeo o boca primitiva, separada de la faringe por la membrana bucofaríngea, y finalizando la cuarta semana se rompe y comunica la porción anterior del tubo digestivo con la cavidad amniótica⁹⁶.

El desarrollo y formación de la cabeza está constituida por una porción neurocraneana (muy visible en periodo embrionario; calota craneal, sistema nervioso cefálico, ojos, oídos, porción nerviosa de los órganos olfatorios) y una porción visceral (visible en etapa fetal y postnatal; porción inicial de los aparatos digestivo, cavidad oral, y aparato respiratorio; nariz y fosas nasales).

Alrededor de la tercera semana, el extremo cefálico del tubo neural presenta tres vesículas y dos curvaturas:

- Proscencéfalo (cerebro anterior)
- Mesencéfalo (cerebro medio)
- Romboencéfalo (cerebro posterior y médula espinal)

En la quinta semana el proscencéfalo se divide en dos: telencéfalo y diencéfalo, y el romboencéfalo se divide en: metencéfalo y mielencéfalo, separadas por la curvatura del puente protuberancial⁹⁷.

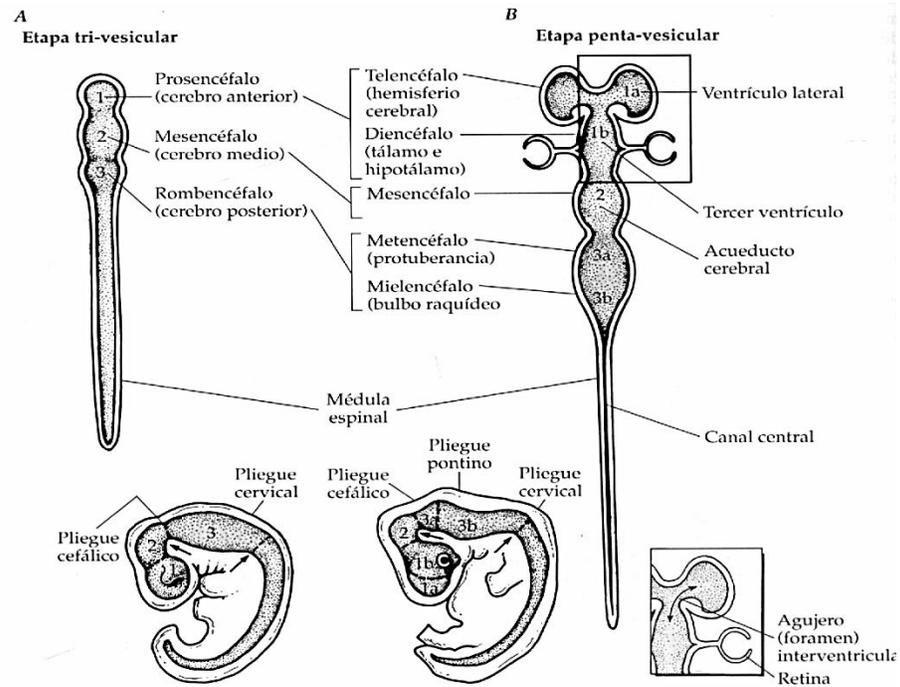


Figura 2. Plegamiento del embrión. Tomada de:

<http://www.anatomiahumana.ucv.cl/estructura/neurodesarrollo.html>

Es de esta manera que la cara cefálica embrionaria a las cuatro semanas se compone de los arcos faríngeos conformados por mesénquima derivado de la cresta neural y en la parte externa revestidas por un ectodermo, y en la parte interna por endodermo. Estas estructuras formarán el aparato faríngeo que se conforma por los arcos faríngeos, bolsas faríngeas, hendiduras faríngeas y membranas faríngeas.

4.1.3 Arcos faríngeos

Estas estructuras inician su formación al inicio de la cuarta semana de desarrollo. El primer par de arcos faríngeos formarán la prominencia maxilar (maxilar superior, hueso cigomático y parte escamosa del hueso temporal) y la prominencia mandibular que dará origen a la mandíbula. Posteriormente, aparecerán otros arcos laterales a la farínge. Al finalizar esa semana, se ven cuatro pares de arcos. Cada uno de los arcos separado por una hendidura faríngea, las cuales se enumeran en sentido craneocaudal⁹⁸.

Cada uno de los arcos faríngeos está conformado por un núcleo de mesénquima, en la parte externa por ectodermo y en la parte interna por endodermo. Además de un arco aórtico, un cilindro cartilaginoso (formará el esqueleto del arco), el

componente muscular (forma los músculos de la cara y el cuello), y el nervio que permite la inervación de los músculos y mucosas⁹⁷.

El patrón de los arcos braquiales es un complejo que requiere la señalización de la cresta neural, señales recíprocas del arco de mesodermo, como contribuciones del endodermo de la bolsa faríngea y el ectodermo. Las células de la cresta neural pertenecientes a los arcos faríngeos se mueven con la formación del tubo tubo neural. Algunos estudios sugieren que las células de la cresta neural tienen el pre-patrón de la morfología esquelética correcta y los tejidos adyacentes. Estudios en quimeras en embriones de codorniz y pato, donde se transplantan células de la cresta neural pre-migratorias resultan en una morfología facial que se asemeja a las especies de la cresta neural donante y no el huésped. Es la cresta neural donante que determina la formación de las estructuras craneofaciales y tejidos adyacentes^{99,100}.

La identidad antero-posterior de los arcos braquiales parece estar determinada por la expresión de genes Hox combinados¹⁰¹. Sin embargo, la cresta neural del primer arco branquial, no expresa estos genes. La expresión regionalizada de Distal-less (Dlx) homologos, que actúan en la vía de señalización que determina la identidad mandibular versus la identidad maxilar⁹⁹.

Arco	Primer (mandibular)	Segundo (Hioideo)	Tercero	Cuarto y sexto
Nervio	Trigémino (PCV)	Facial (PC VII)	Glosofaríngeo (PC IX)	Rama laríngea superior del vago (PC X)
Músculos	Músculos de la masticación, milohioideo y vientre anterior del digástrico, tensor del tímpano, tensor del velo del paladar	Músculos de la expresión facial, estribo, estilohioideo, vientre posterior del digástrico	Estilofaríngeo	Cricotiroideo, elevador del velo del paladar, constrictores de la farínge, músculos intrínsecos de la laringe, músculos estriados del esófago
Estructuras esqueléticas	Martillo y Yunque	Estribo, apófisis estiloides,	Asta menor del hioides, Parte inferior	Cartílagos: tiroides, cricoides,

		asta menor del hioideas, parte superior del cuerpo del hueso hioides	del cuerpo del hueso hioides	aritenoides, corniculado, cuneiforme
Ligamentos	Ligamento anterior del martillo, ligamento esfenomandibular	Ligamento estilohioideo		

Tabla 1. Derivados de los arcos faríngeos. PC: par craneal. Adaptada de: Moore Moore, Persaud y Shiota Embriología Clínica, 1996⁹⁰.

4.1.4 Bolsas faríngeas

El endodermo es una de las capas germinativas, que cubre la farínge en las caras internas de los arcos branquiales, estas estructuras se denominan bolsas faríngeas. A continuación se esquematizan los derivados cada una de ellas¹⁰².

Bolsa Faríngea	Derivados
Primera bolsa faríngea	Participa en la formación de la membrana timpánica (tímpano)
Segunda bolsa faríngea	Una parte permanece como seno o fosa amigdalina Epitelio superficial y el revestimiento de las criptas amigdalinas
Tercera Bolsa faríngea	Glándula paratiroides inferior Timo
Cuarta bolsa faríngea	Glándula paratiroides superior
Quinta bolsa faríngea	No siempre se desarrolla. Participa en la formación del cuerpo ultimofaríngeo

Tabla 2. Derivados de las bolsas faríngeas. par craneal. Adaptada de: Moore Moore, Persaud y Shiota Embriología Clínica, 1996⁹⁰.

4.1.5 Hendiduras faríngeas

Son fisuras que separan cada uno de los arcos branquiales en la superficie externa durante la cuarta y quinta semana. Sin embargo, sólo un par de éstas contribuye a la formación de estructuras postnatales; el primer par formará el meato acústico externo y el resto se mantiene como seno cervical¹⁰².

4.1.6 Desarrollo craneofacial humano

En la cuarta semana de desarrollo se observan cinco primordios faciales alrededor del estomodeo: la prominencia frontonasal, las prominencias maxilares laterales, y las prominencias mandibulares⁹⁶.

La prominencia frontonasal (PFN) está en la parte ventral lateral del proscencéfalo y formará las vesículas ópticas que posteriormente serán los ojos del embrión. En la porción frontal de la PFN se forma la frente, y la porción más caudal y lateral formará las placodas nasales. El desarrollo craneofacial se da principalmente entre la cuarta y octava semana de desarrollo, y a finales del periodo embrionario, ya tiene una apariencia humana.

A finales de la cuarta semana, se forman las placodas nasales, que corresponden a unos engrosamientos en forma oval del endodermo superficial. Alrededor de estas placodas hay una proliferación de mesénquima, y produce unas elevaciones (prominencias nasales mediales y laterales)⁹⁷.

Las prominencias maxilares también sufren una proliferación mesequimal permitiendo un aumento de tamaño y un acercamiento medial con las prominencias nasales. La unión de las prominencias maxilares con las prominencias nasales laterales se conoce como surco nasolacrimal. En la séptima y décima semana de desarrollo las prominencias nasales mediales se fusionan entre sí junto con las prominencias maxilares y nasales laterales.

Las células que contribuyen con la formación del esqueleto facial tienen sus orígenes en la cresta neural. Algunos de los derivados de estas células incluyen: melanocitos, células de Schwann y nervios sensitivos. Las células derivadas del proscencéfalo son las que tienen capacidad de formar tejidos esqueléticos. Aquellas células ubicadas en la parte anterior del proscencéfalo migran a la rombómera dos (r2) y las ubicadas en un dominio posterior migrarán a las diferentes rombómeras (r4, r6, r8). Las células de la cresta neural (CCN) anteriores son diferentes de las posteriores dado que las primeras no expresan los genes Homeobox (HOX)¹⁰³.

El mesodermo formará la musculatura mandibular y la base craneal, mientras que el mesénquima derivado de la cresta neural formará el cartílago, huesos intramembranosos y tejidos conectivos de la cara¹⁰⁴.

Una familia de miembros de Dlx (Distal less) son de gran importancia para la formación de las prominencias maxilares y mandibulares. Muchos miembros de la familia Dlx son expresados para la determinación del primer arco faríngeo; entre estos se encuentran: Dlx1, Dlx2, Dlx3, Dlx7, Dlx 5 y Dlx6. Los únicos genes expresados en la prominencia maxilar son Dlx1 y Dlx2, mientras que en la prominencia mandibular se expresan Dlx1, Dlx2, Dlx3, Dlx7, Dlx5 y Dlx6. Otros genes que participan a nivel epitelial son el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) y la proteína morfogenética 4 (BMP4), Sonic Hedgehog (Shh) en el epitelio maxilar¹⁰⁵.

4.2 Palatogénesis

El desarrollo del paladar en humanos comienza alrededor de la quinta semana y termina en la duodécima semana de desarrollo intrauterino. Embriológicamente, inicia con la formación de dos primordios: el paladar primario y el secundario. Alrededor del día embrionario 10,5 en el embrión de ratón; 11,5 en rata (E10.5; E11.5 corresponde a la sexta semana de desarrollo en humanos), el paladar primario se origina por la unión de las prominencias nasales mediales en superficie y profundidad, que conformarán la porción premaxilar del maxilar superior, también llamada segmento intermaxilar¹⁰⁶. Esta porción tiene tres componentes en el humano: el labial, que formará el *filtrum* del labio superior; el maxilar, que corresponderá a la zona anterior del maxilar y formará los cuatro incisivos superiores y su mucosa bucal; y el componente palatino, que tiene forma triangular con el vértice dirigido hacia la parte posterior y dará origen al paladar primario⁹⁷.

A la sexta semana se establece la comunicación entre las cavidades nasal y oral, debido a la perforación de la membrana buconasal, y se formará la coana primitiva ubicada detrás del paladar primario. El paladar secundario comienza su formación alrededor de la séptima semana de desarrollo intrauterino en humanos (día embrionario E11 en ratón) con dos estructuras mesenquimatosas que se extienden desde las caras internas de las prominencias o maxilares. Estas prolongaciones reciben el nombre de procesos o crestas palatinas laterales y están conformadas en su interior por tejido mesenquimal y exteriormente están rodeadas de epitelio estratificado plano, cuya capa más superficial está formada por células peridérmicas¹⁰⁷.

Existen grandes grupos de genes involucrados en el desarrollo del paladar. Entre ellos están los genes HOXA-2 que tienen como función principal específica el destino de las células de la cresta neural del rombómero cuatro que constituirán el mesénquima del primer arco branquial. MSX1, PAX9, LHXO y DLX2 se han asociado a la regulación de la proliferación mesenquimal en el paladar. MSX 1 y PAX9 poseen una función en la regulación de la expresión de algunos miembros de la familia del Factor de crecimiento transformante beta (TGF β)^{106,108}.

Algunos factores de crecimiento están involucrados con el desarrollo del paladar y muchos de ellos pueden regular la expresión de genes Homeobox., entre los más estudiados son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), y otros miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes β (TGF β), activina β y su receptor, receptores α y γ del ácido retinoico y componentes de la vía de las endotelinas¹⁰⁸.

La morfogénesis del paladar secundario conlleva dos procesos. En primer lugar, se reorientan los procesos palatinos laterales verticales en una posición horizontal por encima de la lengua. Después se fusionan los procesos palatinos en la línea media ¹⁰⁹. La formación del paladar es de crítica importancia para la separación de la nasofaringe de la orofaringe. Cualquier alteración en los reguladores del desarrollo de este proceso puede producir paladar fisurado ¹¹⁰. Algunos de los genes relacionados con el LPH sindrómico están aquellos que codifican proteínas morfogenéticas ósea 4 (Bmp4), endotelina 1 (Edn 1), factor de crecimiento α (TGF α), Msx1, receptor relacionado con el polivirus 1 (Pvr11), p63 (Tcp1) y el interferón 6 (Irf6)¹¹¹.

Los modelos animales, especialmente los murinos han sido empleados para el estudio del paladar, dado que su morfología, y desarrollo son muy similares al desarrollo palatino en humanos¹¹².

La formación del paladar podemos dividirla morfológicamente en cinco etapas:

1. *Iniciación*: las crestas palatinas están en formación (tejido epitelial y ectomesénquima).
2. *Crecimiento vertical*: las crestas aumentan de tamaño y crecen en sentido vertical, lateral a la lengua.
3. *Elevación y crecimiento horizontal*: las crestas palatinas laterales se elevan y se ubican en posición horizontal arriba de la lengua. Puede que éstas se eleven al mismo tiempo; o por el contrario se puede encontrar una cresta

elevada y otra en posición vertical. Una vez se elevan, crecen en sentido transversal hasta encontrarse.

4. *Adhesión*: El epitelio de cada cresta está en contacto, este epitelio se denomina epitelio del borde medial (EBM)
5. *Fusión*: el EBM se desintegra.

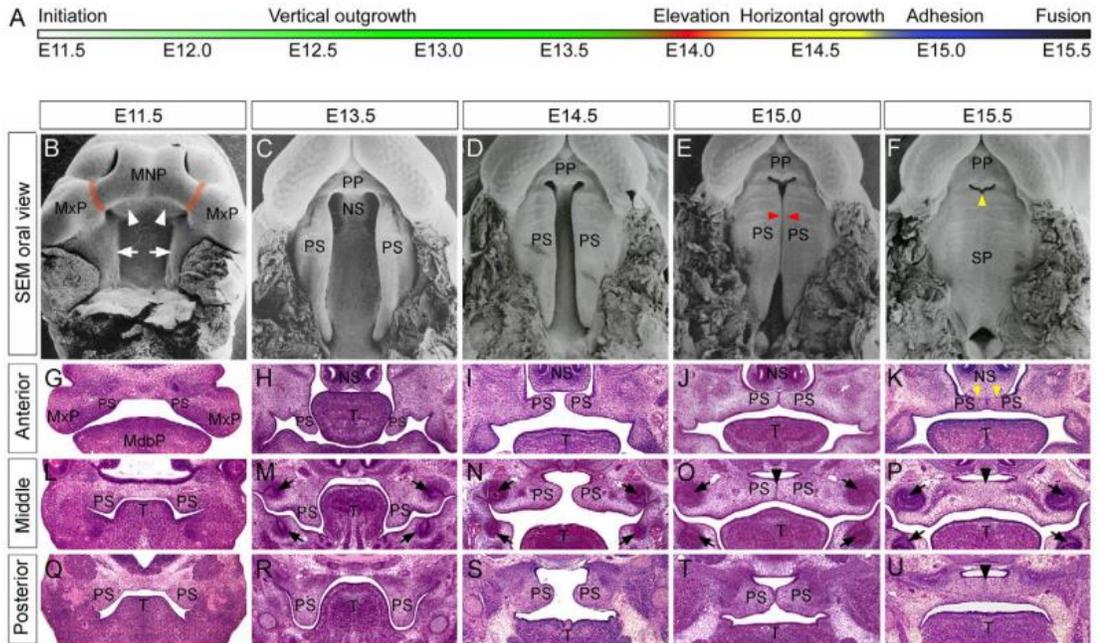


Figura 3. Palatogénesis en el ratón. Imagen tomada de: Bush, J. O.; Jiang, R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development ¹¹². En la figura se observan las etapas de desarrollo del paladar desde el estadio (E) 11.5 a 15.5, en la primera fila se muestran por microscopía electrónica de barrido las crestas palatinas laterales (PS), la prominencia frontonasal (MNP), prominencias maxilares (MxP) en sentido antero-posterior. De la segunda a la cuarta fila se muestran los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, en sentido coronal del paladar, se observan cada una de las etapas anteriormente descritas: iniciación, crecimiento vertical, elevación, crecimiento horizontal, adhesión y fusión. Además se observan los cortes anterior, medio y posterior del paladar.

4.2.1 Morfología del paladar

Para la comprensión de las diferentes etapas de la palatogénesis es necesario conocer la morfología del paladar primario y secundario embrionarios.

El paladar primario, está conformado por el segmento intermaxilar. En el humano formará los cuatro incisivos anteriores, y en los murinos estarán los gérmenes dentales de los incisivos, rodeados por tejido mesequimal y tejido epitelial bordeando las crestas palatinas (**Figura 4 y 5**).

El paladar secundario, anatómico, formará el paladar duro y el paladar blando. El paladar duro se observa histológicamente en cortes a la altura del paladar medio, y el paladar blando corresponde a cortes de paladar posterior. A nivel histológico el paladar duro, en la octava semana de desarrollo en humanos y el día E12 en murinos, está conformado por un tejido mesenquimal rodeado por tejido epitelial. Este tejido mesenquimal tiene a su vez células de la cresta neural que permitirán la diferenciación de los tejidos dentales y el componente esquelético del paladar.

El tejido epitelial es un epitelio plano estratificado (**Figura 6 y 7**), sin embargo, son pocas las capas celulares que este presenta. La capa más superficial del paladar tiene unas células, denominadas células peridérmicas, las cuales son de vital importancia para guiar el proceso de apoptosis necesario en el cierre de la estructura palatina, además se ha evidenciado que estas células migran a la cavidad oral y nasal ¹⁰⁷.

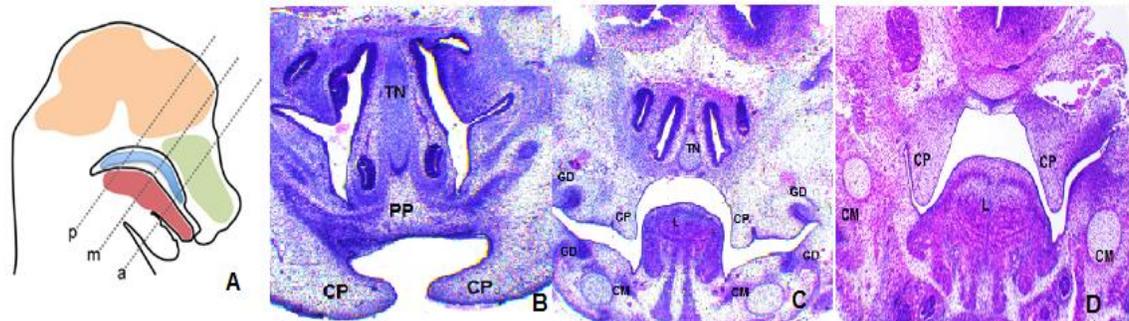


Figura 4. Morfología palatina, paladar anterior, medio y posterior. A. Vista lateral de cabeza de rata y dirección de los cortes coronales presentados en las imágenes B, C y D (imagen tomada de Gkantidis N, Blumer S, Katsaros C, Graf D, Chiquet M. ¹¹³ *Imágenes B-D obtenidas en el laboratorio de histología de la Universidad del Valle.* (a) anterior, (m) medio y (p) posterior. B-D Cortes coronales con hematoxilina eosina de paladar de rata Wistar en estadio E 16.5, aumento 4X. B. Paladar primario (PP) se observan las crestas palatinas laterales (CP), y el tabique nasal (TN). C. Paladar medio, se observa el paladar secundario (CP), los gérmenes dentales (GD), lengua (L) cartílago de Meckel (CM). D. Paladar posterior.

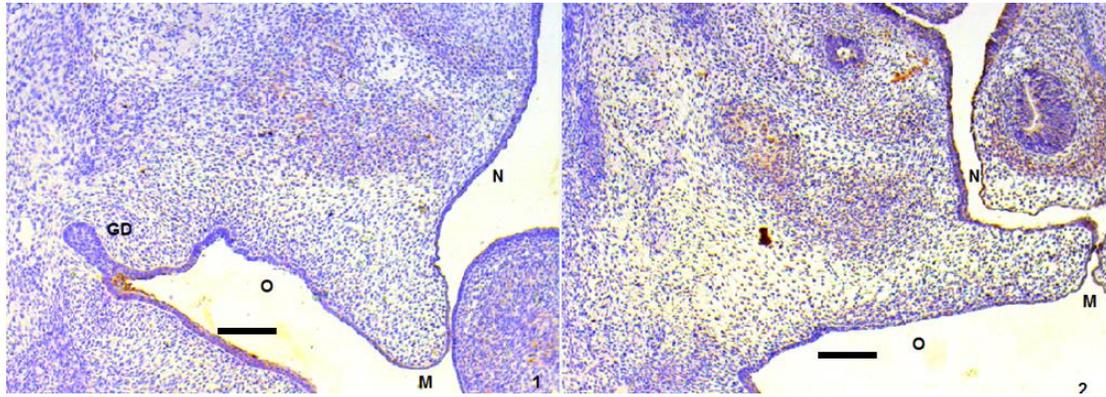


Figura 5. Morfología de las crestas palatinas de rata Wistar. Aumento 10x. 1. Imágenes obtenidas en el laboratorio de Histología de la Universidad del Valle. Etapa de iniciación, cresta palatina lateral a la lengua. Se observa el epitelio plano estratificado que rodea a la cresta en toda su extensión; epitelio nasal (n), epitelio medial (m), epitelio oral (O), germen dental (GD). 2. Etapa de elevación. Barra 150 μ m.

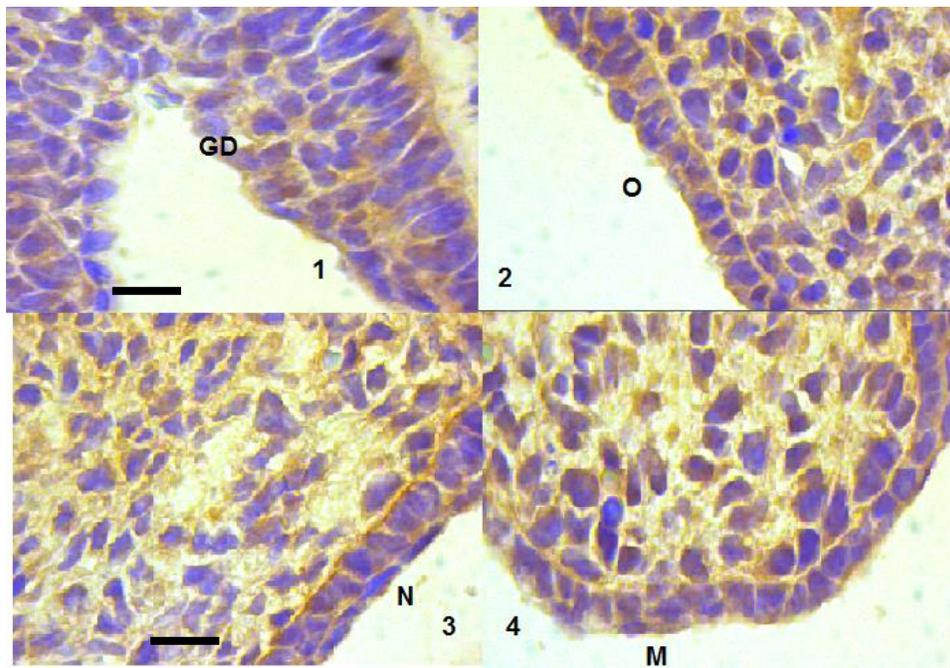


Figura 6. Epitelio del paladar fetal de rata Wistar, etapa de crecimiento vertical. Aumento 100x. Imágenes obtenidas en el laboratorio de Histología de la Universidad del Valle. 1. Epitelio germen dental (GD); se observa un epitelio plano estratificado, formado por 5-6 capas de células. 2. Epitelio oral (O), (3) Nasal (N), (4) Medial (M): formado por 2- estratos celulares, la células basales presentan un

a morfología cuboidal, con núcleo redondeado y una capa superficial de células peridermicas ., Barra: 20 μ m

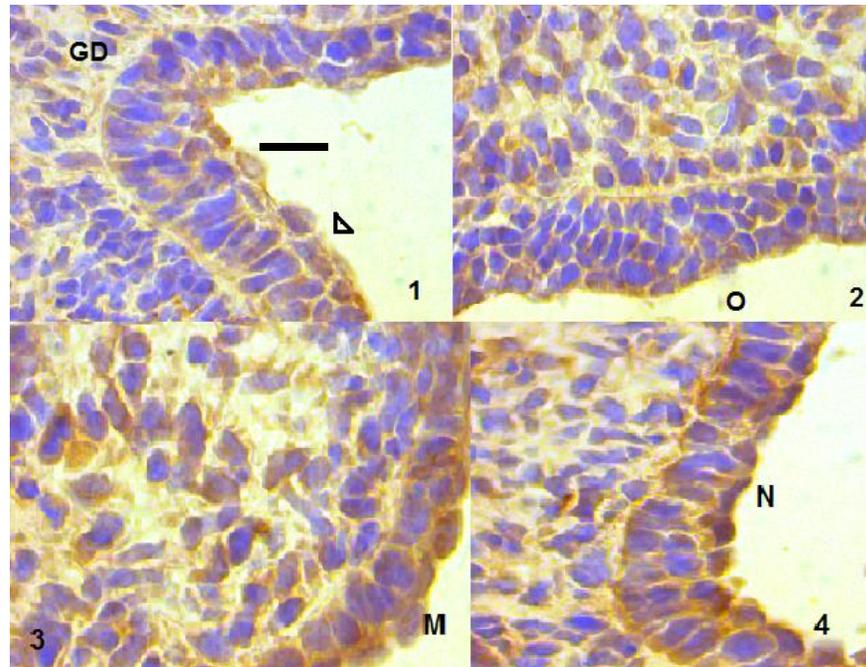


Figura 7. Epitelio del paladar fetal de rata Wistar, etapa de elevación. Aumento 100x. *Imágenes obtenidas en el laboratorio de Histología de la Universidad del Valle.* En todas las zonas de epiteliales que rodean la cresta palatina se observaron células epiteliales planas superficiales, conocidas como células peridermicas. 1. *Epitelio germen dental (GD)*; se observa un epitelio estratificado plano, 4-5 estratos aproximadamente. 2. *Epitelio oral (O)*, aumentan los estratos celulares comparado con el estadio de elevación, de 4-5 capas celulares, 3. Epitelio medial (M), Continúan los dos estratos celulares de células epiteliales cúbicas en el estrato basal y células peridermicas superficiales. 4. Epitelio nasal (N). Aumenta el número de estratos celulares, se observan de 3-4 aproximadamente. Barra: 20 μ m

La correcta fusión de paladar implica, que cada una de las etapas involucradas ocurran en el periodo establecido; en ratón el inicio de la formación del paladar (iniciación) se da en el día 11 y finaliza en el día 15.5 ¹¹². En rata, se estima que los procesos ocurren un día después que en ratón, por lo cual la fusión completa del paladar se debe de dar en el día 16 aproximadamente. ^{114,115}.

Varias teorías se han propuesto sobre la elevación y fusión del paladar. Algunas de las teorías relacionadas con el mecanismo de elevación de las crestas palatinas establecen la participación de factores extrínsecos e intrínsecos; entre los factores extrínsecos se cuenta por ejemplo el descenso de la lengua ¹¹⁶⁻¹¹⁸, el levantamiento de la cabeza del pecho permitiéndole a la lengua caer como resultado de la contracción de los músculos del cuello y crecimiento en longitud de las vértebras cervicales ^{119,120}; y entre los factores intrínsecos se relacionan los que ocurren por la interacción de los componentes básicos de células mesenquimales, matriz extracelular y el epitelio del borde medial; entre estos factores se encuentra el acortamiento de las fibras elásticas ^{119,121}, la contracción del colágeno sintetizado ¹²² e hidratación y la expansión funcional de las matrices. ¹²³.

El empleo de biomodelos para la investigación sobre el desarrollo del paladar han permitido un mayor conocimiento de los genes que participan en el desarrollo palatino, además de la identificación de las células y matriz extracelular involucradas en cada una de las etapas. ^{29,30,113,124,125}.

4.3 Metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores endógenos en el desarrollo del paladar

Las metaloproteinasas (MMPs) son un grupo de endopeptidasas dependientes de zinc, encargadas de regular la composición de la matriz extracelular, la proliferación, diferenciación y muerte celular. Participan en condiciones normales (como implantación del blastocisto, desarrollo embrionario, palatogénesis, ciclo endometrial, cicatrización, angiogénesis, etc) y en condiciones patológicas (destrucción tisular: artritis reumatoidea, osteoartritis, cáncer, metástasis, enfermedades fibróticas, etc.). Son secretadas como zimógenos inactivos e inhibidas por los inhibidores endógenos TIMPs. Un correcto balance entre MMPs/TIMPs es responsable de regular la actividad de las mismas; así las condiciones patológicas se pueden entender cuando hay una desregulación de las mismas en diferentes condiciones ^{126,127}.

4.3.1 Estructura y función

La estructura química fundamental de las MMPs se describe en la **tabla 3** y en la **figura 8**.

Domino	Función
Péptido señal	Conformado por 17 a 20 residuos de aminoácidos

	hidrofóbicos, sirve como señal para el paso del retículo endoplasmático a la exportación de la célula.
Dominio propérido	De 80 a 90 residuos de aminoácidos, con residuos de cisteína, interactúa con el átomo de zinc catalítico. La remoción de este dominio resulta en la activación del zimógeno.
Dominio catalítico	Alrededor de 170 aminoácidos. Presenta dos iones de zinc al menos un ión de calcio. El ion de zinc catalítico es esencial para la actividad de las MMPs.
Repeticiones tipo fibronectina	Estas estructuras especializadas se unen la enzima a la gelatina y sustratos de colágeno.
Dominio tipo hemopexina	Alrededor de 210 aminoácidos. Juega un papel importante en la unión al sustrato y/o las interacciones con los TIMPs.
Extensiones de inserción a membrana	Las MT-MMPs tienen un dominio c-terminal conformado por 80 a 110 residuos de aminoácidos, permitiendo la unión a la membrana celular

Tabla 3. Estructura de los dominios y la función de las MMPs¹²⁶.

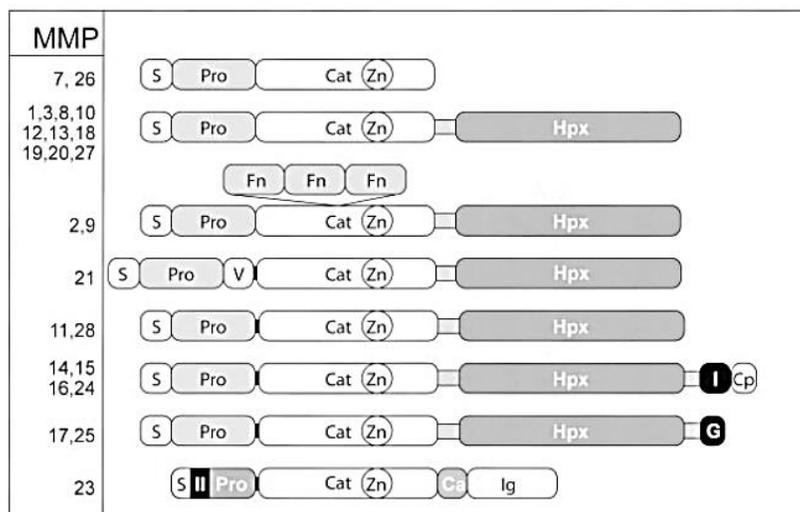


Figura 8. Dominios de las MMPs. Tomada de: Visse R, Nagase H, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases, Structure, Function and Biochemistry*, 2003 ¹²⁸. S: Péptido señal. Pro: propérido; Cat: dominio catalítico; Zn: sitio de zinc activo; Hpx: dominio de hemopexina; Fn: dominio de fibronectina; inserto de vitronectina; I: dominio transmembrana tipo I; dominio transmembrana tipo II; GPI: ancho GPI; Cp: dominio citoplasmático; Ca: región de

cisteína e IgG. Sitio de unión es esquematizado como una banda negra entre el propéptido y el dominio catalítico¹²⁸.

En la actualidad se han identificado alrededor de 24 tipos de MMPs en los vertebrados, y 23 son encontradas en los humanos. Se clasifican en varios grupos, dependiendo de la organización de su secuencia y dominios, y la afinidad específica a los sustratos de la MEC¹²⁸.

Las colagenasas (MMP-1, -8, -13 y -18) tienen como característica la afinidad para degradar colágenos intersticiales tipo I, II y III. Las gelatinasas, representadas por la gelatinasa A (MMP-2) y B (MMP-9), cuyo sustrato principal es el colágeno desnaturalizado, o gelatina. Las matrilisinas, se caracterizan por la ausencia del dominio de hemopexina, entre estas están la MMP-7 (matrilisina 1), y MMP-26 (matrilisina 2). Las MMPs tipo membrana, cuya característica principal es que permanecen ancladas a la membrana de la célula que las produce y digieren diferentes moléculas de la MEC, como el colágeno tipo I, II o III. Este grupo está conformado por 6 tipos de MT-MMPs; 4 son proteínas tipo I transmembrana (MMP-14,-15,-16 y -24) y dos son proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MMP-17 y -25). En el grupo de las estromelinas están la MMP-3 (estromelina 1) y estromelina 2 (MMP-10). La MMP-3 activa una variedad de pro-MMPs. Por último, existen otro tipo de MMPs que no pueden ser clasificadas en los grupos anteriores, ya que su estructura y afinidad a los sustratos es muy específica; como es el caso de las MMP-20 o enamelisina que digiere la amelogenina, localizada principalmente en el esmalte dental.

4.3.2 Grupo de las gelatinasas

4.3.2.1 Gelatinasa A (MMP-2, Colagenasa tipo IV)

La MMP-2 ha sido purificada de diferentes fuentes como las células tumorales¹²⁹, hueso de conejo¹³⁰, piel humana¹³¹ y encías humanas¹³². Collier et al, reportó la secuencia completa de la enzima humana excepto por el péptido señal. La estructura química de la enzima tiene dominios de fibronectina tipo II insertados en el dominio catalítico, que permiten la unión a los sustratos de gelatina¹³³. La MMP-2, también llamada colagenasa IV, se une a los colágenos (tipo I, II, III, IV, V, VII, X y XI), gelatina, elastina, fibronectina, vitronectina, laminina, entactina, tenascina, SPARC, agrecano, versicano, decorina, y la proteína básica de mielina^{128,134}.

4.3.2.2 Gelatinasa B (MMP-9, colagenasa tipo V)

En 1972, Harris and Krane descubrieron que el fluido sinovial reumatoideo presentaba actividad gelatinasa, que en retrospectiva se trataba de MMP-9. Sopata et al encontraron actividad gelatinasa en los leucocitos polimorfonucleares humanos¹³⁵. Los macrófagos de los conejos también presentaban una enzima que degradaba el colágeno tipo V¹³⁶. En 1983 se realizó la purificación¹³⁷ y en 1989 la secuenciación del cDNA¹³⁸. La unión del TIMP-1 con la pro-MMP-9 forman un complejo que regula la activación y la forma activa de la MMP-9¹³⁹. La MMP-9 tiene afinidad por el colágeno (tipo IV, V, XI, y XIV), gelatina, elastina, vitronectina, laminina, SPARC, agrecano, vesicano, decorina y proteína básica de mielina^{128, 134}.

4.3.3 Regulación de la activación de las MMPs

La actividad de las MMPs se regula en diferentes etapas: transcripcional, post-transcripcional, y controlado a nivel de sus activadores, inhibidores y/o localización de la superficie celular. En condiciones normales en los tejidos adultos están en niveles bajos, y en algunas excepciones, su actividad se mantienen en niveles indetectables. La actividad de las MMPs es regulada rigurosamente, ya que necesitan estar presentes en los tipos celulares específicos, en localización pericelular en el tiempo justo y en la cantidad adecuada. Un desbalance entre el control de su actividad conllevará a diferentes enfermedades.

Las MMPs también son reguladas por la activación de los precursores zimógenos y la inhibición de sus inhibidores endógenos (TIMPs). La mayoría de las MMPs tiene una activación a nivel extracelular regulada por una cascada proteolítica que puede ser iniciada por otras MMPs ya activadas o por serin-proteasas. Es por esta razón que cualquier desbalance entre MMPs y TIMPs contribuye a alteraciones patológicas como enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes y metástasis^{126,134,140}

La actividad de las MMPs puede a su vez, ser inhibida por inhibidores sintéticos que contienen generalmente un grupo quelante que se une al átomo catalítico de zinc. Entre los grupos quelantes se incluyen los hidroxamatos, carboxilatos y tioles. La regulación a nivel transcripcional es clave, ya que muchos genes de MMPs son expresados solo cuando la remodelación tisular activa fisiológica o patológica toma lugar¹⁴¹.

4.3.4 Inhibidor tisular de las metaloproteinasas 2 (TIMP-2)

La inhibición de las MMPs se da por la interacción del sitio de zinc activo o por la unión de la enzima activa o la unión a un complejo no activo. Los TIMPs son proteínas secretadas, pero se pueden encontrar en la superficie celular asociadas a proteínas de unión a la superficie celular.

Cuatro clases de inhibidores de las MMPs están presentes en los espacios extracelulares y en los fluidos corporales, los más relevantes son los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), proteínas de 20 a 30 kDa que interactúan de manera directa con las MMPs uniéndose al sitio activo por medio de un pequeño número de aminoácidos. Actualmente están descritos cuatro TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, los mismos poseen la capacidad de inhibir todas las MMPs, siendo TIMP-1 preferente inhibidor de MMP-9 y TIMP-2 de MMP-2^{142,143}. Se encuentran expresados en todos los tejidos y mayoritariamente son regulados de manera conjunta con las MMPs. Los TIMPs pueden encontrarse secretados, o estar unidos a la membrana celular asociadas con proteínas de unión a membrana.

El TIMP-2 fue detectado en los queratinocitos migrando en las cicatrices humanas y se creyó parcialmente que era producido por estas células¹⁴⁴. Tiene actividad potencializadora eritroide y estimula el crecimiento de las células de linfoma^{134,145}. El TIMP-2 tiene doble efecto sobre la MMP-2; por un lado la MT-MMP media la activación de la pro-MMP-2 requiere una relación estequiométrica de 1:1 de TIMP-2 para permitir su activación; y a altas concentraciones la inhibe. Se conoce que el TIMP-2 inhibe todos los miembros de las MMPs¹²⁶.

La matriz extracelular juega un papel fundamental en el desarrollo normal del paladar. En los últimos quince años, las investigaciones realizadas sobre la reorientación de las crestas palatinas establecen que la expansión de las crestas es modulada por diferentes componentes de la matriz extracelular como el colágeno tipo I, II y III, el ácido hialurónico y la fibronectina, los cuales van a variar en relación a su composición durante el proceso y se relacionarán con cambios en su morfología. El colágeno III y la fibronectina desaparecen en porciones de regiones del mesénquima medial y central y el ácido hialurónico se convierte en el componente principal de la matriz extracelular (MEC) en estas regiones. Estos cambios se pueden relacionar con una disminución de la síntesis o un aumento de la degradación de la matriz^{146,147}. El mantenimiento y la degradación de esta MEC son mediados en parte por MMPs y TIMPs.¹⁴⁸

Los modelos murinos han sido ampliamente empleados para el estudio de la palatogénesis, y se ha encontrado la participación de diferentes MMPs como la MMP-2,-3, -9-13,-25 ADAMTS9 y ADAMTS20 y TIMPs en diferentes estadios del desarrollo del paladar.^{29,30,86,113,124,146,147,149}

Los estudios en humanos son escasos y se ha encontrado asociación de polimorfismos en el gen de MMP-3, TIMP-2 y el labio y paladar hendido no sindrómico.¹⁵⁰ Estudios recientes muestran la participación de las MMPs en el estadio embrionario 14,5 de ratón alrededor de los pliegues epiteliales laterales de la cavidad nasofaríngea, generados como consecuencia de la elevación del paladar, cambios que darán origen a la reorientación de los procesos palatinos por encima de la lengua. La expresión de las MMPs también fue detectada en la membrana basal (especialización de la MEC) adyacente al epitelio del borde medial, permitiendo la transdiferenciación del epitelio en mesénquima¹¹³, proceso necesario para que ocurra la fusión completa del paladar secundario.

Estudios realizados en embriones de ratón muestran que los TIMPs se expresan de manera diferencial durante la formación del paladar secundario. TIMP-1 se expresa en tejidos en osteogénesis, como la mandíbula y la maxila, encontrándose ausente en el epitelio y el mesénquima. Mientras que TIMP-2 se expresa en el mesénquima del paladar.

Estos antecedentes indican que la organogénesis y morfogénesis del paladar implican la participación de MMPs y sus inhibidores, principalmente TIMP-2. Así, cambios en la expresión de estos regulares podrían generar alteraciones en las estructuras labiopalatinas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en las crestas palatinas de rata Wistar en estadio E16.5 en un modelo experimental de obesidad materna adquirida por dieta.

5.2 Objetivos específicos

En fetos estadio 16.5 procedentes de rata normopeso y obesa:

1. Establecer medidas lineales de puntos blandos tercio medio e inferior facial
2. Determinar cambios en el estadio de la palatogénesis
3. Caracterizar el patrón de expresión proteica de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el epitelio de las crestas palatinas
4. Caracterizar el patrón de expresión proteica de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el mesénquima de las crestas palatinas

6. Planteamiento de la hipótesis

- a. Las diferencias morfológicas e inmunohistoquímicas presentes en el paladar de rata Wistar en fetos de rata nomopeso y obesa en el estadio E16.5 son significativas
- b. Las diferencias morfológicas e inmunohistoquímicas presentes en el paladar de rata Wistar en fetos de rata nomopeso y obesa en el estadio E16.5, no son significativas

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Tipo de estudio

Estudio experimental, realizado mediante el establecimiento de una dieta de cafetería para determinar la influencia de la obesidad materna adquirida por dieta sobre los cambios morfológicos e inmunolocalización de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el paladar fetal de rata Wistar en estadio E16.5.

7.2 Unidad de análisis

La investigación realizada se estableció con el biomodelo de la especie *rattus norvegicus*, cepa Wistar. La vida media estimada para el biomodelo es dos a tres años.

Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Especie
Animal	Chordata	Mammalia	Rodentia	Muridae	Rattus

Tabla 4. Especie rata Wistar, creada a partir del género *rattus*, para la investigación biomédica (Adaptado de tesis de grado, *Evaluación de Músculos sometidos a periodos de isquemia inducida y reperfusión: análisis histoquímico y morfométrico*, Doris Haydee Rosero Salazar, 2014¹⁵¹).

Este trabajo de investigación contó con el aval del Comité de Ética con Animales de Experimentación Biomedica de la Universidad del Valle. Los animales fueron 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).

Se utilizaron 8 ratas Wistar albinas hembras de 11 semanas de edad. Las hembras se dividieron al azar en dos grupos: 4 biomodelos grupo control (Ctrol) y 4 biomodelos grupo obeso (Ob). Los biomodelos fueron alimentados de manera diferencial durante dos meses, el grupo Ctrol recibió dieta estándar y el grupo Ob dieta de cafetería. Luego de este tiempo los biomodelos fueron puestos en apareo con 4 machos adultos sanos, luego de determinar su preñez fueron sacrificados al día 16.5 de gestación. Durante toda la fase experimental los biomodelos fueron mantenidos en el Bioterio de la Universidad del Valle, bajo condiciones de luz-

oscuridad (12-12 horas), temperatura (20^o-23^oC) y humedad 45%, controlada, en cubículos separados para cada uno de los grupos.

El grupo control fue alimentado con dieta estándar *Pellet Labdiet 5001* y agua *ad libitum*. El grupo obeso fue alimentado con dieta de cafetería, esta dieta consistió en un total de 19 alimentos (**Tabla 5**), donde se ofrecieron tres alimentos diarios, junto con la dieta estándar y agua *ad libitum*. La ingesta de los alimentos se monitoreó diariamente. Los parámetros murinométricos se evaluaron semanalmente, estos consistieron en peso del animal, longitud hocico-punta de cola y hocico-rabadilla.

En la figura 9 se muestra la distribución de los fetos en cada una de las fases: 1. Toma de medidas morfométricas, 2. Determinación de la morfología palatina, y detección de MMPs y TIMPs en el paladar por inmunohistoquímica.

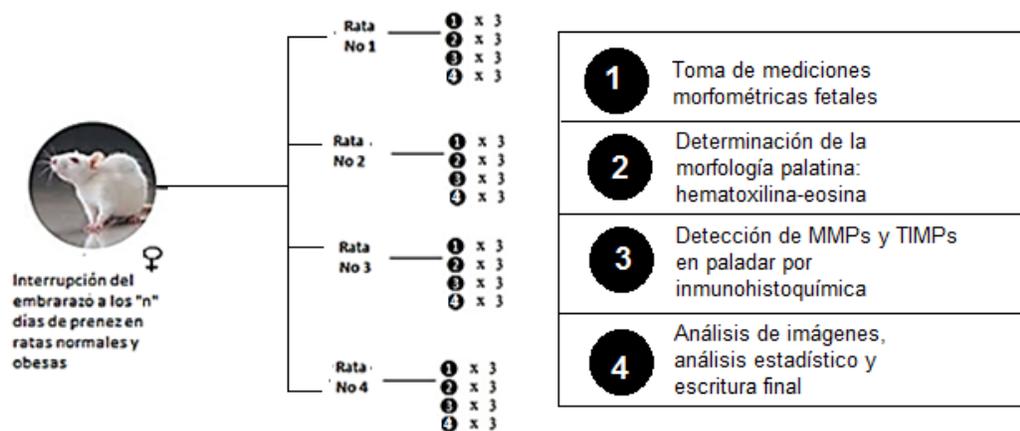


Figura 9. Proceso de asignación de fetos para cada fase de investigación. Cada número indica los procedimientos realizados en la cabeza fetal para cada grupo (Ctrl/Ob); indicando por el número 1; la toma de las medidas morfométricas, 2; la histología por H-E , 3 la detección de MMPs y TIMPs en el paladar por inmunohistoquímica y 4 el análisis de imágenes por densitometría óptica, análisis estadístico y escritura final .

7.3. Criterios de inclusión

- ✓ Fueron incluidos en el grupo control los biomodelos hembras que presentaron parámetros bioquímicos y mediciones morfométricas dentro del rango de normalidad.
- ✓ Fueron incluidos en el grupo experimental los biomodelos de obesidad que presentaron un peso mayor al 20 % comparado con la media de los animales controles.

7.4. Criterios de exclusión

- Animales que en el momento de la disección no presentaran implantaciones.
- Fetos que durante los procedimientos de fijación y corte presentaran daños en las estructuras maxilares.

7.5. Consideraciones éticas

El presente proyecto fue sometido al comité de ética animal de la facultad de Salud de la Universidad del Valle código interno 02-013, con fecha de aprobación 05/03/2013 (**Anexo 17.13**).

Todos los biomodelos fueron manejados de acuerdo a las normas éticas Nacionales e Internacionales reunidas en el Manual del Bioterio de la Facultad de Salud.

Los procedimientos que se emplearon durante el presente estudio no causaron sufrimiento a los animales de experimentación, ya que durante las etapas experimentales estuvieron bajo sedación profunda. Durante la permanencia en el Bioterio, el bienestar de los biomodelos fue continuamente supervisado por el grupo de trabajo con la ayuda del veterinario asignado.

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo teniendo presentes las normas de bioseguridad.

7.6 Diseño experimental

El desarrollo experimental se inició el mes de enero de 2013 hasta el mes de diciembre de 2014 en el laboratorio de Histología y en el bioterio de la Universidad del Valle.

El trabajo experimental se llevó a cabo en cuatro fases; la primera fase consistió en el establecimiento de la dieta de cafetería, la preñez de los biomodelos hasta el

día 16.5, eutanasia, disección de los fetos y fotografía de los mismos bajo estereomicroscopio (**Figura 10**).

En la fase 2 se llevó a cabo el procesamiento histoquímico, se realizó la disección, fijación, inclusión, corte y coloración de la cabeza fetal para el estudio histológico (**Figura 11**).

En la fase 3 se realizó la estandarización de los protocolos de inmunohistoquímica para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 para la cabeza fetal en estadio E16.5 (**Figura 12**).

En la fase 4 se realizó el análisis de imágenes, se realizó la toma de imágenes en el microscopio, toma de medidas lineales de tercio inferior facial, densitometría óptica de las crestas palatinas, análisis estadístico y escritura final (**Figura 13**).

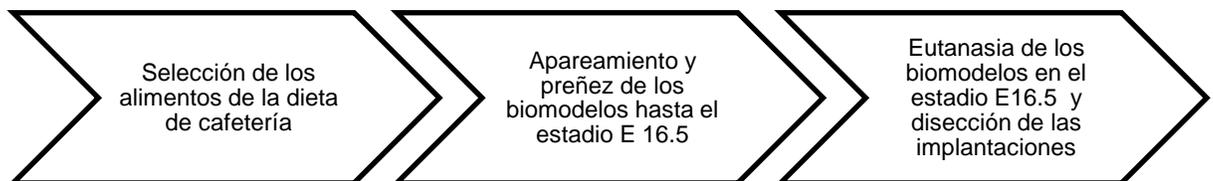


Figura 10. Fase I- Establecimiento de la dieta de cafetería



Figura 11. Fase II- Procesamiento histoquímico

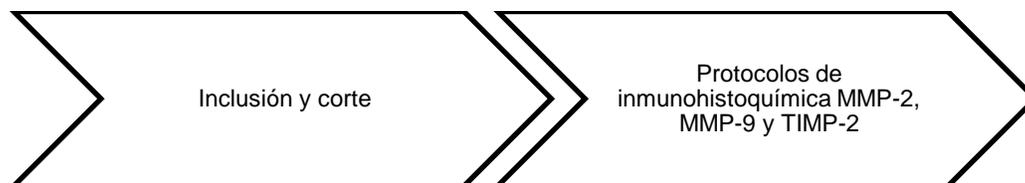


Figura 12. Fase III- Procesamiento Inmunohistoquímico



Figura 13. Fase IV- Análisis de imágenes, análisis estadístico y escritura final.

7.6.1 Fase I- Estandarización de la dieta de cafetería

El grupo control (n=4) recibió la dieta estándar cuya composición fue: 11,4% de grasas, 71,4% de carbohidratos, 17,2% de proteínas, con un valor energético de 18,4 kJ/g. El grupo de experimental (n=4) fue sometido a dieta de cafetería, compuesta por pasteles de chocolate, rosquillas, chocolate, pan, pasabocas de maíz. Esta dieta tuvo un valor energético de 19,5kJ/g, y fue compuesta por: 59,8% de grasas, 21,8% de carbohidratos y 18,4% de proteínas 39% (**Tabla 5**). Al inicio del modelo se realizó la toma de una muestra de sangre de las venas radiales de la cola de los biomodelos para obtener los valores iniciales de glucemia, colesterol y triglicéridos. Esta toma se repitió a los dos meses de cría con alimentación (Ctrl) y (Ob). Finalmente, al momento del sacrificio, se colectó sangre de la vena cava abdominal para realizar la determinación del estado metabólico materno (glicemia, colesterol y triglicéridos), los resultados fueron previamente publicados ¹⁵².

7.6.1.1 Organización de los cubículos y espacio físico

Los animales fueron organizados en cubículos diferentes, uno para el grupo control y otro para el grupo obeso. Cada cubículo contó con un temporizador para mantener las condiciones de luz-oscuridad 12/12 horas. Cada biomodelo se le asignó un código específico y fue mantenido en una jaula individual. A ambos grupos se les administró el Pellet Lab Diet 5001, junto con agua *ad libitum*. Al grupo obeso se adicionó tres alimentos de cafetería correspondiente a la lista de alimentos seleccionados (**Tabla 5**).



Figura 14. Organización del cubículo para el grupo control, cada biomodelo ubicado en una jaula individual, con Pellet y agua *ad libitum*



Figura 15. Organización del cubículo para el grupo experimental al que se le administró la dieta de cafetería. Cada biomodelo ubicado en una jaula individual. Con pellet y agua *ad libitum*. Adicional se administraban los alimentos correspondientes a la dieta de cafetería.

7.6.1.2 Toma de medidas morfométricas de los biomodelos del grupo control y grupo experimental

Las medidas morfométricas de los biomodelos fueron registradas con una regla milimetrada, la circunferencia abdominal fue evaluada con un metro neonatal y el peso corporal fue registrado con una pesa electrónica RADGAW. Estas medidas fueron realizadas por dos investigadores de manera independiente. Las medidas se registraron al inicio de la dieta y se continuó con su registro semanalmente hasta el final de la dieta. Las medidas de interés fueron: circunferencia abdominal (cm), longitud punta del hocico-rabadilla (cm), punta del hocico-punta de cola (cm), toma del peso (g). (Ver figura 16).

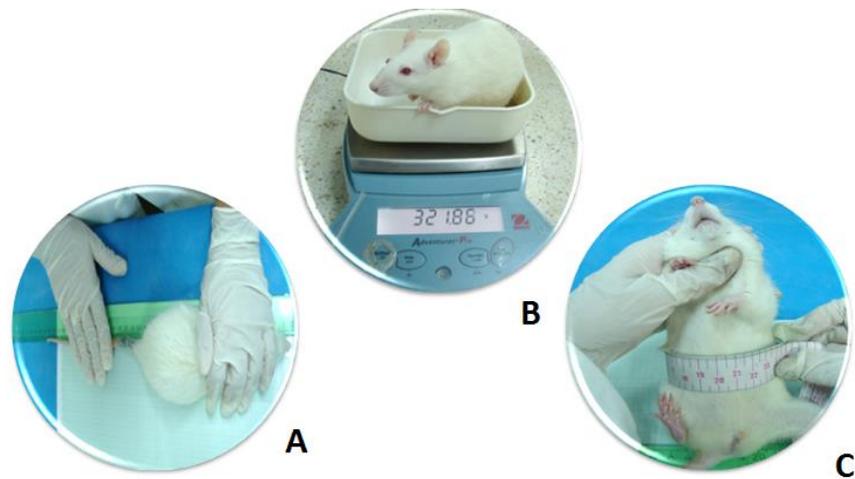
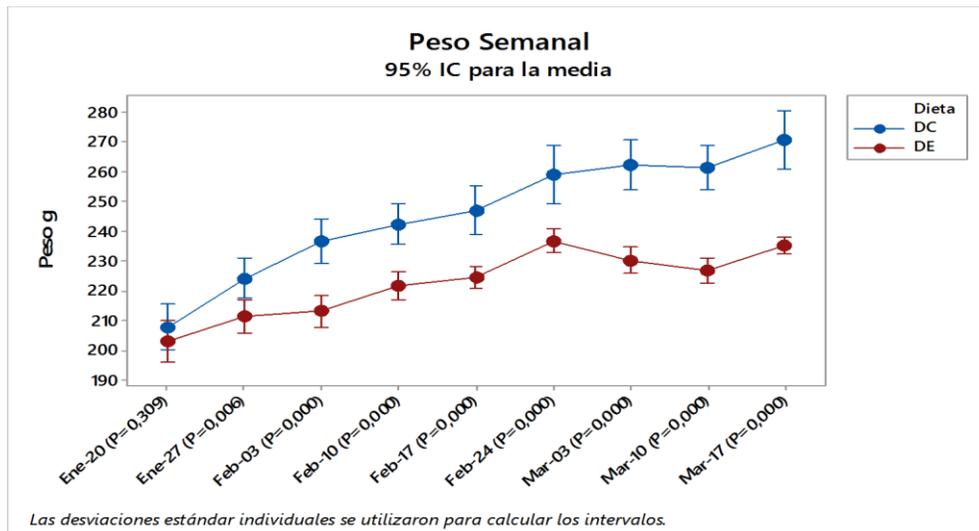


Figura 16. A. Toma de medidas morfométricas punta de nariz-rabadilla, punta de nariz-punta de cola. B. Toma del peso en balanza digital. C. Toma de circunferencia abdominal

7.6.1.3 Administración de la dieta de cafetería

El peso inicial del alimento suministrado y el alimento no consumido fue registrado con el fin de determinar el alimento consumido. La dieta se estableció por ocho (8) semanas y se determinó el aumento de peso del grupo experimental para proceder con los apareamientos.



Dieta	Peso Inicial					Dieta	Peso Final				
	Promedio	DE	Mínimo	Máximo	CV		Promedio	DE	Mínimo	Máximo	CV
DC	208,1	10,8	193,4	232,7	0,05	DC	270,9	13,8	248,7	296,1	0,05
DE	203,3	8,2	195,7	215,7	0,04	DE	235,5	3,5	231,9	240,8	0,01

Figura 17. Aumento de peso para el grupo de la dieta de cafetería (DC) y dieta estándar (DE). Para un peso inicial de 208.1 gramos y final de 270.9 gramos para los biomodelos del grupo Ob, comparado con un peso inicial de 203.3 gramos y 235.5 gramos final para el grupo Ctról.

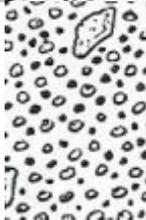
Tabla 5. Lista de alimentos suministrados incluido pellet y dieta de cafetería

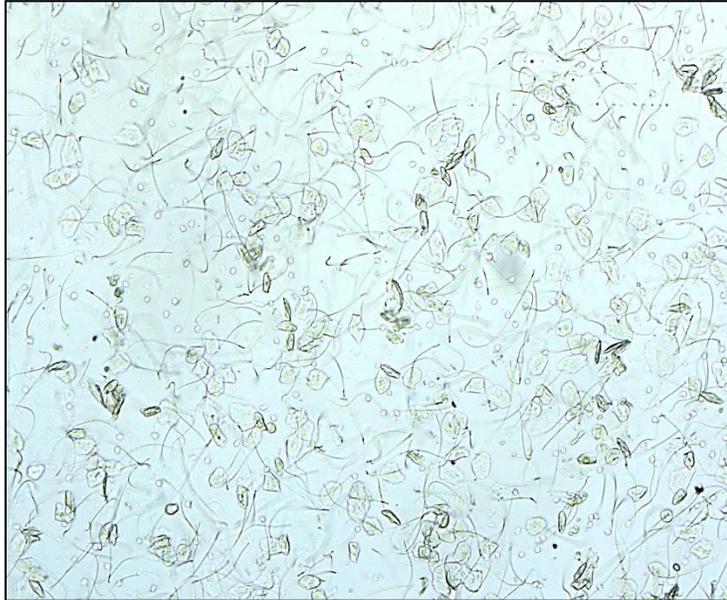
Código	Alimento	Nombre comercial	Porción	Calorías	Grasa Total	Grasa saturada	Colesterol	Carbohidratos	Azúcares	Proteínas	Sodio
Total	Pellet	Lab diet 5001	-	2.91kcal/gm	13.427 %	-	209ppm	56.774%	-	25%	0.39 %
1	Pasabocas maíz	Chonticos	22g	120cal	8g	3g	0mg	10g	3g	2g	170 mg
2	Chocolatina	Chocolatina Jet	36g	200kcal	13g	7g	0 mg	20g	18g	2g	25 mg
3	Queso crema	Colanta	100g	300cal	-	-	-	-	-	-	-
4	Rosquillas	Rosquillas caleñas	15g	65 cal	17,5g	10g	5 mg	10,5g	0g	1,5g	245 mg
5	Galletas con crema	Galletas festival	33,6 g	150 cal (610 KJ)	5g	2g	0mg	24g	13 g	2g	60 mg
6	Brownie	Brownie Bimbo Mr Brown	25 g	100kCal		3g	30mg	15g	9g	1g	40 mg
7	Pasabocas de queso	Cheese tris	20g	100cal	5g	0g	0mg	13g	0g	1g	120 mg
8	Salchicha	Rica	1 unidad	210cal	14g	6g	50mg	12g	0g	10g	890 mg
9	Jamón										
10	Tocinetas	Tocinetas Fred	13g	50cal	2g	1g	0mg	7g	0g	1g	120 mg
11	Galletas de soda	Galletas saltín Noel	29g	120 cal	2.5g	1g	0mg	23g	0g	2g	370 mg
12	Pastel de chocolate	Chocorrano	70 g	300 cal	16g	13g	-	34g	16g	6g	130 mg
13	Galletas de maíz	Galletas Saltín Noel Trigo y Maíz	24g	100cal	4g	1,5g	0mg	15g	0g	2g	240 mg
14	Cereal	Fruti Boli	30g	391.10kcal	0.26%	-	0mg	91.98%	-	5.21%	-
15	Pasabocas de Maíz salado	Yupis	10g	50 cal	2.5g	1g	0mg	7g	1g	<1g	100 mg
16	Pasabocas de maíz dulce	Snacky Colombiana	40g	220cal	12g	6g	0mg	27g	0g	2g	100 mg
17	Papas fritas	Rizadas	30g	170 cal	11g	5g	0mg	15g	15g	2g	190 mg
18	Palomitas de maíz	Palomitas de caramelo Yupi	20g	90 cal	2.5g	1g	0mg	16g	9g	1g	65mg
19	Pan	Paniques	26g	92cal	2.2g	0g	0mg	34.5g	0g	2.7g	141 mg

7.6.2 Apareamiento, preñez y eutanasia de los biomodelos hasta el estadio E16.5

Los murinos son animales poliéstricos, sus ciclos duran entre 3-5 días aproximadamente. Dicho ciclo está conformado por cuatro fases: estro, metaestro, diestro y proestro (**Tabla 6**). Dichas fase pueden ser identificadas mediante citología vaginal. En la noche del proestro, previa a que la hembra entre en celo, se puso en apareo con el macho. (**Anexo 17.2**). A la mañana siguiente se realizó nuevamente una citología vaginal para la confirmación de la preñez por medio de la observación de espermatozoides en el extendido vaginal. A este día se lo denominó día 0,5 de preñez. (**Figura 18**).

Tabla 6. Características del ciclo estral de la Rata Wistar

Estro	Labios engrosados Vagina seca	Gran cantidad de células epiteliales queratinizadas (placas o escamas cornificadas sin núcleo visible) y unas pocas células nucleadas		Calor sexual o celo (Aceptación del macho)	12 h
Metaestro	Labios Ligeramente hinchados Masa Caseinosa en la vagina	Buena cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales queratinizadas		Ovulación No hay calor sexual (no hay aceptación del macho)	21 h
Diestro	Labios normales (no hinchados ni engrosados) Mucosa vaginal húmeda	Gran cantidad de leucocitos, muy pocas células queratinizadas y a veces algunas células nucleadas		No hay calor sexual (no hay aceptación del macho)	65 h
Proestro	Labios ligeramente hinchados Vagina seca	Gran cantidad de células epiteliales nucleadas y unos muy pocos leucocitos		Puede ocurrir calor sexual puede haber Aceptación del macho)	12 h



Figura

18. Extendido vaginal en fresco, se observa presencia de espermatozoides. Día 0,5 de preñez.

7.6.2.1 Sacrificio de los biomodelos y disección del útero

Todos los procedimientos se realizaron en las horas de la mañana (7-9 am), antes del inicio de la sedación las medidas morfométricas fueron registradas. Posteriormente cada biomodelo fue posicionado en una caja acrílica y se le administró anestesia inhalatoria con Isoflurano al 100% (Isoflurano USP-Baxter), por 15 minutos aproximadamente. Luego, el sacrificio del biomodelo fue confirmado por la ausencia de signos vitales, cese de la respiración, ausencia de latidos cardiacos, ausencia de reflejo podal corneas opacas y relajación de esfínteres. Se procedió a la disección del útero y de cada uno de los fetos. (**Figura 19 y anexo 17.3**). Una vez finalizado los procedimientos de toma de muestras, se dispuso el animal en una bolsa plástica roja debidamente rotulada en congelador y luego fue entregado a la ruta hospitalaria de acuerdo a la normatividad de la OMS y el programa de Salud ocupacional de la Universidad del Valle, de acuerdo al manejo de desechos biológicos y recolección de desechos patológicos.



Figura 19. Disección de biomodelo en estadio E16.5 y extracción del útero con implantaciones. A. Para realizar la disección abdominal el biomodelo fue ubicado en posición cubito dorsal. B. Cavity abdominal, exposición de las implantaciones marcadas con asterisco (*). C. Útero bicorneo con once (11) implantaciones.

7.6.3 Fase II- Procesamiento histoquímico

Una vez realizada la disección del útero, se posicionó en una placa de Petri con solución salina y procedió a contabilizar el número de implantaciones y se asignó un código a cada uno. Se retiraron los ovarios y posteriormente se realizó la disección de cada uno de los fetos retirando la placenta y membranas fetales. Cada uno de los fetos y placenta fueron pesados respectivamente en balanza digital RADWAG, y posterior los fetos fueron fotografiados bajo esteromicroscopio MEIJI Techno con cámara Infinity 1, colocando un papel milimetrado debajo de la placa de Petri, en cuarto oscuro (**Figura 20**).

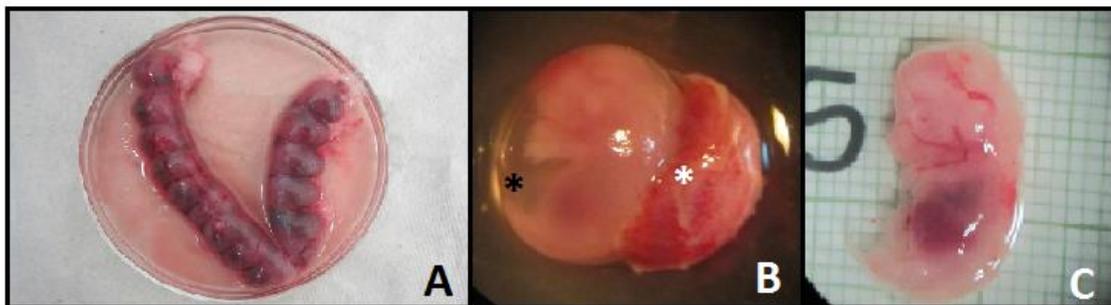


Figura 20. Disección de los fetos de rata Wistar en estadio E16.5.

A. Útero bicorneo con quince (15) implantaciones. B. Feto marcado con asterisco (*) color negro dentro del saco amniótico, y placenta marca con asterisco blanco (*). C. Feto vista lateral izquierda.

Los fetos fueron colocados individualmente en placas de Petri con solución fisiológica identificadas con el código correspondiente y papel milimetrado de fondo. Las imágenes fueron tomadas en aumento de 10X, con el programa INFINITY ANALIZE (**Anexo 17.4**). Un total de 122 imágenes sagitales derechas e izquierda fueron obtenidas de todos los fetos, se almacenaron en carpetas individuales indicando el código del biomodelo madre, el grupo (CTRL/OB) y el estadio E16.5. La Tabla 7 describe los parámetros utilizados para la toma de imágenes fetales.

Tabla 7. Parámetros de la toma de imágenes

Parámetro	Valor
Exposición	16.97 ms
Intensidad Promedio	102
Ganancia	1.46875
Gamma	1
Luz	Halógena
Saturación	0,67
Matiz	75
Brillo	-29
Contraste	-36

7.6.3.1 Disección, fijación e inclusión en parafina de la cabeza fetal de rata Wistar estadio E16.5

Los fetos fueron posicionados en una placa de Petri, en solución fisiológica, y con cuchilla de micrótopo se realizaron las disecciones de las cabezas (**Figura 21**), las cuales se fijaron en paraformaldehído (PLP) por 24 horas a temperatura de 4°C. Posterior a la solución de PLP, las cabezas fetales fueron divididas en dos grupos:

1. Cabezas fetales para estudio histoquímico con hematoxilina – eosina. Se fijaron en solución de Bouin por 12 horas y se realizó 5-8 lavados en alcohol al 70%, y se refrigeraron a 4°C en nevera SANYO Labcool (**Anexo 17.6**).
2. Cabezas fetales para estudio por inmunohistoquímica de las proteínas MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, se fijaron en alcohol al 70% y se refrigeraron en a 4°C en nevera SANYO Labcool.

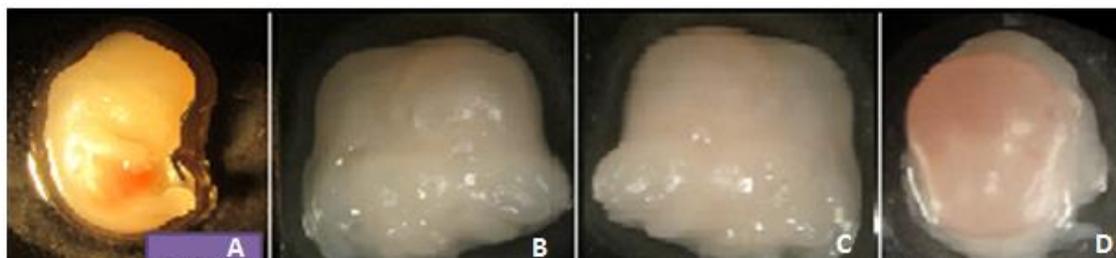


Figura 21. Disección de la cabeza fetal de rata Wistar en estadio E16.5.

Vista lateral derecha del feto completo. B. Vista lateral derecha de la cabeza fetal. C. Vista lateral izquierda de la cabeza fetal. D. Vista coronal de la cabeza fetal.

Se procesaron un total de 32 cabezas fetales en el estadio E16.5; 16 para el grupo Ctról, y 16 para el grupo Ob, en el procesador de tejidos (marca *Leica*®), se emplearon 30 minutos para cada lavado en un total de 6 horas y 30 minutos. Luego se incluyeron en parafina (marca *Histoplast*®) en sentido coronal en la estación de inclusión (marca *Shandon Histocentre 3*®) y plancha fría (marca *Thermolyne*®)(**anexo 18.6**).

7.6.3.2 Corte de las cabezas fetales en micrótopo de rotación

Una vez obtenidos los bloques, se perfilaron para realizar los cortes en el micrótopo (marca *Leica RM*® 2135). Se hicieron cortes seriados coronales de 5 μ m de espesor (cuchillas marca *Shandon*® 80 mm). Se hizo la recolección de las muestras con pinces y se colocaron en baño maría 2 g gelatina tipo A de piel de cerdo, marca *SIGMA*® en 500 ml de agua destilada. Las muestras para la tinción de hematoxilina-eosina se recogieron en un portaobjetos (25.4 x 76.2/ 1 mm-1.2 mm de grosor). Todas muestras fueron codificadas con el número del feto, código del biomodelo madre y el grupo (Ctról/Ob) (**Anexo 17.7**).

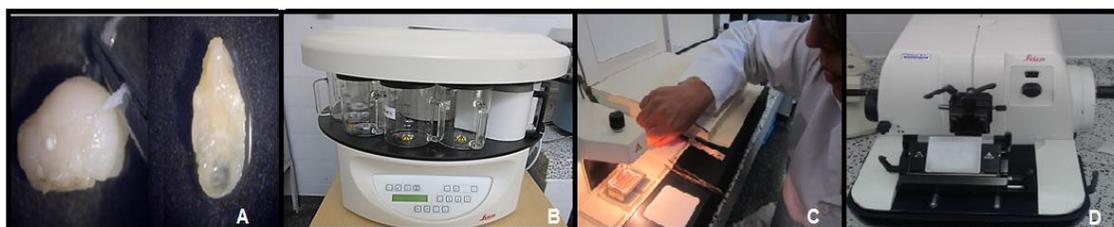


Figura 22. Procesamiento histoquímico de la cabeza fetal de rata Wistar E 16.5

A. Disección de la cabeza fetal, bajo esteromicroscopio con una pinza de disección se retiró la piel y calota craneal. B. Procesador de tejidos. C. Inclusión de la cabeza fetal en parafina empleando la central de inclusión. D. Las muestras fueron cortadas a 5 µm empleando un micrótopo de rotación.

7.6.3.3 Procedimiento de coloración por hematoxilina - eosina

La remoción de la parafina se realizó con 2 cambios en xilol de 3 minutos cada uno, deshidratación con alcohol etílico en lavados de concentraciones decrecientes de 100%, 95% y 70%. Posterior a esto se realizó un lavado con agua corriente por tres minutos y coloración de hematoxilina de 7-15 minutos. Se realizaron lavados con agua y carbonato de litio al 1% por 30 segundos. La tinción con la eosina de 1-3 minutos, deshidratación en alcohol al 95% y aclaramiento con xilol por 3 minutos. Finalmente las placas se cubrieron con resina sintética consult Mount y cubreobjetos. Se obtuvo un total de 91 placas histológicas. Para más detalles ver (**Anexo 17.8**).

7.6.4 Fase III- Procesamiento Inmunohistoquímico

Esta fase contempló la fijación, inclusión, y corte de la cabeza fetal, y los procedimientos de inmunohistoquímica del paladar embrionario. Se procesaron un total de diez (10) cabezas fetales en estadio E16.5; cinco (5) para el grupo Ctrl y 5 para el grupo Ob.

7.6.4.1 Fijación, inclusión, y corte de la cabeza embrionaria de rata Wistar en estadio E 16.5

Los procedimientos de fijación e inclusión en parafina de la cabeza fetal son los contemplado en el numeral **7.6.3.1**. Las muestras fueron procesadas en el procesador de tejidos marca Leica®, fueron incluidas en parafina en sentido coronal (**Anexo 17.6**). Posteriormente, se realizaron cortes de 5 micras del paladar medio y posterior en el micrótopo de rotación marca Leica®. Los cortes se colocaron en placas ionizadas marca Superfrost Plus®. Cada placa fue codificada con el código del biomodelo madre, seguido con el número del feto y el grupo al que pertenecían (CTRL/OB) y fueron almacenadas en estufa THERMO Scientific® hasta realizarse la inmunohistoquímica.

Como control positivo para MMP-2 y MMP-9 se empleó biopsias de placenta humana y como control negativo el corte de la cabeza fetal sin anticuerpo primario.

7.6.4.2 Procedimientos de inmunohistoquímica para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2

La parafina de la muestra fue removida con lavados seriados de xilol (3 lavados de 30 segundos cada uno), alcohol al 100% (3 lavados de 30 segundos cada uno), alcohol al 95% (3 lavados de 30 segundos cada uno). Posteriormente, se realizó la recuperación antigénica con buffer citrato (pH 6 a 30°C) en vaporera Oster® por 45 minutos, seguido de lavados en PBS. Luego la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno 0,3% por 5 minutos. La muestra se incubó con los anticuerpos primarios de interés (MMP-9 policlonal de conejo (Santa Cruz); MMP-2 monoclonal de ratón (Santa Cruz), TIMP-2 policlonal de cabra (Dako) a 4°C toda la noche. Luego de lavados sucesivos con PBS, las muestras se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios y fueron revelados usando el kit ABC complex vector laboratorios Elite Vectastain por 30 minutos y DAB, 3-3'diaminobencidina (SIGMA). Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina diluida de Harris. Todos los lavados se realizaron en PBS tres veces. Los controles negativos se realizaron reemplazando el anticuerpo primario con solución de 0,1% BSA (**Anexo 17.9**).

7.6.5 Fase IV

7.6.5.1 Análisis de imágenes

Esta fase comprendió seis etapas: 1. Toma y almacenamiento de imágenes, 2. Establecimiento del estadio de Theiler, 3. Medición de la longitud cráneo rabadilla, 4. Mediciones lineales de la cabeza fetal, 5. Densitometría óptica de proteínas inmunomarcadas y 6. Análisis estadístico. (**Anexos 17.10 y 17.12**).

7.6.5.2 Toma y almacenamiento de las imágenes

Las placas histológicas teñidas con HE e inmunohistoquímica para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 fueron observadas al microscopio óptico de luz marca Leica DM750 con cámara digital DFC295 (referencia CH9435), ambos adaptados al computador DELL, ubicados en el Salón de Microscopia del Departamento de Morfología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Las imágenes fueron adquiridas en los siguientes aumentos 4x, 10x, 40x, 100x en el software LASV3.8. Los parámetros para las imágenes de HE se referencian en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros adquisición de las imágenes de hematoxilina eosina

Parámetros	4x, 10x, 40x
Exposición	Automática
Gamma	60-75%
Intensidad de luz manual	Media
Formato	PNG

Se obtuvo un total de 627 imágenes histológicas con HE en los aumentos (4X, 10X y 40X), las cuales fueron almacenadas en formato PNG, en carpetas codificadas con el código del biomodelo madre, código del feto, estadio E16.5 y al grupo experimental (CTRL/OB).

Para las muestras inmunomarcadas se estandarizaron los parámetros de la toma de imágenes, de cada uno de los marcadores, en el aumento de 10X, (**Tabla 9**). En el aumento de 10X se realizó el análisis de las imágenes por el Software Image Pro Plus versión 7.0 (Media Cybernetics). Las zonas fotografiadas para el análisis, fueron las crestas palatinas izquierda y derecha (**Anexo 17.12**).

Tabla 9. Parámetros de la adquisición de las imágenes de inmunohistoquímica

MMP-2	MMP-9	TIMP-2
-Exposición 46,8 ms	-Exposición 46,8 ms	-Exposición 46,8 ms
-Ganancia 2,3 x	-Ganancia 2,3 x	-Ganancia 2, 3x
-Saturación 2,40	-Saturación 2,15	-Saturación 2,15
-Gamma 1,40	-Gamma 1,40	-Gamma 1,40
Formato capturado: 2048 x 1536	Formato capturado: 2048 x 1536	Formato capturado: 2048 x 1536
-Histograma: 0-255	-Histograma: 0-255	Tono: 145

-Tono: 157	-Tono: 145	-Saturación 16
-Saturación: 19	-Saturación 16	

Las imágenes fueron almacenadas en tres formatos: JPG, TIFF y PNG, en carpetas que indicaban el código del biomodelo madre, el código del feto y el grupo experimental (Ctrl/Ob). El software Image Pro Plus solo permite el formato JPG o TIFF para el análisis. Se obtuvo un total de 7067 imágenes para inmunohistoquímica para todos los aumentos (4X, 10X, 40X y 100X), de las cuales se seleccionaron sesenta (60) imágenes en el aumento de 10X para el análisis; 20 imágenes por cada marcador (MMP-2, MMP-9 y TIMP-2); de éstas, 10 pertenecían al grupo Ctrl y 10 para el grupo Ob.

7.6.5.3 Morfometría lineal del feto

El protocolo de toma de imágenes de los fetos fue previamente explicado en la fase II en el numeral **7.6.5.2 (Anexo 17.4)**. El análisis de las imágenes se realizó en el software Image J. Se realizaron 3 mediciones de cada variable, en días diferentes. Las imágenes del feto entero, en vista sagital derecha fueron empleadas para la toma de las siguientes medidas de puntos blandos (**figura 23**):

- Longitud cráneo-rabadilla (Desde el vértice cefálico- ángulo de la rabadilla)
- Longitud bregma-borde inferior de la mandíbula (Desde punto bregma- gonion o borde inferior de la rama mandibular)

7.6.5.3.1 Medidas correspondientes al tercio medio y tercio inferior facial:

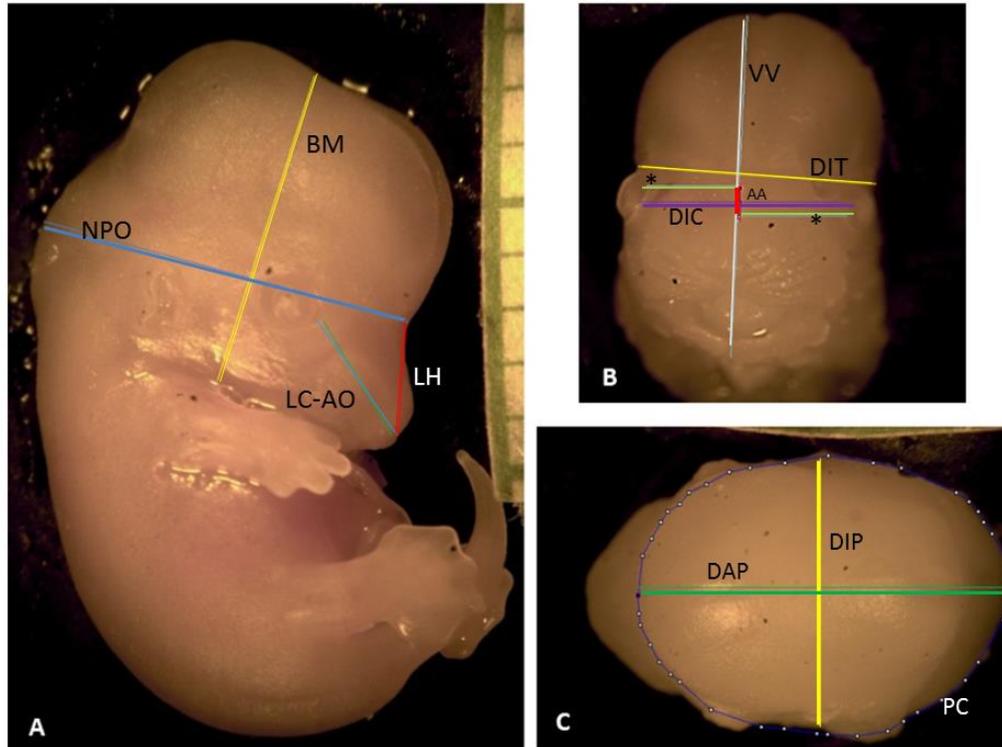
- Longitud del cartílago nasal al ángulo interno del ojo (Desde el cartílago nasal- al canto interno del ojo)
- Longitud nasion-protuberancia occipital (Desde Nasion de tejidos blandos- punto más prominente de la protuberancia occipital)
- Longitud del hocico (Ápex del cartílago nasal- nasion)

7.6.5.3.2 Medidas frontales de la cabeza fetal:

- Vertical verdadera, VV (Porción más convexa del borde coronal- borde inferior de la mandíbula)
- Distancia del canto interno del ojo derecho a la vertical (A)
- Distancia del canto interno del ojo izquierdo a la vertical (A')
- Diferencia entre A-A'
- Distancia intertemporal (porción más cóncava del hueso temporal)
- Distancia intercantal (medición entre el canto interno del ojo derecho hasta el canto interno del ojo izquierdo).

7.6.5.3.3 Medidas coronales:

- Distancia antero-posterior (desde la parte más anterior del hueso frontal- parte más posterior del hueso occipital)
- Distancia interparietal (ancho de la cabeza de pterion-pterion)
- Perímetro cefálico (medición de la circunferencia de la cabeza)



➤ **Figura 23. Medidas lineales craneofaciales de tejidos blandos de rata Wistar E16.5.** A. Medias sagitales: longitud bregma-borde inferior de la mandíbula (BM), longitud nasion-protuberancia occipital (NPO), longitud cartílago nasal al ángulo interno del ojo (LC-AO), longitud del hocico (LH), B. Medias frontales: vertical verdadera (VV), distancia del canto interno del ojo derecho e izquierdo a la VV (*), diferencia entre A-A'(AA), distancia intertemporal (DIT), distancia intercantal (DIC). C. Medidas coronales: Distancia antero-posterior (DAP), distancia interparietal (DIP), perímetro cefálico (PC).

7.6.5.4 Determinación del estadio de Theiler

El estadio de Theiler son diferentes criterios generados que son definidos por Theiler en “The House Mouse: Atlas of Mouse Development”¹⁵³, y permiten distinguir fases importantes del desarrollo temprano y por lo tanto identificar el estadio de desarrollo embrionario o fetal, como por ejemplo el número de células y el número de somitas.

El primer estadio corresponde al estadio de Theiler 1 día postconcepción entre 0-0.9 (dpc; por sus siglas en *inglés days post conception*). El estadio de theiler 26 corresponde al día 18 post concepción, y el estadio de theiler 27 corresponde a un recién nacido. Por último está el estadio Theiler 28, el cual es un postnatal de 7 días de nacido.

Los fetos seleccionados para este estudio corresponden al estadio E16.5 y de acuerdo a sus características morfológicas se clasificaron en tres estadios según las tablas de referencia de Theiler como 22, 22-23 y 23.

La edad fetal fue asignada por medio de dos métodos: 1) Cálculo de la edad postcoito, donde se designó día 0,5 de preñez al momento de la observación de espermatozoides en el frotis vaginal y 2) Evaluación de las características macroscópicas fetales siguiendo la tabla de Theiler al día 16,5

7.6.5.5 Densitometría óptica

La densitometría óptica se realizó en las muestras de paladar secundario inmunomarcadas para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, con los parámetros de toma de imágenes previamente explicados en el numeral **7.6.5.2**; en un aumento de 10X, a un total 60 imágenes; 20 para cada marcador. La densitometría óptica se realizó empleando el software de imágenes Image Pro Plus versión 7.0. Para

realizar las mediciones de área el programa se calibró con una regla de 1 mm dividida en 100 divisiones. Luego, se analizó por separado la región mesenquimal y la región epitelial de cada cresta, delimitando el área epitelial en todas las zonas que corresponden al epitelio nasal, medial, oral hasta el germen dental, según lo descrito por Morris et al¹⁴⁷. El área mesenquimal se delimitó a partir de la lámina basal del epitelio trazando una línea de unión desde el límite de la lámina basal del epitelio nasal hasta la lámina basal del epitelio del germen dental, como se muestra en la **figura 24**. Para la descripción de la inmunohistoquímica en la región mesenquimal y epitelial se clasificó por regiones según lo descrito por Morris et al (**Figura 25**).

Posteriormente, se realizó una selección de los píxeles en un rango de colores que permitió la identificación de la inmunomarcación. Los píxeles seleccionados estuvieron en la escala de verdes, café y amarilla intensos, en un umbral de RGB de rojo (23-251), verde (53-248), azul (2-80). La densitometría óptica se obtuvo al dividir el área seleccionada sobre la densidad total de píxeles seleccionados, tal como lo muestra la **figura 27 (Anexo 18.12)**. Se realizaron tres mediciones, de cada imagen en tiempos diferentes definidos por el investigador y el experto.

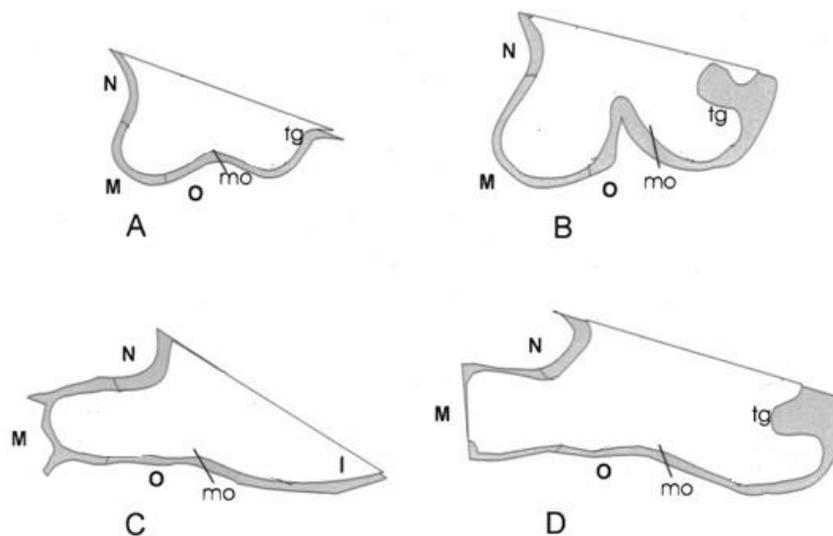


Figura 24. Representación esquemática de las regiones epiteliales y mesenquimales seleccionadas para el análisis de las imágenes. Adaptada de: Morris et al, *Temporospatial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis, Anat Embryol (2000)*¹⁴⁷ En gris se observa la región epitelial y en blanco la región mesenquimal. Los esquemas representan el paladar secundario: A. 30 horas antes de la reorientación, estadio (1) inicial B. 18 horas antes de la

reorientación, estadio (2) crecimiento vertical C. Estadio (3) de elevación palatina. D. Estadio (4) o (5) adhesión y/o fusión. El epitelio es dividido en nasal (N), medial (M) y oral (O) (Tg) gérmen dental, (mo) medio oral.

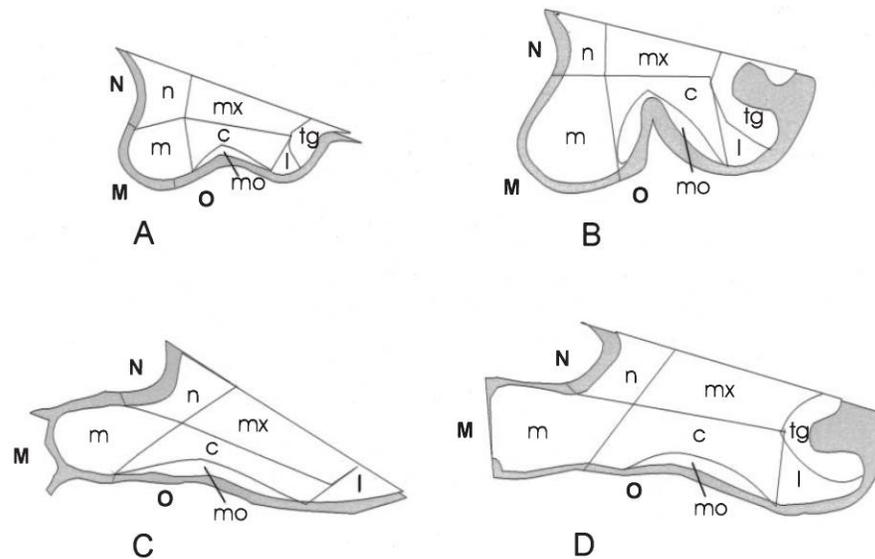


Figura 25. Diagrama de las regiones epitelial y mesenquimal de la cresta palatina. Imagen original, tomada de: *Morris et al, Temporospatial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis, Anat Embryol (2000) 202; 129-141* A. y B. paladar en crecimiento vertical, C. paladar en elevación, D. paladar en fusión. El epitelio es dividido en nasal (N), medial (M) y oral (O). El mesénquima es dividido en nasal (n), medial (m), maxilar (mx), central (c), medio-oral (mo), lateral (l), gérmen dental (tg)

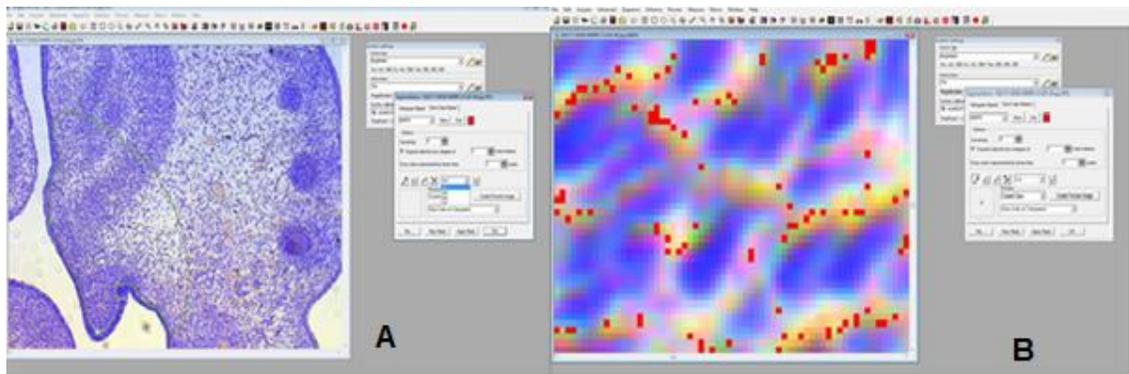


Figura 26. Programa Image Pro Plus. A. Cresta palatina izquierda en un aumento de 10X. **B.** Zoom 100% de la imagen para la selección de los pixeles.

El área mesenquimal inmunomarcada del paladar fetal se analizó realizando zoom de 80-100% de la imagen original de 10X, que permitió seleccionar los pixeles representativos a la proteína marcada.

7.6.5.6 Análisis estadístico

El análisis descriptivo de los datos consistió en la obtención de gráficos, medidas de tendencia central, medidas de dispersión, tanto para las variables cuantitativas como cualitativas, con el fin de llevar a cabo la identificación de datos atípicos y verificar supuestos para análisis posteriores. Además, se aplicaron las pruebas correspondientes para determinar los supuestos de la normalidad y homogeneidad de la varianza.

Las pruebas utilizadas fueron:

1. Shapiro-Wilk para la normalidad
2. Homocedasticidad o igualdad de varianzas de Levene

Para este estudio se realizaron pruebas paramétricas y no paramétricas, según el cumplimiento de la normalidad de los datos, en los casos donde no se cumplió la normalidad se empleó la prueba U mann Whitney y en aquellos casos donde se cumplía el supuesto de normalidad se empleó la prueba de T de Student, con el fin de hacer la comparación entre los grupos control y obeso. Los resultados se consideraron significativos con un $p < 0.05$.

El programa estadístico utilizado fue SPSS versión 22 y minitab versión 17.

Las referencias bibliográficas fueron editadas con el programa EndNote™ basic.

7.6.5.7 Plan de Análisis

Para el análisis de los datos se clasificaron las variables de estudio de acuerdo al tipo de variable (cualitativa o cuantitativa), la unidad de medida y la escala de las variables, según lo referenciado en la **tabla 10**.

Tabla 10. Clasificación de las variables de estudio

Variable	Siglas	Tipo de variable	Unidad de medida	Escala
Estadio de la palatogénesis	EP	Cualitativa	1-Iniciación 2-Crecimiento vertical 2.5:-Intermedio 3- Elevación 4-Adhesión 5-Fusión	Ordinal
Longitud cráneo-rabadilla	LCR	Cuantitativa	Milímetros	Razón
Nasion-protuberancia occipital	NPO	Cuantitativa	Milímetros	Razón
Bregma-cuello	GB	Cuantitativa	Milímetros	Razón
Cartílago nasal-ángulo interno del ojo	CON	Cuantitativa	Milímetros	Razón
Longitud del hocico	LH	Cuantitativa	Milímetros	Razón
Longitud del canto interno del ojo	LCIO	Cuantitativa	Milímetros	Razón
Longitud inter-temporal	LIT	Cuantitativa	Milímetros	Razón
Vertical verdadera	VV	Independiente	Milímetros	Razón
Distancia VV-canto interno del ojo derecho	DCI_OD	Independiente	Milímetros	Razón
Distancia VV-canto interno del ojo izquierdo	DCI_OI	Independiente	Milímetros	Razón
Diferencia A-A`	DIF_A_A	Independiente	Milímetros	Razón
Perímetro cefálico	PC	Independiente	Milímetros	Razón
Distancia interparietal	DI			

Distancia antero-posterior	DA_P	Independiente	Milímetros	Razón
Peso del fetal	PF	Independiente	Gramos	Razón
Peso de la placenta	PP	Independiente	Gramos	Razón
Densitometría de epitelio cresta derecha y cresta izquierda MMP9/MMP2 y TIMP2	E_MMP2_C D E_MMP2_CI E_MMP9_C D E_MMP9_CI E_TIMP2_C D E_TIMP2_CI	Cuantitativas	Unidades arbitrarias (UA)	Razón
Densitometria de mesénquima cresta derecha y cresta izquierda MMP2, MMP9 y TIMP2	M_MMP2_C D M_MMP2_CI M_MMP9_C D M_MMP9_CI M_TIMP2_C D M_TIMP2_CI	Cuantitativa		Razón

Para el cálculo de las correlaciones se utilizó el coeficiente de Pearson (**Figura 27**) para determinar la correlación entre dos variables numéricas evaluadas. Cuando la correlación fue positiva ambas variables aumentaron o disminuyeron, cuando la correlación fue negativa, las variables se comportaron de manera independiente.

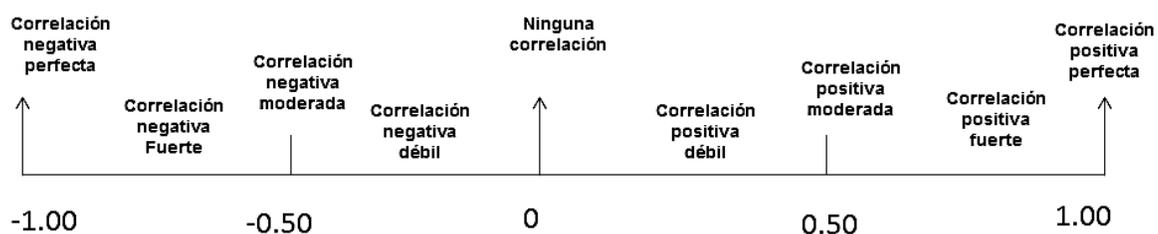


Figura 27. Interpretación del coeficiente de correlación de Pearson. El coeficiente de correlación de Person es máximo cuando su valor equivale a 1 y mínimo, cuando es -1. Una correlación de 1; indica que hay una correlación positiva perfecta entre dos variables estudiadas, cuando es de 0, indica que no hay relación entre las variables y cuando su valor se acerca a -1 indica una correlación negativa perfecta indicando que las variables son independientes una de la otra.

7.6.5.8 Pruebas de concordancia intraobservador e intraobservador

La validez de las medidas que se toman hace parte fundamental de la calidad de los resultados que se obtienen en una investigación, dado a que dan la confianza necesaria para creer en la veracidad de dichos resultados, adicional los datos que se recolectan deben ser totalmente válidos y confiables porque ellos serán los que nos permitirán sacar conclusiones y tomar decisiones respecto al fenómeno en estudio.

Por tanto, se realizaron las respectivas pruebas con el fin de medir la existencia de una concordancia entre los datos recolectados por la estudiante y la experta.

Las pruebas de concordancia interobservador para determinar el grado de concordancia entre dos observadores fueron realizadas por un experto y el investigador (estudiante de maestría) de este proyecto. Estas pruebas fueron realizadas para la estandarización de las medidas lineales fetales, determinación del estadio de Theiler y densitometría óptica de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el paladar fetal.

Para las pruebas de concordancia de las medidas lineales, tanto la investigadora como el experto realizaron mediciones de un total de 6 fetos, tres veces cada embrión, en orientación sagital, frontal y coronal.

Se hizo una comparación de medias utilizando la t de Student y la U de Mann Whitney según el caso, además se hizo una comparación de varianzas por medio de la prueba de Levenne, con el fin de determinar si existen diferencias significativas en las medidas tomadas entre el investigador y el experto.

Antes de aplicar esta prueba se establecieron las hipótesis nula y alterna:

Ho: No existen diferencias significativas en las mediciones intra e interobservador

Ha: Si existen diferencias entre las mediciones intra e interobservador

Obteniendo a nivel general que ambos presentan medidas estadísticamente equivalentes.

Para las pruebas se realizó el respectivo análisis de concordancia a 20 variables estudiadas, según la complejidad de las medida de cada una se obtuvo de 6 o 2 datos para realizar el respectivo análisis.

En la siguiente tabla se muestra el análisis de normalidad y la respectiva comparación entre experto y estudiante para cada una de las variables.

Tabla 11. Análisis de normalidad y la respectiva comparación entre experto y estudiante para cada una de las variables

Variable	Número de Datos	P-Valor Normalidad Experto	P-Valor Normalidad Estudiante	Prueba	Comparación	Experto	Estudiante	P-valor Concordancia	Concordante
LCR	6	0,757	0,965	t pareado	Media	14,95	14,8	0,712	Si
NPO	6	0,497	0,187	t pareado	Media	8,1	7,65	0,067	Si
GB	6	0,4	0,241	t pareado	Media	6,03	6,35	0,122	Si
CON	6	0,154	0,404	t pareado	Media	2,78	2,53	0,018	No
LH	6	0,421	0,001	Wilcoxon	Mediana	1,39	1,395	0,564	Si
LCIO	6	0,456	0,505	t pareado	Media	3,6	3,46	0,121	Si
LIT	6	0,252	0,781	t pareado	Media	4,3	4,21	0,486	Si
DCI_OD	6	0,212	0,415	t pareado	Media	1,78	1,63	0,045	No
DCI_OI	6	0,415	0,473	t pareado	Media	1,83	1,83	1	Si
DIF_A_A	6	0,091	0,007	Wilcoxon	Mediana	0,04	0,03	0,705	Si
PC	6	0,459	0,876	t pareado	Media	18,81	18,08	0,047	No
DI	6	0,075	0,212	t pareado	Media	4,4	4,23	0,08	Si
DA_P	6	0,212	0,794	t pareado	Media	0,15	0,24	0,023	No
M_TIMP2_CD	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	17,58	16,69	0,18	Si
M_TIMP2_CI	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	26,68	25,68	0,18	Si

E_TIMP2_CD	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	15,42	15,85	0,655	Si
E_TIMP2_CI	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	23,16	24,17	0,18	Si
M_MMP2_CD	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	25,32	25,46	0,317	Si
M_MMP2_CI	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	26,45	24,37	0,18	Si
E_MMP2_CD	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	51,48	52,37	0,655	Si
E_MMP2_CI	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	41,38	41,67	0,18	Si
M_MMP9_CD	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	20,90	20,29	0,655	Si
M_MMP9_CI	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	21,54	22,45	0,317	Si
E_MMP9_CD	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	14,34	13,94	0,655	Si
E_MMP9_CI	2	-	-	Wilcoxon	Mediana	16,12	15,26	0,18	Si

Se observa en la anterior tabla que solo 4 variables presentaron diferencias significativas entre las medidas realizadas por el experto y la estudiante las cuales fueron: CON, DCI_OD, PC, DA_P lo que indica que podemos considerar una alta concordancia entre las medidas debido a que 16 de las variables presentaron no presentaron diferencias significativas. Aquellas variables obtuvieron diferencias, se realizaron nuevamente para lograr estandarizar las mediciones entre la investigadora y la experta.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización de los fetos procedentes de madres normopeso y obesas

Cuatro biomodelos fueron empleados para cada grupo. En el grupo obeso se descartó un biomodelo por no presentar implantaciones en el momento de la disección. Se obtuvo un total de 68 fetos, 41 en el grupo control y 27 fetos para el grupo obeso (n=27) (ver **Figura 28**).

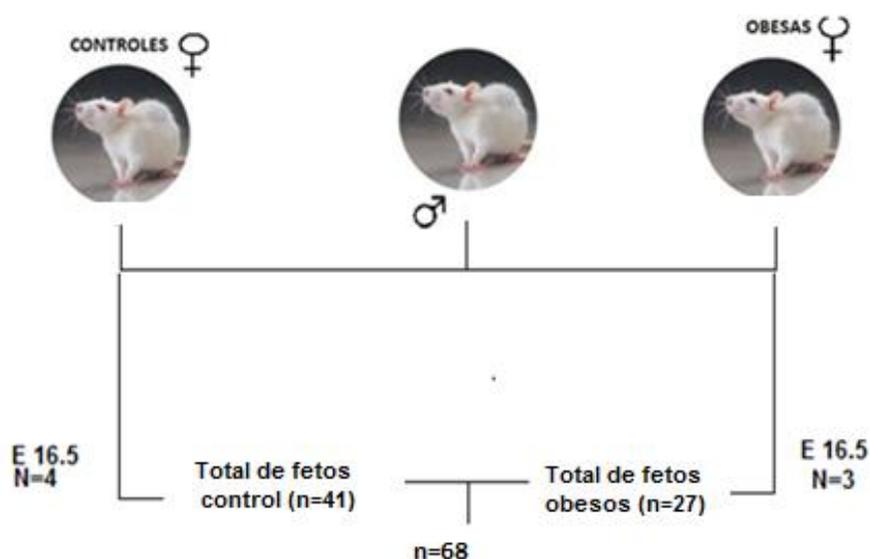


Figura 28. Distribución de los fetos por grupo experimental

8.2 Peso placentario y fetal

Los pesos placentarios no presentaron diferencias significativas cuando se compararon las placentas procedentes del grupo obeso con el grupo control (**Figura 29**). Similares resultados fueron obtenidos cuando se evaluaron los pesos de los fetos de los animales obesos y los controles (**Figura 30**)

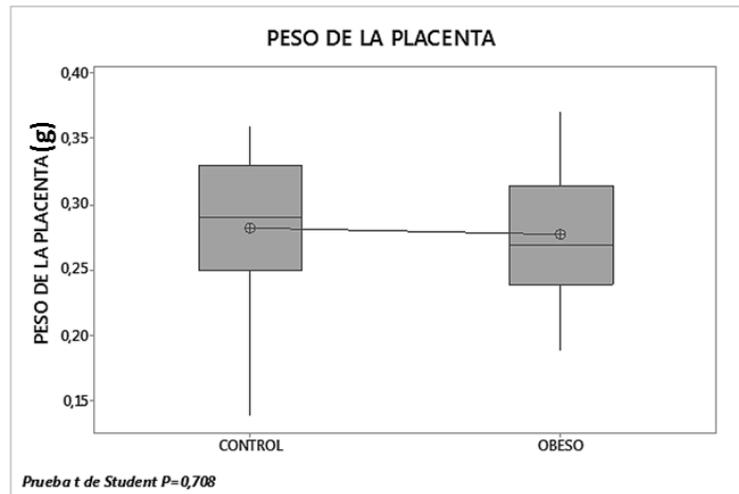


Figura 29. Diagrama de cajas del peso placentario, grupos Ctrl vs Ob, p= 0,708, NS: No significativo. N= 31 control, n= 26 obeso.

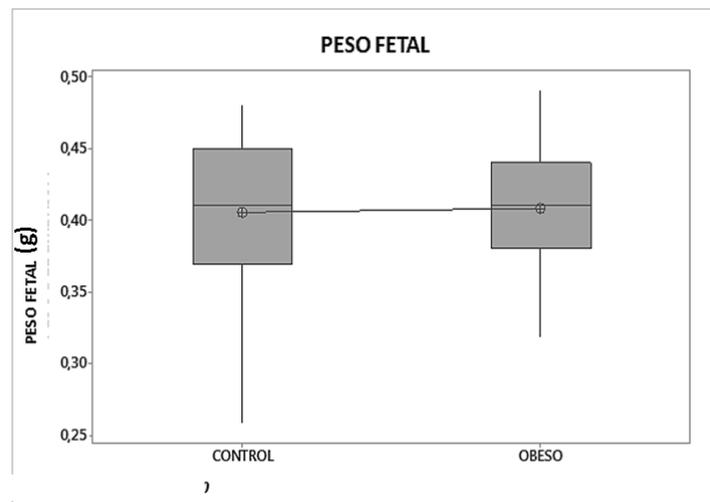


Figura 30. Diagrama de cajas del peso fetal en los grupos Ctrl Vs Ob P= 0,780, NS: No significativo. N= 31 ctrl, n= 26 Ob. T de Student.

8.3 Estadio fetal y longitud cráneo rabadilla

8.3.1 Distribución del estadio de Theiler

Los fetos se distribuyeron entre los estadios de Theiler 21,5 a 23,5. El estadio de Theiler 22 fue predominante para ambos grupos, seguido del estadio 22.5 (**Figura 31**). Siendo característico para el estadio de Theiler 22 la separación de los dedos

del antepié, retropié sin separación de los dedos, folículos pilosos abundantes en el cuerpo, excepto en la cabeza, los somitas en la parte distal de la cola, presencia de crecimiento de pabellón auricular hacia adelante y cubriendo una parte del conducto auditivo externo. La hernia umbilical fue característica de este estadio.

Por otro lado, el estadio de Theiler 23, presentó como característica sobresaliente la separación de los dedos del antepie y el retropié. El pabellón auricular cubría más de la mitad del meato auditivo externo. En fresco, las venas superficiales fueron visibles. Los folículos pilosos eran visibles en todo el cuerpo. Los párpados todavía se encontraban abiertos. Y aquellos especímenes clasificados en estadio intermedio de Theiler 22-23, presentaron características intermedias entre ambas etapas (**Anexo 17.11**).

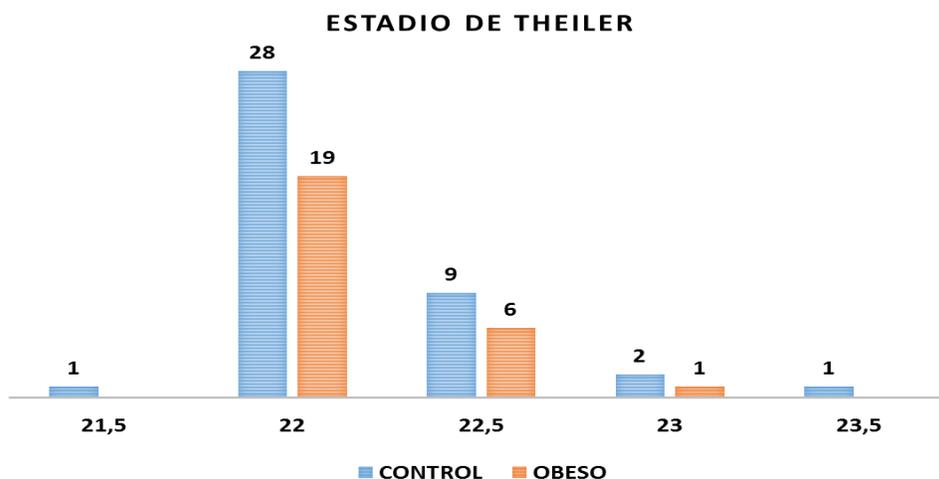


Figura 31. Diagrama de frecuencias distribución del estadio de Theiler en rata Wistar E16.5.

Se evaluaron 41 fetos procedentes del grupo control y 26 fetos procedentes del grupo obeso. Cada barra representa el estadio de Theiler evaluado y sobre ella se muestra el número de fetos cuyas características externas corresponden a dicho estadio.

8.3.2 Distribución de la longitud cráneo rabadilla

La longitud cráneo –rabadilla es un parámetro usado comumente para evaluar el crecimiento fetal normal. En este estudio observamos que este parámetro no presentó diferencias cuando se comparan los fetos procedentes del grupo control con el grupo obeso (**Figura 32**).

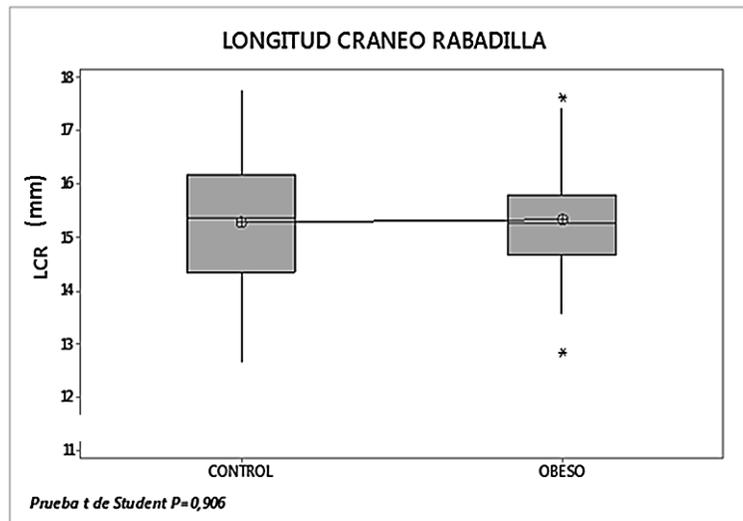


Figura 32. Diagrama de cajas de la longitud cráneo rabadilla, grupos Ctrl vs Ob, $p= 0,906$, prueba T Student, NS: No significativo. N= 41 control, N= 27 obeso.

8.4 Morfometría lineal de la cabeza fetal

8.4.1 Longitud bregma-Borde inferior de la mandíbula

La medida bregma-borde inferior de la mandíbula, mide la altura de la cabeza fetal en una vista sagital. Las diferencias no fueron significativas para los grupos estudiados. Esta medida presentó un promedio de 6,57 mm para ambos grupos (**figura 33**).

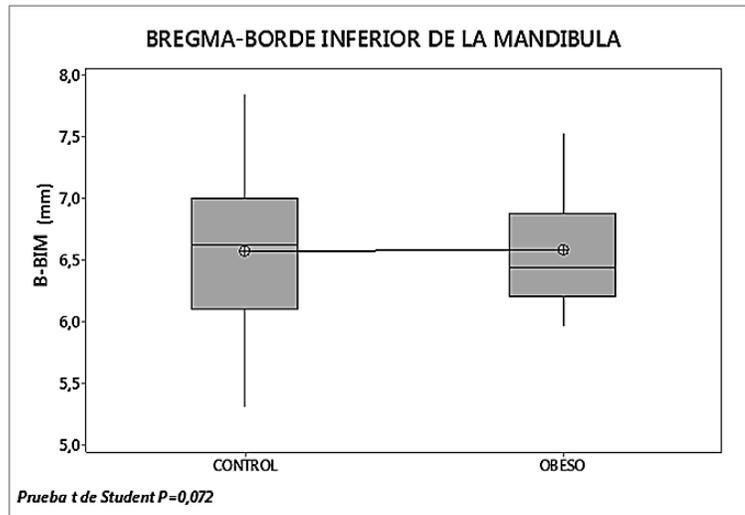


Figura 33. Diagrama de cajas de la longitud bregma-borde inferior de la mandíbula grupos Ctról vs Ob, $p= 0,072$, prueba T Student, NS: No significativo. $N= 41$ control, $N= 27$ obeso

8.5. Evaluación del tercio medio y tercio inferior facial

Los parámetros relativos al desarrollo facial evaluados fueron longitud del cartílago nasal al ángulo interno del ojo, longitud nasion-protuberancia occipital y la longitud del hocico. Estas medidas no presentaron diferencias significativas entre los fetos del grupo obeso y del grupo control, el nivel de significancia fue de 0,05. (**Figuras 34, 35,36**).

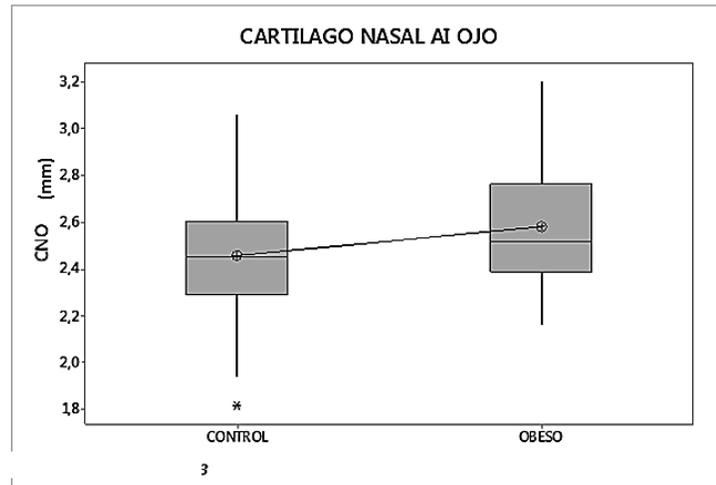


Figura 34. Diagrama de cajas de medida de cartílago nasal-ángulo interno del ojo grupos Ctrl vs Ob, $p= 0,053$ prueba T Student, NS: No significativo. (*) Dato atípico. N= 41 control, N= 27 obeso.

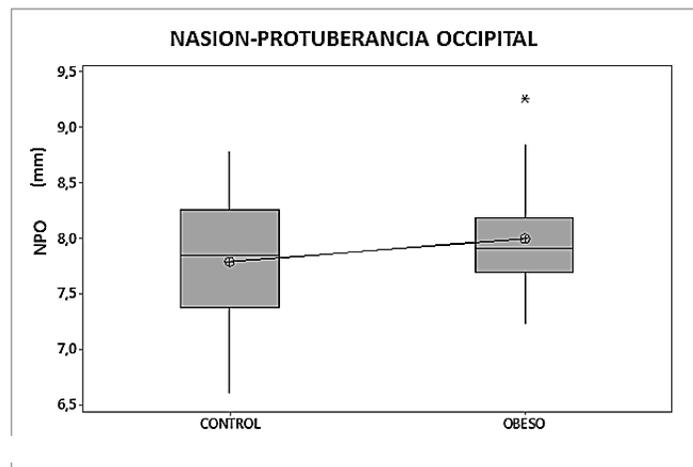


Figura 35. Diagrama de cajas de medida nasion-protuberancia occipital ojo grupos Ctrl vs Ob, $p= 0,111$ prueba T Student, NS: No significativo. (*) Dato atípico. N= 41 control, N= 27 obeso.

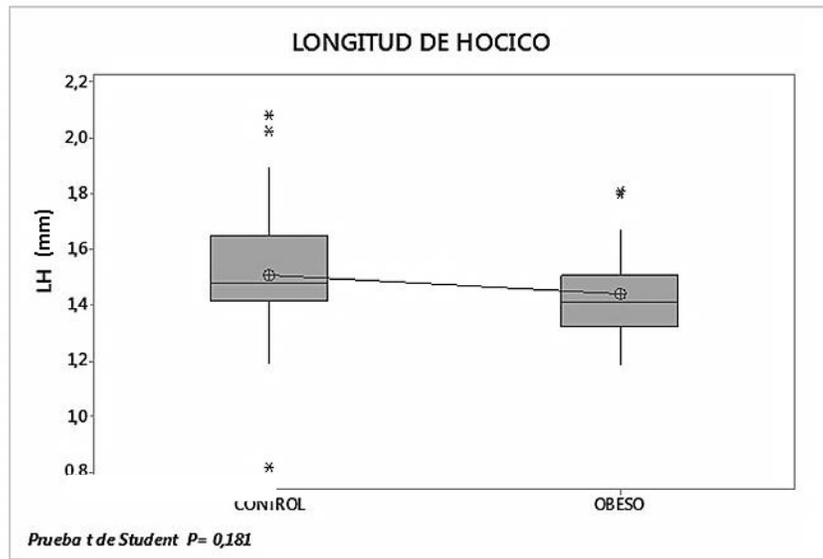


Figura 36. Diagrama de cajas de longitud del hocico grupos Ctrl vs Ob, $p= 0,181$ prueba T Student, NS: No significativo. (*) Dato atípico. N= 41 control, N= 27 obeso.

8.6 Evaluación frontal de la cabeza fetal

Las medidas frontales fetales craneales evaluadas no tuvieron diferencias significativas entre los grupos.

Distancia intercantal $p= 0,08$ (**figura 37**), vertical verdadera $p=0,076$ (**figura 38**), distancia entre el canto interno del ojo derecho (A) e izquierdo (A') a la vertical verdadera $p=0,4830$ y $p= 0,1016$ respectivamente (**figura 39 y 40**), distancia de A-A' $p=0,4830$ (**figura 41**), y por último la distancia intertemporal $p=0,152$ (**figura 42**).

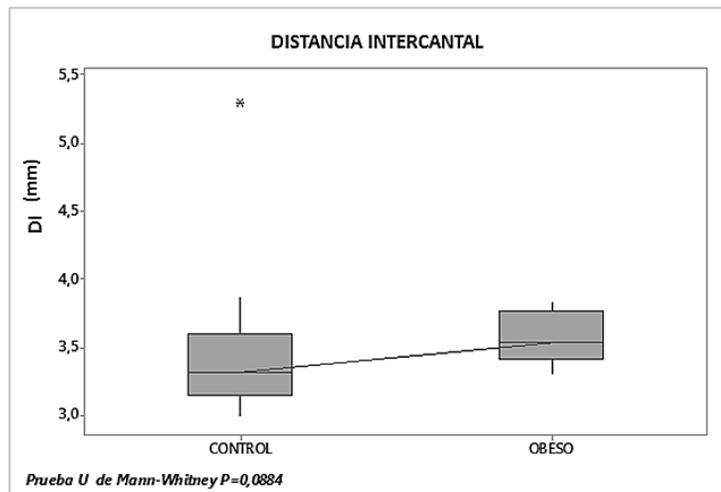


Figura 37. Diagrama de cajas de la distancia intercantal grupos Ctról vs Ob, $p=0,0884$ prueba U de Mann Whitney, NS: No significativo. (*) Dato atípico. N= 16 control, N= 7 obeso.

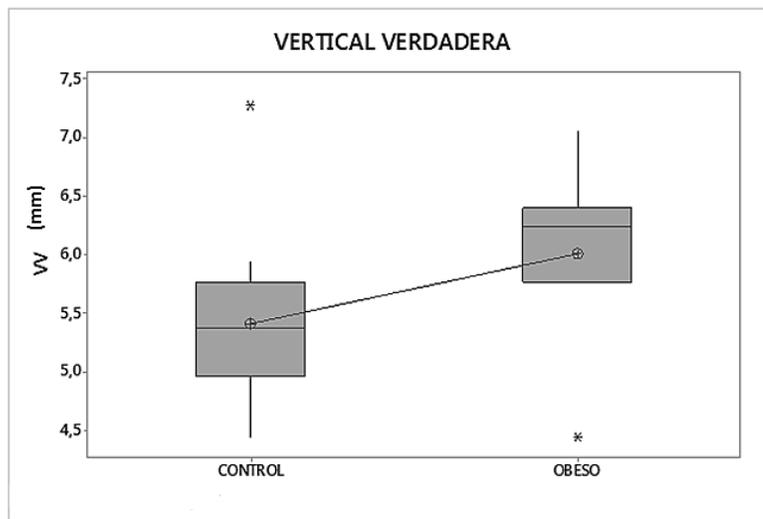


Figura 38. Diagrama de cajas de vertical verdadera grupos Ctról vs Ob, $p=0,076$ prueba T Student, NS: No significativo. (*) Datos atípicos. N= 16 control, N= 7 obeso.

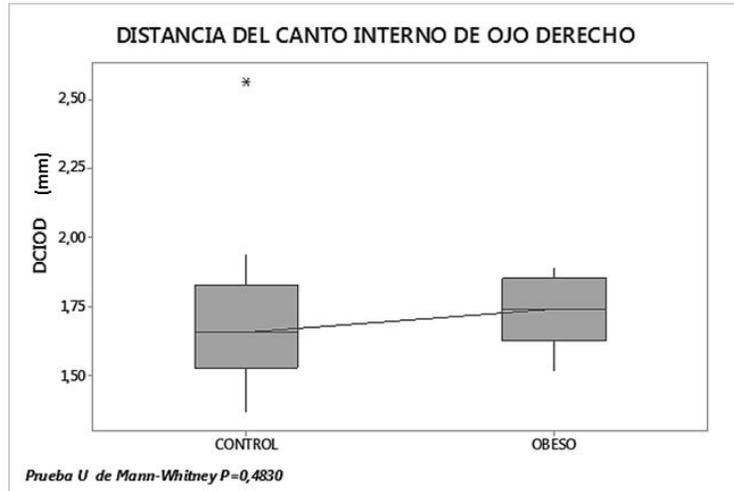


Figura 39. Diagrama de cajas de distancia del canto interno del ojo derecho-VV grupos Ctrl vs Ob, $p= 0,4830$ prueba T Student, NS: No significativo. (*) Datos atípicos. N= 16 control, N= 7 obeso.

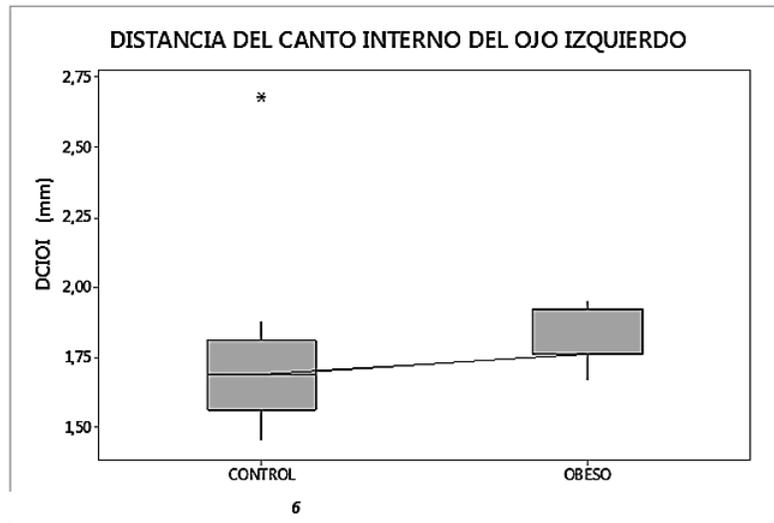


Figura 40. Diagrama de cajas de distancia del canto interno del ojo izquierdo-VV grupos Ctrl vs Ob, $p= 0,1016$ prueba T Student, NS: No significativo. (*) Datos atípicos. N= 16 control, N= 7 obeso.

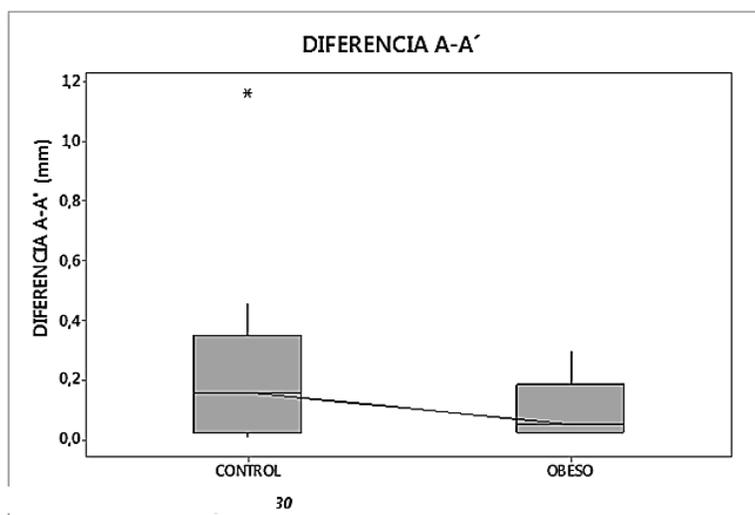


Figura 41. Diagrama de cajas de diferencia entre A y A' grupos Ctrl vs Ob, $p=0,4830$ prueba T Student, NS: No significativo. (*) Datos atípicos. N= 16 control, N= 7 obeso.

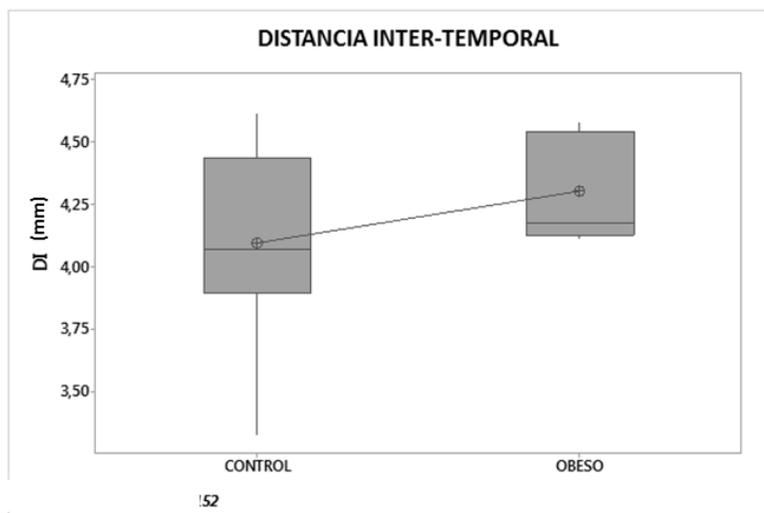


Figura 42. Diagrama de cajas de distancia inter-temporal grupos Ctrl vs Ob, $p=0,152$ prueba T Student, NS: No significativo. N= 16 control, N= 7 obeso.

8.7 Evaluación coronal de la cabeza fetal

- Las medidas evaluadas fueron: Perímetro cefálico
- Distancia interparietal
- Distancia antero-posterior

En ninguna de las medidas se encontraron diferencias significativas entre los grupos; perímetro cefálico $p=0,978$ (figura 44), distancia interparietal $p= 0,1016$ (Figura 45) y distancia anteroposterior $p= 0,602$ (Figura 46).

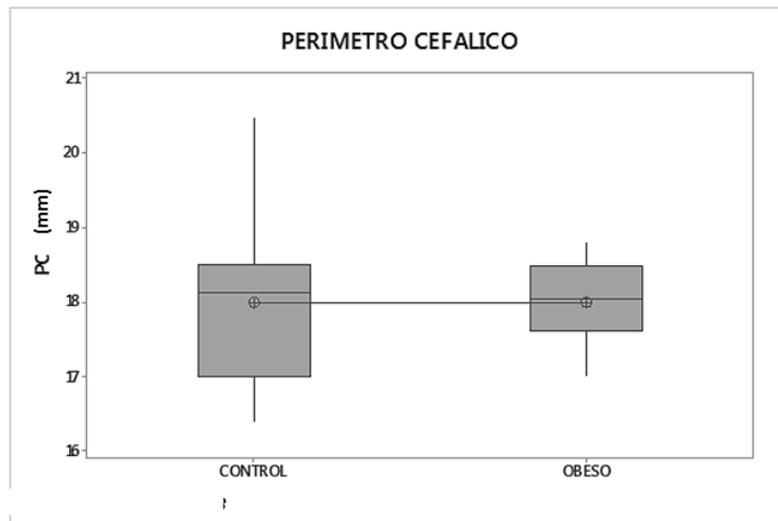


Figura 43. Diagrama de cajas de perímetro cefálico grupos Ctrl vs Ob, $p= 0,978$ prueba T Student, NS: No significativo. N= 16 control, N= 7 obeso.

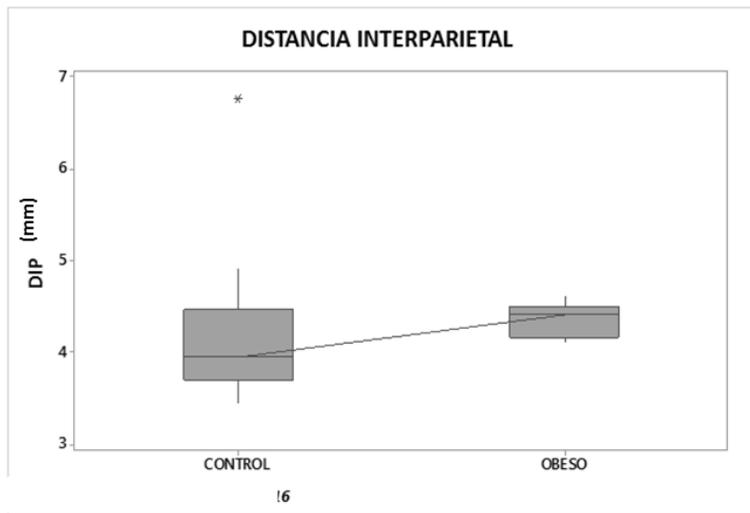


Figura 44. Diagrama de cajas de distancia interparietal grupos Ctrl vs Ob, $p=0,1016$ prueba U de Mann Whitney. NS: No significativo. (*) Datos atípicos. N= 16 control, N= 7 obeso.

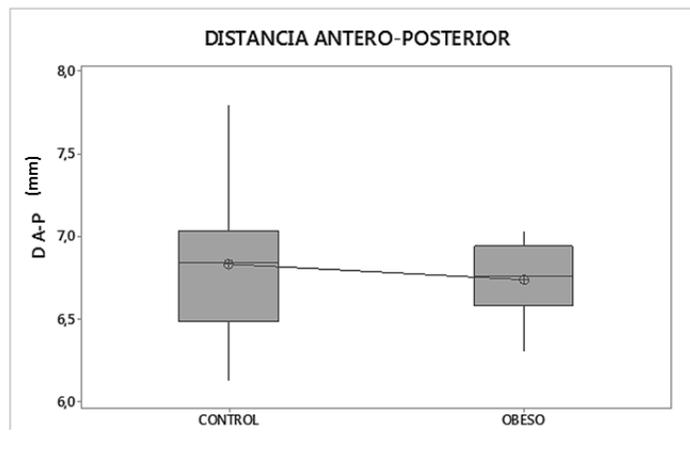


Figura 45. Diagrama de cajas de distancia antero-posterior grupos Ctrl vs Ob, $p=0,602$ prueba T Student, NS: No significativo. (*) Datos atípicos. N= 16 control, N= 7 obeso.

9. Morfología palatina de rata Wistar en el estadio E16.5

Con relación a la morfología del paladar para el estadio E16.5 se encontró que las crestas palatinas laterales se distribuyeron en cinco estadios; crecimiento vertical, estadio intermedio (una cresta en posición vertical y la otra horizontal), elevación horizontal, y adhesión (**Figura 46**). Ninguno de los biomodelos presentó fusión palatina.

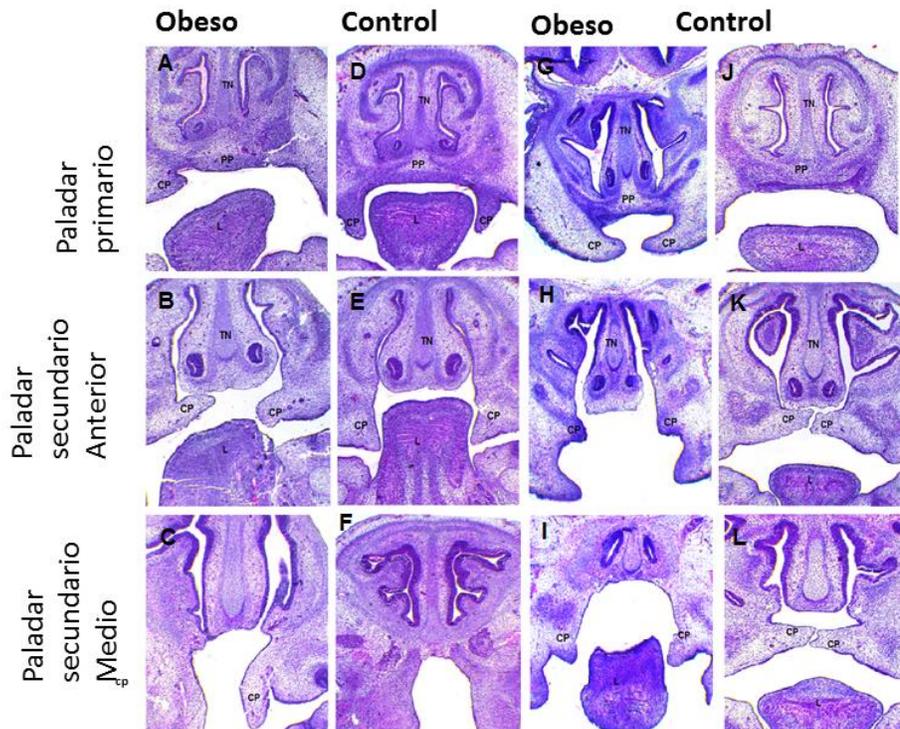


Figura 46. Vista coronal del paladar de rata Wistar E16.5 en biomodelos del grupo control y obeso.

Secciones coronales del paladar primario y secundario E16.5. Tinción hematoxilina - eosina. A-C: Biomodelo obeso, se observa un estadio intermedio con la cresta derecha elevada y la cresta izquierda vertical. Presencia de alteración en la lengua D-F: Biomodelo control, se observa el paladar en crecimiento vertical; ambas crestas se encuentran en posición lateral a la lengua. G-I: Biomodelo obeso, se observan las crestas palatinas en posición lateral a la lengua. J-L: Biomodelo control, crestas palatinas en estadio de elevación. TN, Tabique nasal; PP, paladar primario; C, cresta palatina; L, lengua.

10. Distribución del estadio de la palatogénesis

Para determinar el estadio de la palatogénesis característico del día 16.5 fetal se evaluaron 32 fetos, 16 procedentes del grupo control y 16 del grupo obeso. Para ambos grupos el estadio predominante fue el crecimiento vertical de las crestas palatinas. (Figura 48).

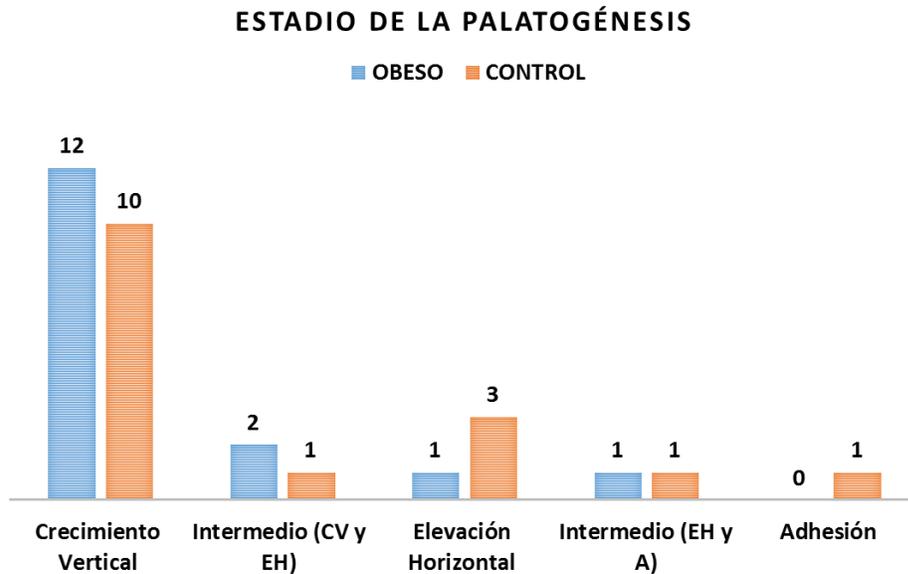


Figura 47. Diagrama de frecuencias del estadio de la palatogénesis en el día 16.5.

11. Evaluación de las proteínas de matriz extracelular MMP2, MMP9 y TIMP2

11.1 Inmunomarcación en la región mesenquimática de las crestas palatinas derecha e izquierda para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de fetos procedentes del grupo control.

Las siguientes figuras (**Figuras 48-51**) presentan cortes de paladar de rata Wistar en estadio de elevación; se muestra una cresta palatina en crecimiento vertical y la otra en elevación horizontal, para MMP2, MMP9, TIMP2 y el control negativo.

11.1.1 MMP2 en la región mesenquimal del paladar grupo control

En el estadio de crecimiento horizontal la MMP2 estuvo presente en regiones adyacentes del mesenquima nasal, maxilar, medial y oral. En el estadio de elevación horizontal una inmunomarcación en la región mesenquimal mayor en la región medial.

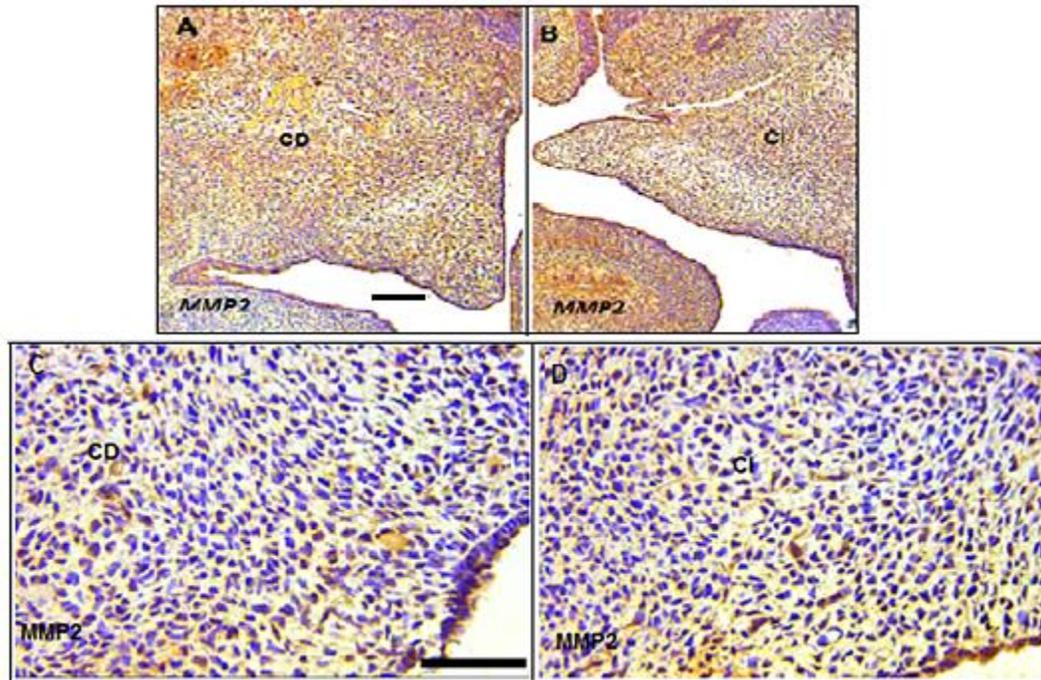


Figura 48. Inmunohistoquímica para MMP-2 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ctról. (A-B) Aumento 10X barra, 200 μ m, (C-D) aumento 40X Barra 100 μ m. Secciones coronales fueron marcadas para MMP-2 (A-B), El color marrón indica la presencia de la MMP2. Hay una mayor distribución en el mesénquima palatino para la MMP-2, Se encontró el marcaje de MM-P2 a nivel extracelular con gran distribución en toda la región de la MEC del mesénquima palatino. Para la cresta derecha (CD) se observó inmunomarcación postiva para la zona del mesénquima nasal, medial y maxilar en mayor proporción (C), y para la cresta izquierda (CI) se observó mayor marcaje en la región medial mesenquimal.

11.1.2 MMP9 en la región mesenquimal del paladar del grupo control

En el estadio de crecimiento vertical hubo una expresión aumentada en las porciones del mesenquima nasal, medial, y central y el mesenquima lateral. También incrementó la expresión en la membrana basal, en particular en la región del germen dental. En la elevación del paladar aumentó la expresión en todas las

regiones del mesénquima del paladar incluyendo las regiones centrales y maxilares de las crestas.

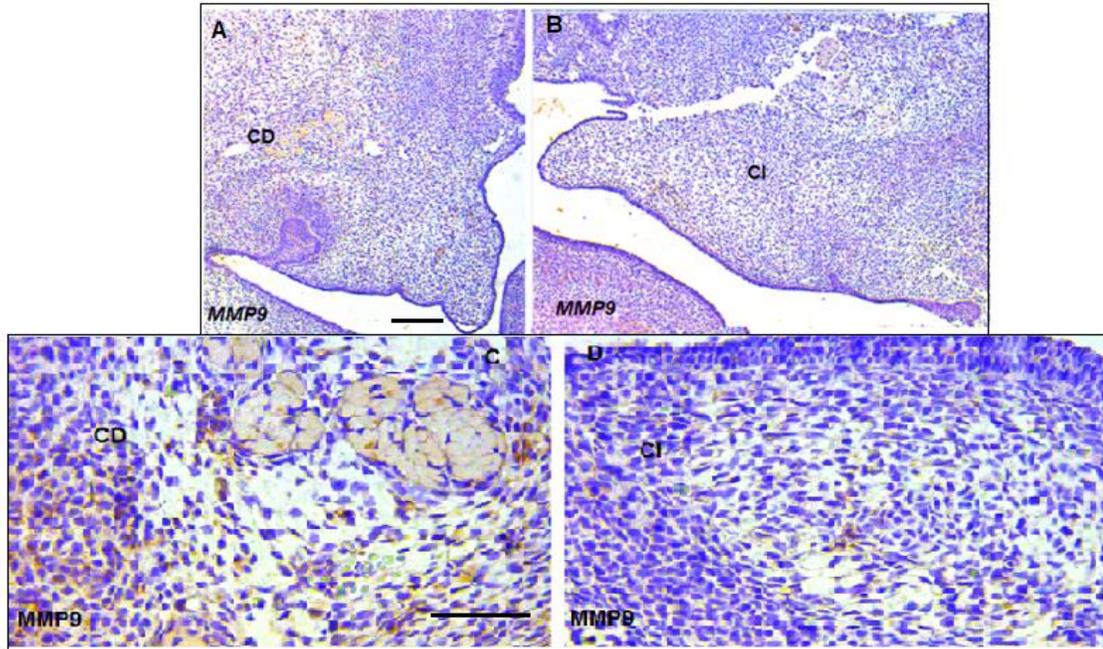


Figura 49. Inmunohistoquímica para MMP-9 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ctról. (A-B) Aumento 10X barra, 200µm, (C-D) aumento 40X Barra 100µm. Secciones coronales fueron marcadas para MMP-9 (A-B), El color marrón indica la presencia de la MMP9. Se observa una menor inmunomarcación de MMP9 a comparación de MMP2 en el mesénquima del paladar. Se observa una inmunomarcación extracelular de células diferenciadas tipo condroblastos y/o osteoclastos (C-D).

11.1.3 TIMP2 en la región mesenquimal del paladar del grupo control

En el estadio de crecimiento vertical TIMP-2 se expresó en el mesénquima de las regiones maxilares y centrales, y en la membrana basal epitelial. En la elevación del paladar la expresión de TIMP-2 aumentó en la región mesequimal maxilar asociado a sitios osteogénicos y en la región medial de las crestas. Se observó una marcación citoplasmática en las células diferenciadas tipo condroblastos y/o osteoblastos.

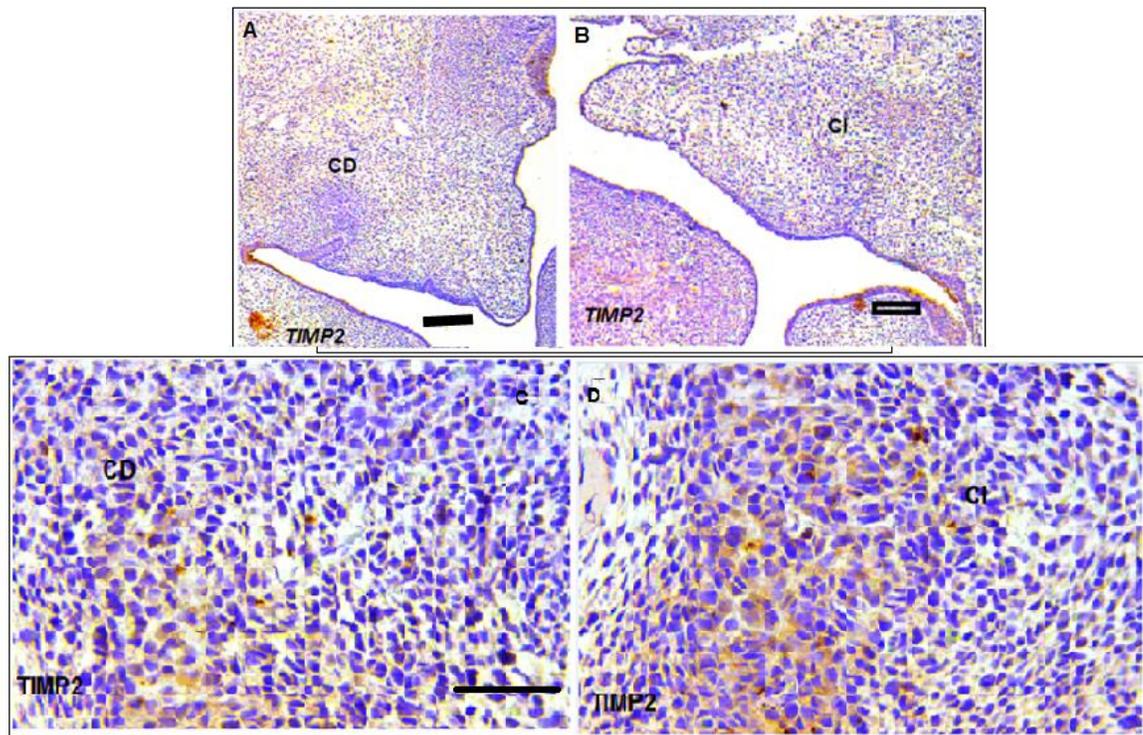


Figura 50. Inmunohistoquímica para TIMP2 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ctról. (A-B) Aumento 10X barra, 200µm, (C-D) aumento 40X Barra 100µm. Secciones coronales fueron marcadas para TIMP2 (A-B), En la cresta derecha se observó inmunomarcación positiva en las zonas del mesenquima maxilar, central, pero no en la región nasal. También se observó en la membrana basal epitelial. En la cresta izquierda, se observó una mayor inmunomarcación en el mesenquima nasal, maxilar y medial asociado en los sitios osteogénicos (C-D).

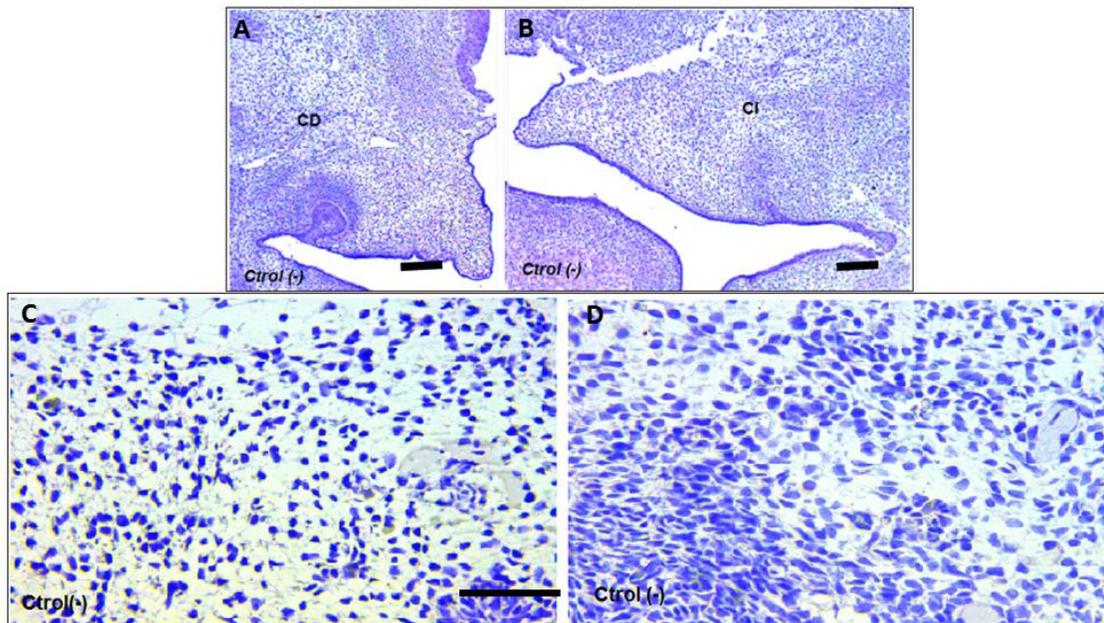


Figura 51. Control negativo de cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ctról. (A-B) Aumento 10X barra, 200µm, (C-D) aumento 40X Barra 100µm.

11.2 Región mesenquimal: correlación entre las crestas palatinas derecha e izquierda para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de fetos procedentes del grupo control.

Las figuras 52 y 57, muestran las correlaciones para cada uno de los marcadores MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, y su expresión entre la cresta derecha y cresta izquierda, en la región mesenquimal, para cada uno de los grupos (control y obeso).

11.2.1 Grupo control

La **figura 52** se muestra las correlaciones entre la cresta derecha y cresta izquierda en la región mesenquimal para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, en el grupo control. Se encontró una correlación positiva fuerte entre la cresta derecha y cresta izquierda para los tres marcadores: MMP-2= 0,87, MMP-9=0,95 y TIMP-2= 0,69; tal como se observa en los gráficos de dispersión (A,B,C) y matrices de correlación (D,E,F), para cada marcador respectivamente.

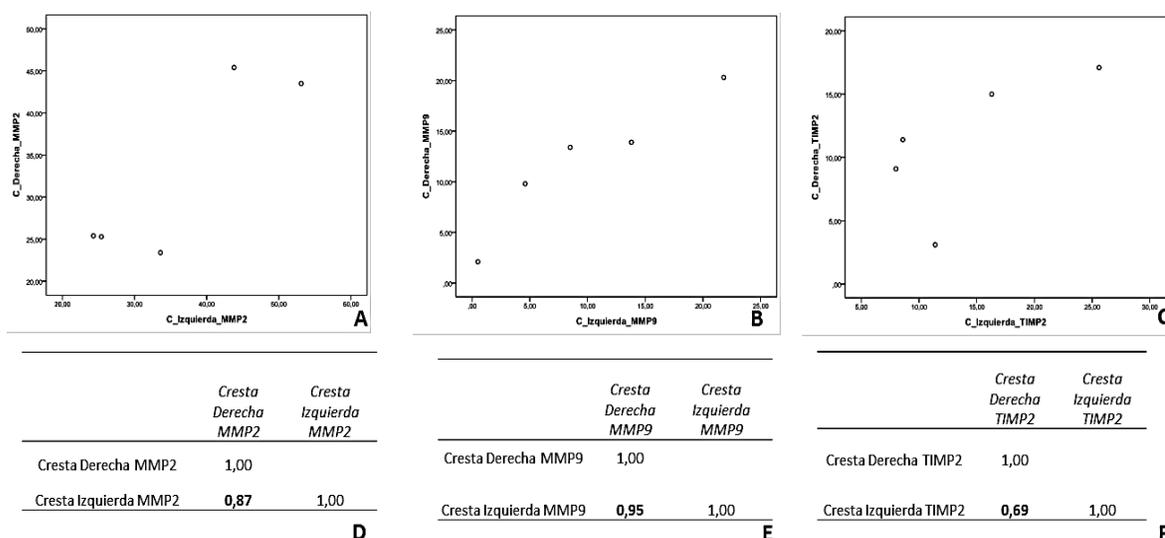


Figura 52. Correlación entre CD y CI para MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región mesequimal palatina, en el grupo control. (A, B, C) Gráficos de dispersión para MMP2, MMP9 y TIMP2, respectivamente. (D,E,F) Matrices de correlación para MMP2, MMP9 y TIMP2.

11. 3 Inmunomarcación en la región mesenquimatica de las crestas palatinas derecha e izquierda para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de fetos procedentes del grupo obeso

11.3.1 MMP2 en la región mesenquimal del grupo obeso

En el estadio de crecimiento horizontal la MMP2 estuvo presente en regiones adyacentes del mesenquima nasal, maxilar, medial y oral. En el estadio de elevación horizontal una inmunomarcación en la región mesequimal mayor en la región medial y nasal.

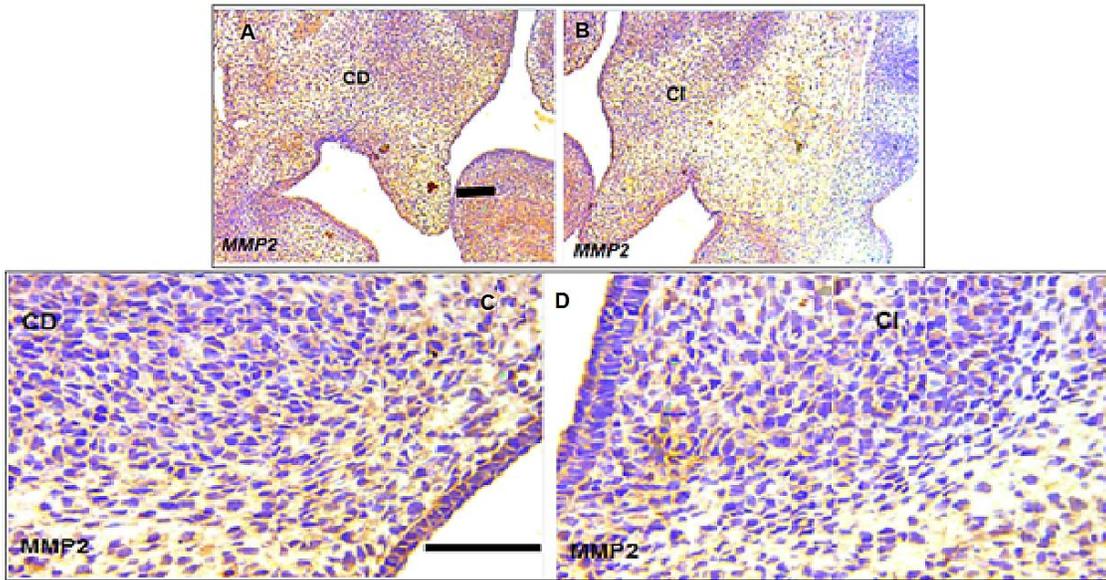


Figura 53. Inmunohistoquímica para MMP-2 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ob. (A-B) Aumento 10X barra, 200 μ m, (C-D) aumento 40X Barra 100 μ m. Secciones coronales fueron marcadas para MMP-2 (A-B), El color marrón indica la presencia de la MMP2. Hay una mayor distribución en el mesénquima palatino para la MMP-2, Se encontró el marcaje de MM-P2 a nivel extracelular con gran distribución en toda la región de la MEC del mesénquima palatino. Para la cresta derecha (CD) se observó inmunomarcación positiva para la zona del mesénquima nasal, medial y maxilar en mayor proporción (-C), y para la cresta izquierda (CI) se observó mayor marcaje en la región medial mesenquimal.

11.3.2 MMP9 en la región mesenquimal del grupo obeso

En el estadio de crecimiento vertical hubo una expresión disminuida, demarcada en las regiones del mesenquima nasal, medial, y central y el mesenquima lateral. También incrementó la expresión en la membrana basal, en particular en la región del germen dental. En la elevación del paladar aumentó la expresión en todas las regiones del mesénquima del paladar incluyendo las regiones centrales y maxilares de las crestas.

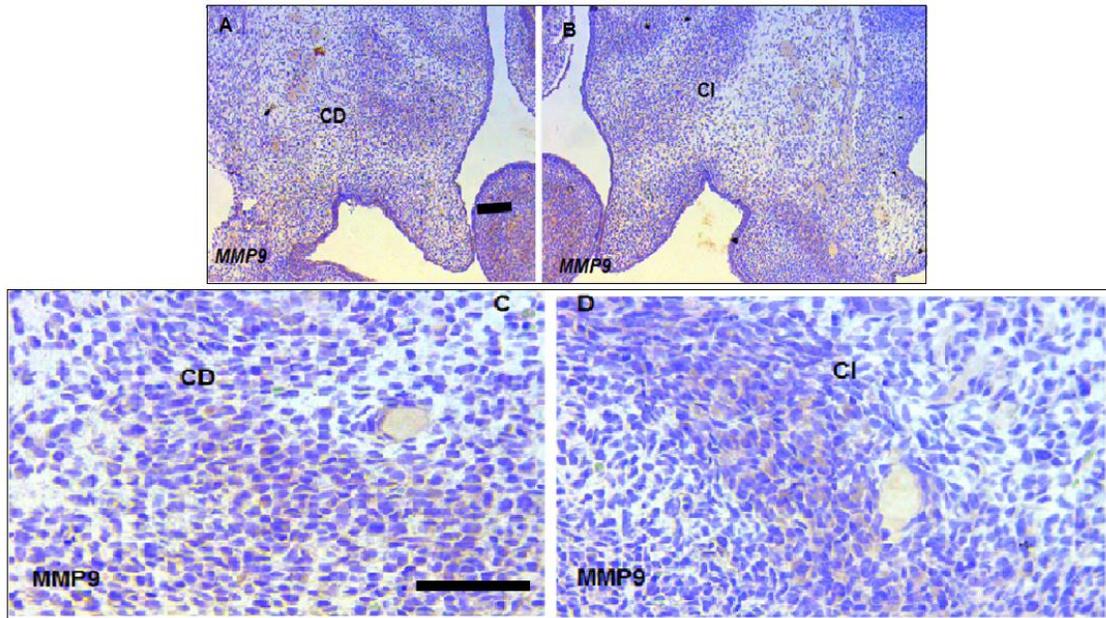


Figura 54. Inmunohistoquímica para MMP-9 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ob. (A-B) Aumento 10X barra, 200 μ m, (C-D) aumento 40X Barra 100 μ m. Secciones coronales fueron marcadas para MMP-9 (A-B), El color marrón indica la presencia de la MMP9. Se observa una menor inmunomarcación de MMP9 a comparación de MMP2 en el mesénquima del paladar. Se observa marcaje citoplasmático en células en camino de diferenciación tipo condroblastos y/o osteoblastos (C-D).

11.3.3 TIMP2 en la región mesenquimática del grupo obeso

En el estadio de crecimiento vertical TIMP-2 se expresó en el mesénquima de las regiones maxilares y centrales, y en la membrana basal epitelial. En la elevación del paladar la expresión de TIMP-2 aumentó en la región mesenquimal maxilar asociado a sitios osteogénicos y en la región medial de las crestas.

Se observó una marcación citoplasmática en las células diferenciadas tipo condroblastos y/o osteoblastos.

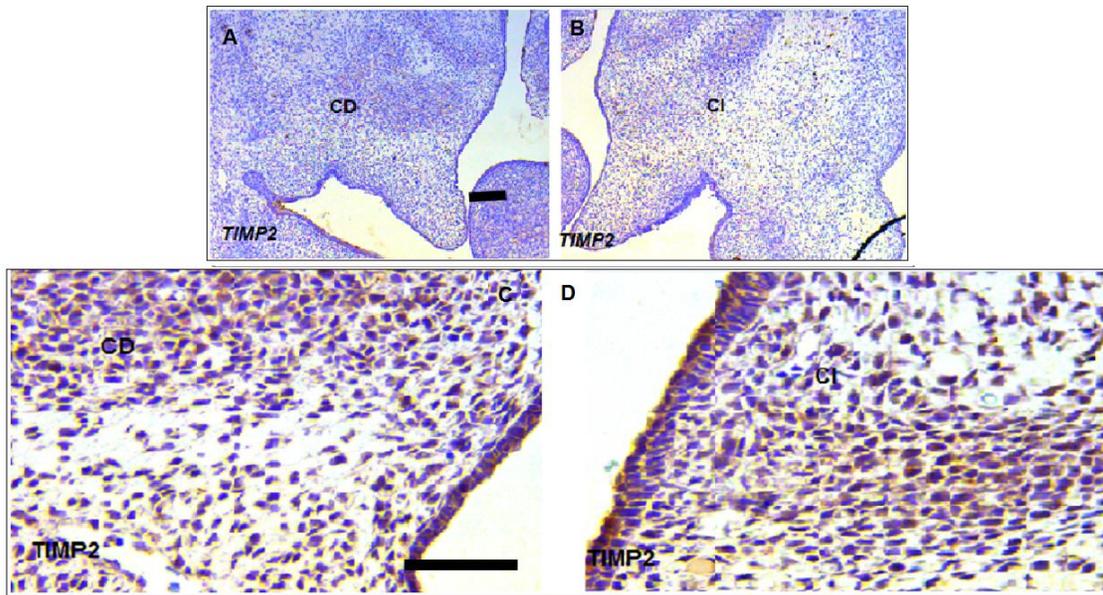


Figura 55. Inmunohistoquímica para TIMP2 cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ob. (A-B) Aumento 10X barra, 200 μ m, (C-D) aumento 40X Barra 100 μ m. Secciones coronales fueron marcadas para TIMP2 (A-B), ambas crestas en crecimiento vertical con una inmunomarcación mayor en la región del mesénquima maxilar y nasal. El marcaje fue a nivel del citoplasma de células en camino a diferenciarse tipo condroblastos y/o osteoblastos (C-D).

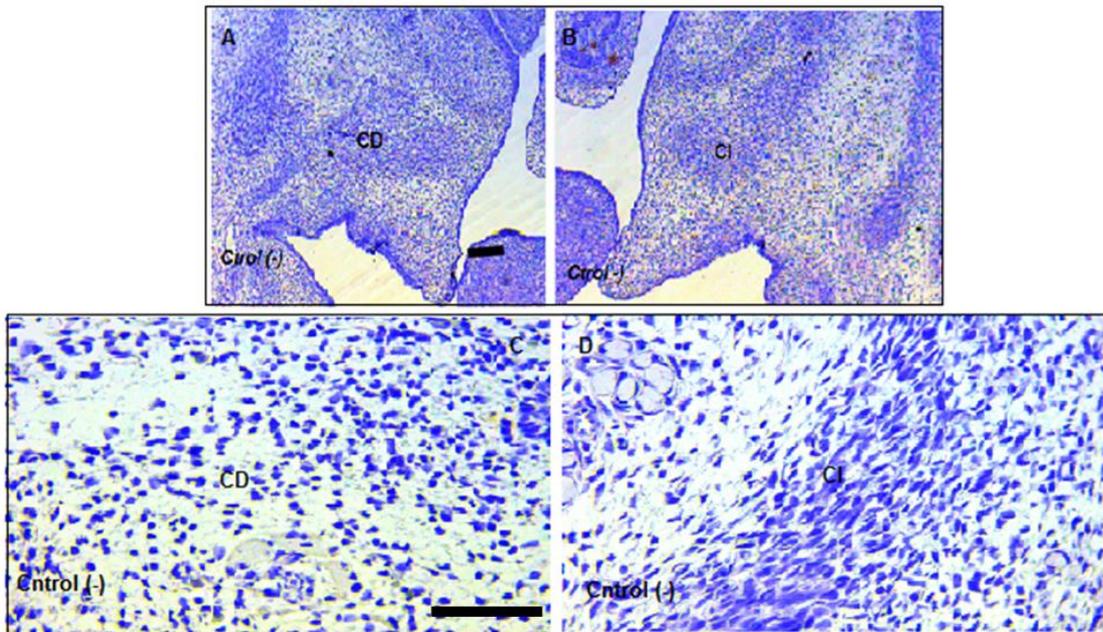


Figura 56. Control negativo de cresta derecha y cresta izquierda de rata Wistar E16.5 Grupo Ob.(A-B) Aumento 10X barra, 200µm, (C-D) aumento 40X Barra 100µm.

11.4 Región mesenquimática: correlación entre las crestas palatinas derecha e izquierda para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de fetos procedentes del grupo obeso.

La **figura 57** muestra las correlaciones entre la cresta derecha y cresta izquierda en la región mesenquimal para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, en el grupo obeso. Se encontró una correlación positiva fuerte entre la cresta derecha y cresta izquierda para: MMP-2 =0,79 y TIMP-2=0,97; esto quiere decir que si una de los marcadores aumenta en una cresta, en la otra hay una gran probabilidad de que también aumente. Por otro lado, hay una correlación negativa débil entre las crestas para MMP-9= -0,08.

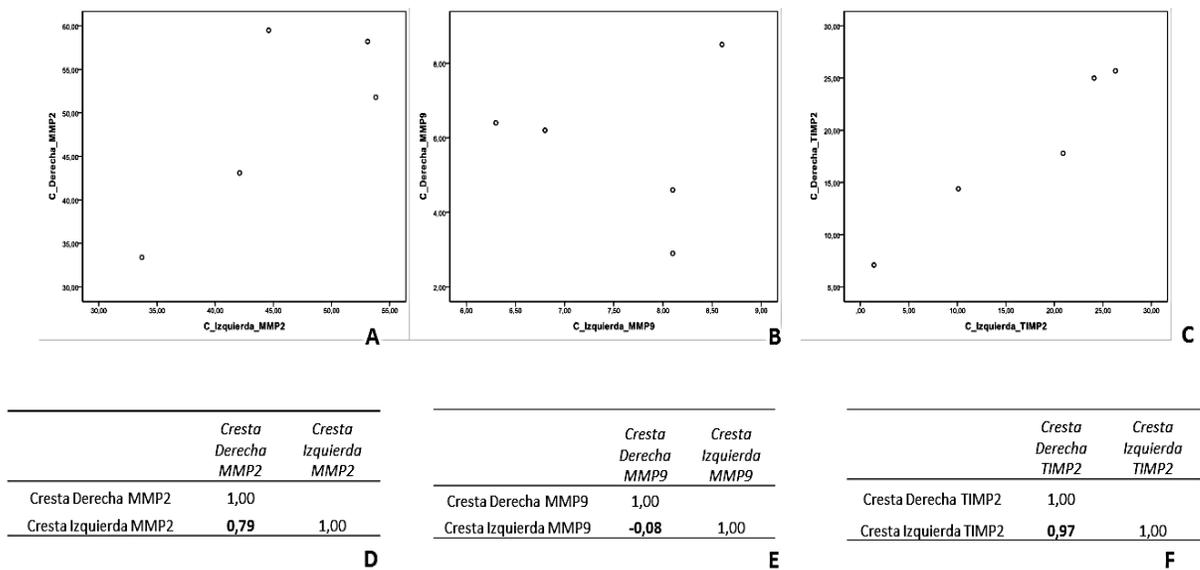


Figura 57. Correlación entre cresta derecha y cresta izquierda para MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región mesenquimal palatina, en el grupo obeso. (A, B, C) Gráficos de dispersión para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, respectivamente. (D, E, F) Matrices de correlación para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2.

11.5 Correlación entre crestas para cada uno de los marcadores MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en la región epitelial

Las figuras 58 y 60 muestran las correlaciones para cada uno de los marcadores MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, y su expresión entre CD y CI, en la región epitelial, para cada uno de los grupos (ctrol/Ob).

11.5.1 Grupo control

La **figura 58** muestra las correlaciones entre la cresta derecha y cresta izquierda en la región epitelial para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, en el grupo control. Para MMP-2 y MMP-9 (A/D, B/E) se encontró una correlación alta, MMP-2=0,84, MMP-9=0,96; Para el TIMP-2 (C, F) se halló una correlación negativa débil entre la cresta derecha e izquierda (-0,09).

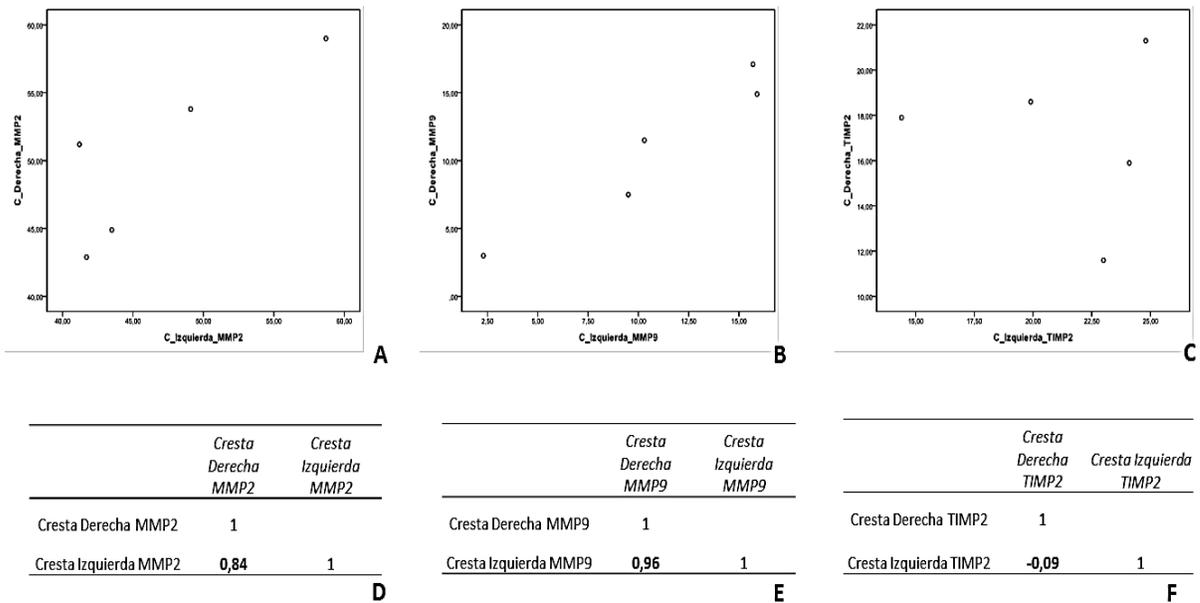


Figura 58. Correlación entre CD y CI para MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región epitelial en el grupo control. (A,B,C) Gráfico de dispersión para MMP2, MMP9 y TIMP2, respectivamente. (D, E, F) Matriz de correlación para MMP2, MMP9 y TIMP2, respectivamente.

11.5.2 Inmunomarcación de MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región epitelial del paladar en estadio de crecimiento vertical para el grupo control

La **figura 59** muestra los sitios de inmunomarcación para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el epitelio palatino en tres sitios diferentes: epitelio adyacente al gérmen dental, epitelio medial y epitelio nasal, para el grupo control, se observa una marcación mucho mayor para la MMP2 en el citoplasma de las células epiteliales en toda la región de la cresta. Mientras que para MMP9 la marcación fue menor limitada a la membrana basal epitelial y citoplasma de células epiteliales. Para TIMP2, la marcación fue mayor en la región epitelial adyacente al gérmen dental, y epitelio nasal, y algunas células epiteliales pertenecientes a la región oral y medial,

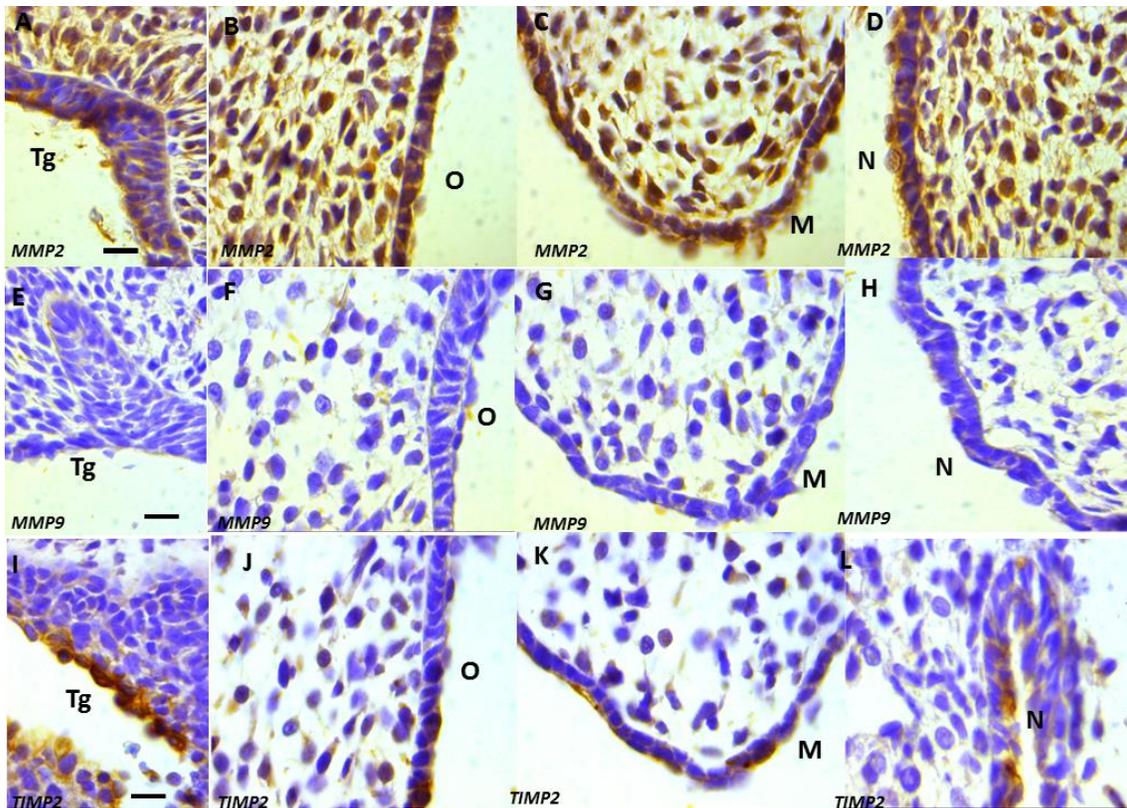


Figura 59. Inmunohistoquímica región epitelial para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de una cresta palatina perteneciente al grupo control. Aumento 100x. Tg (germen dental), O (epitelio oral), M, (epitelio medial), N (epitelio nasal) MMP-2 es la proteína con mayor expresión a nivel epitelial, seguido de TIMP-2 y por último MMP-9. Hay una expresión de MMP-2 (A, B, C, D) a nivel del citoplasma de las células epiteliales, en todas las regiones (Tg, O, M, N). MMP-9 (E, F, G, H) se

expresa levemente en el citoplasma de las células epiteliales, con una expresión más marcada a nivel de la lámina basal del epitelio que rodea el germen dental. Se observan células mesenquimales inmunomarcadas con MMP-9 alrededor del epitelio palatino. TIMP-2 (I, J, K, L) se expresa en las células peridermicas del epitelio palatino, con algunos citoplasmas de las células epiteliales inmunomarcadas a nivel del epitelio O y M. Hay un aumento de la expresión de TIMP-2 a nivel de las células peridermicas del epitelio de Tg. Barra en A; 20 μ m.

11.5.3 Grupo obeso

En la **figura 60** se muestra las correlaciones entre la cresta derecha y cresta izquierda en la región epitelial para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, en el grupo obeso. Se encontró una correlación positiva fuerte entre la cresta derecha y cresta izquierda para los tres marcadores: MMP-2=0,99, MMP-9=0,54 y TIMP-2=0,77.

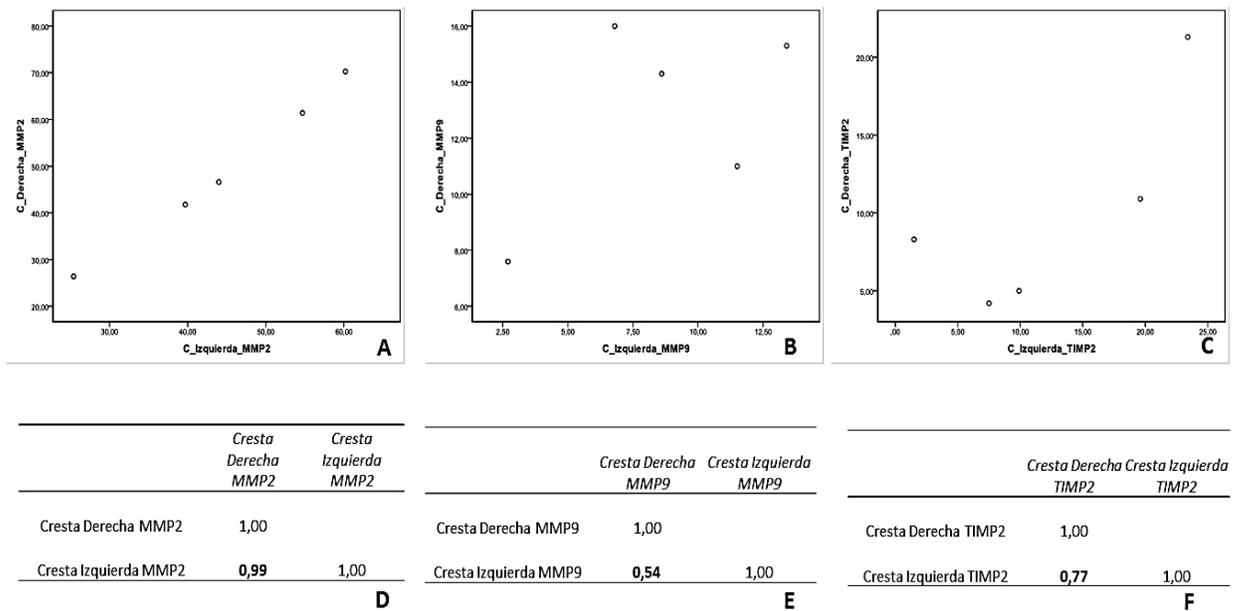


Figura 60. Correlación entre cresta derecha y cresta izquierda para MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región epitelial en el grupo obeso. (A, B, C) Gráfico de dispersión para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, respectivamente. (D, E, F) Matriz de correlación para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, respectivamente.

11.5.4 Inmunomarcación de MMP2, MMP9 y TIMP2 en la región epitelial del paladar en estadio de crecimiento vertical para el grupo obeso

La **figura 61**, muestra el patrón de expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en las regiones epiteliales de una cresta palatina de un biomodelo perteneciente al grupo obeso. El marcaje para MMP2 se observa en todas las regiones del epitelio palatino. La marcación de MMP9 se observa en el citoplasma de las células epiteliales y membrana basal. De manera interesante, la marcación para TIMP2 aumentó considerablemente en toda la zona epitelial de las crestas (gérmen dental, oral, medial y nasal) en comparación al grupo control.

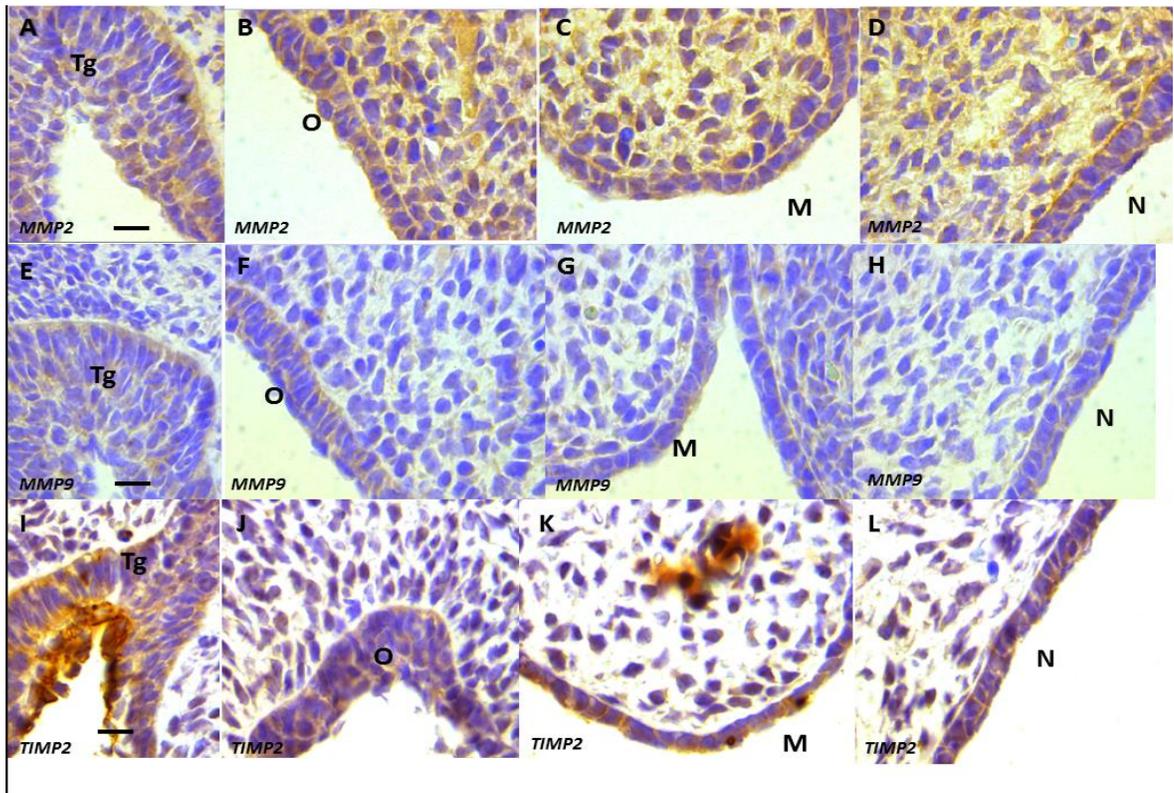


Figura 61. Inmunohistoquímica región epitelial para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 de una cresta palatina perteneciente al grupo Ob. Aumento 100x. Tg (germen dental), O (epitelio oral), M, (epitelio medial), N (epitelio nasal) Hay una expresión de MMP-2 (A, B, C, D) a nivel del citoplasma de las células epiteliales, en todas las regiones (Tg, O, M, N). MMP-9 (E, F, G, H) se expresa levemente en el citoplasma de las células epiteliales, con una expresión más marcada a nivel de la lámina basal del epitelio que rodea el germen dental. Se observan células mesenquimales inmunomarcadas con MMP-9 alrededor del epitelio palatino. TIMP-2 (I, J, K, L) se expresa en las células peridermicas del epitelio palatino, con

algunos citoplasmas de las células epiteliales inmunomarcadas a nivel del epitelio O y M. Hay un aumento de la expresión de TIMP-2 a nivel de las células peridermicas del epitelio de Tg. Barra; 20 μ m.

11.6 Correlación entre regiones mesenquimal y epitelial palatina según marcador MMP2, MMP9 y TIMP2

En las figuras 62 y 63 se muestran las correlaciones existentes para cada uno de los marcadores MMP2, MMP9 y TIMP2 en las regiones (epitelial y mesenquimal), considerando el grupo al que pertenecen (Ctrl/Ob).

11.6.1 Grupo control

En la **figura 62**, se encontró una correlación positiva fuerte entre la región mesenquimal y epitelial para MMP9=0,91. Por otro lado, hay una correlación negativa débil entre la región mesenquimal y epitelial de MMP-2= -0,13 y TIMP-2= -0,11.

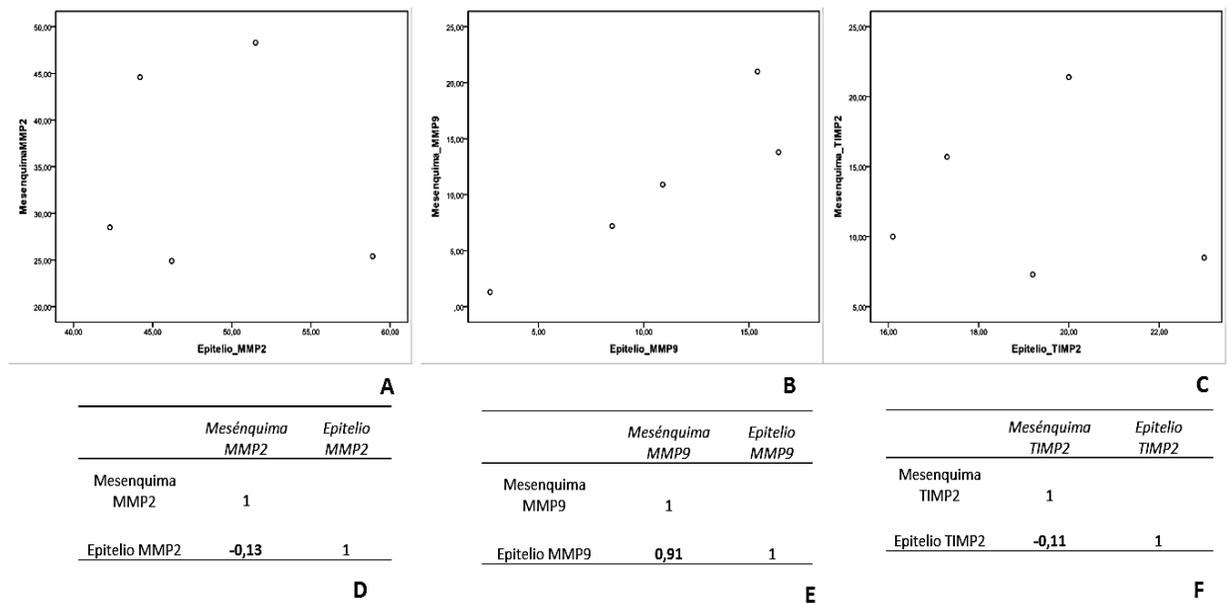


Figura 62. Correlación entre región mesenquimal y epitelial para MMP2, MMP9 y TIMP2 en el grupo control. (A, B, C) Gráfico de dispersión para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, respectivamente. (D, E, F) Matriz de correlación para MMP-, MMP-9 y TIM-2, respectivamente

11.6.2 Grupo obeso

En la **figura 63**, se evidencia una correlación positiva fuerte entre las regiones mesenquimal y palatina para los tres marcadores MMP-2, MMP-9 y TIMP-2. Siendo MMP2=0,81, MMP9=0,83 y TIMP2=0,61.

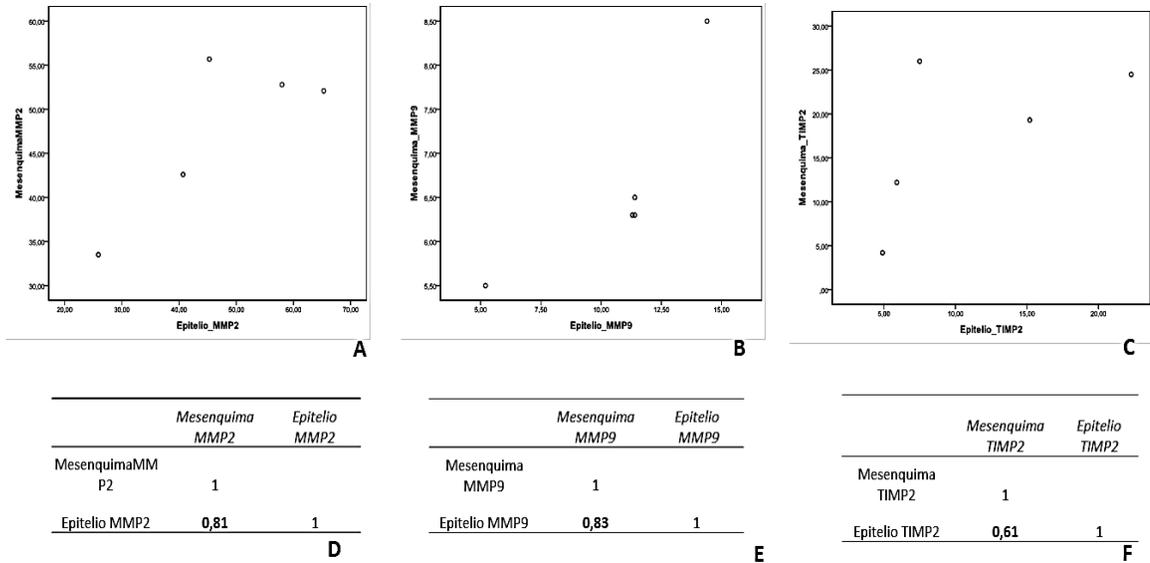


Figura 63. Correlación entre región mesenquimal y epitelial para MMP2, MMP9 y TIMP2 en el grupo obeso. (A, B,C) Gráfico de dispersión para MMP2, MMP9 y TIMP2, respectivamente. (D, E, F) Matriz de correlación para MMP2, MMP9 y TIMP2, respectivamente

11.7 Correlación entre crestas y estadio de la palatogénesis según el marcador MMP-2, MMP-9 y TIMP-2

La **tabla 12**, muestra la correlación encontrada entre las crestas (derecha e izquierda) y el estadio de la palatogénesis (iniciación, crecimiento vertical, elevación, adhesión y fusión) para cada uno de los marcadores (TIMP-2, MMP-2 y MMP-9), sin tener en cuenta el grupo. Hay una correlación negativa débil para la cresta derecha para TIMP2= -0,11 y MMP2= -0,44 y para la cresta izquierda una correlación positiva débil para TIMP-2= 0,28 y negativa fuerte para MMP-2= -0,68. (**Figuras 64-67**). Por otro lado, la cresta derecha e izquierda para MMP-9 tienen una correlación positiva fuerte de 0,81 y 0,84, respectivamente (**Figuras 68 y 69**).

	Cresta derecha TIMP2	Cresta izquierda TIMP2	Cresta derecha MMP2	Cresta izquierda MMP2	Cresta derecha MMP9	Cresta izquierda MMP9
Estadio	-0,11	0,28	-0,44	-0,68	0,81	0,84

Tabla 12. Matriz de correlación entre las crestas y el estadio de palatogénesis según marcador TIMP-2, MMP-2 y MMP-9

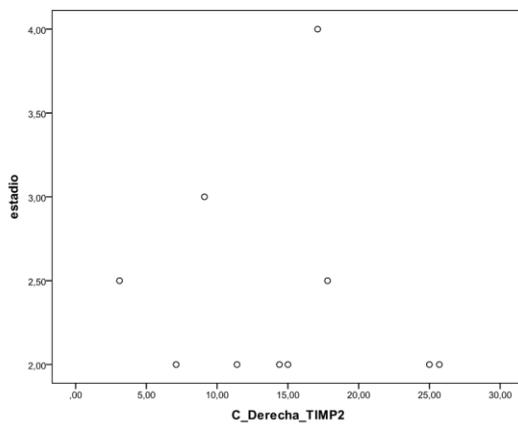


Figura 64. Diagrama de dispersión para TIMP2 en la cresta derecha, con el estadio de la palatogénesis.

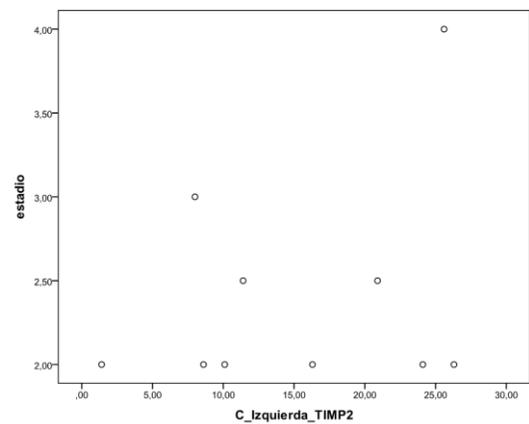


Figura 65. Diagrama de dispersión para TIMP2 en la cresta izquierda, con el estadio de la palatogénesis.

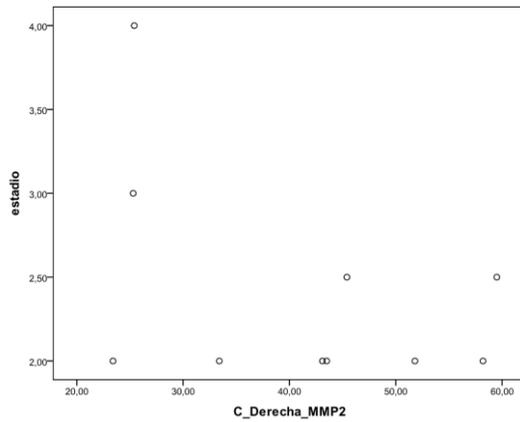


Figura 66. Diagrama de dispersión para MMP2 en la cresta derecha, con el estadio de la palatogénesis.

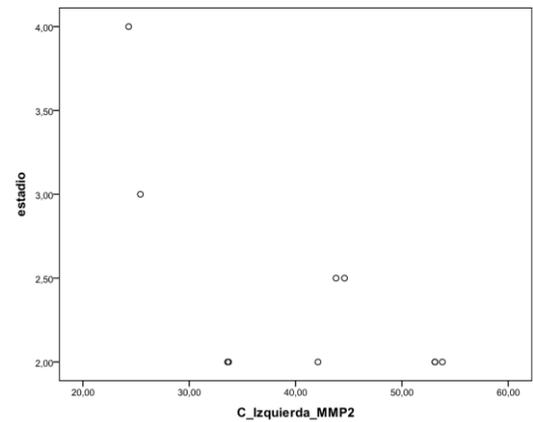


Figura 67. Diagrama de dispersión para MMP2 en la cresta izquierda, con el estadio de la palatogénesis.

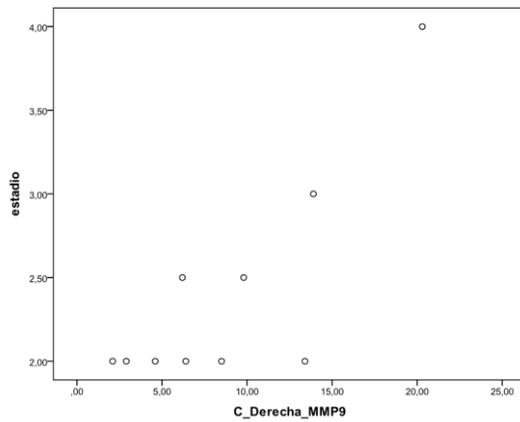


Figura 68. Diagrama de dispersión para MMP9 en la cresta derecha, con el estadio de la palatogénesis.

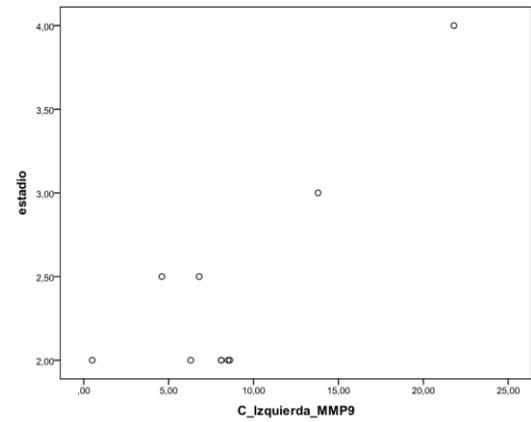


Figura 69. Diagrama de dispersión para MMP9 en la cresta izquierda, con el estadio de la palatogénesis.

En las figuras 70 y 71 se representa el patrón de expresión de cada uno de los marcadores MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el estadio de crecimiento vertical y elevación, sin considerar el grupo.

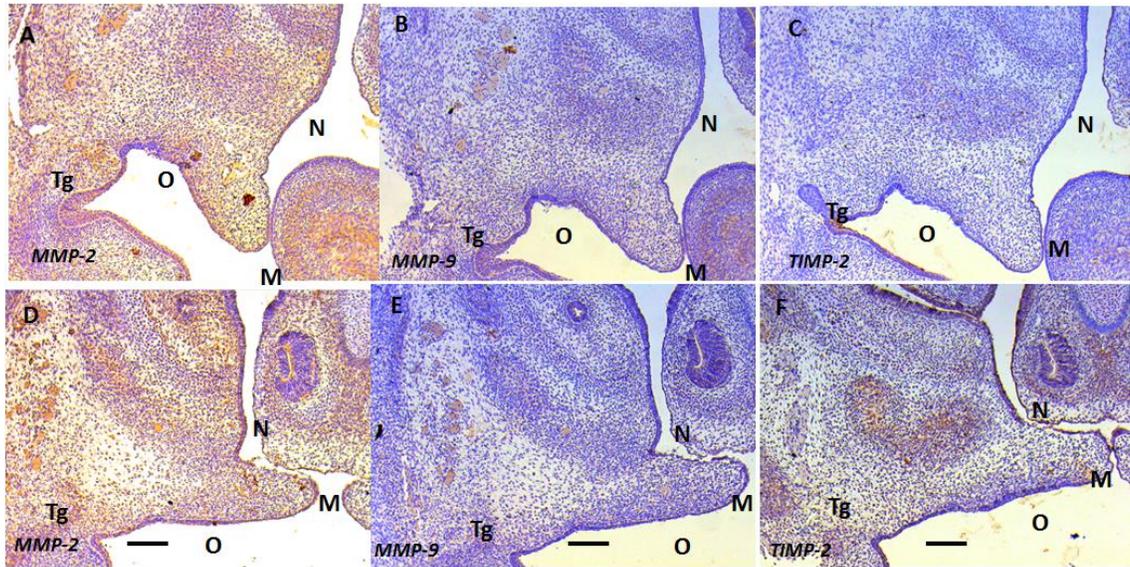


Figura 70. Expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el estadio de crecimiento vertical y elevación del paladar en rata Wistar E16.5. Aumento 10X. Estadio de crecimiento vertical se observa expresión de MMP-2 (A) en toda la región mesequimal y epitelial de la cresta, siendo mayor la distribución en el mesénquima de la región maxilar, medial y nasal. En la elevación (D) disminuye la expresión de MMP-2, y se encuentra mayor inmunomarcación en la región del mesénquima maxilar y medial. Para MMP-9 en el crecimiento vertical (B) hay una leve inmunomarcación, siendo mayor en la región mesequimal nasal, y en el periodo de elevación (E), aumenta la expresión a nivel de mesénquima maxilar y medial. Para TIMP-2, en el periodo de crecimiento vertical (C) hay una expresión en la región mesequimal nasal y maxilar, siendo mayor la inmunomarcación a nivel epitelial en la zona que rodea el germen (Tg). La inmunomarcación aumenta en la elevación (F), siendo mayor en la región mesequimal maxilar, y a nivel del EBM. Barra: 150 μ m.

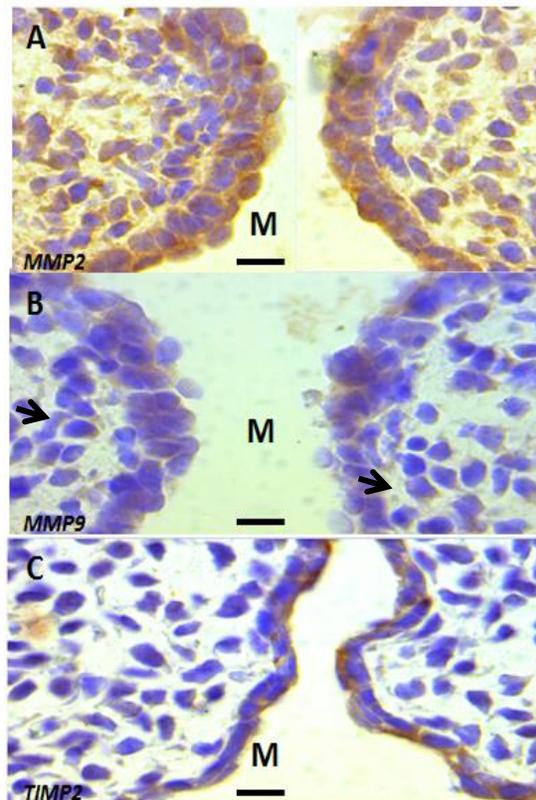


Figura 71. Comparación de la expresión celular de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en el EBM en el estadio de elevación de las crestas palatinas de rata Wistar E16.5. Aumento de 100x. Para MMP-2 (A) Se observa inmunomarcación positiva para las células epiteliales del EBM y las células mesenquimales adyacentes. Para MMP-9 (B) se observa inmunomarcación en el citoplasma de las células del EBM, y algunas células mesenquimales inmunomarcadas (indicadas en flechas). El TIMP-2 (C) presenta inmunomarcación positiva algunas células del EBM y células peridermicas. No se evidencian células mesenquimales inmunomarcadas. Barra: 20 μ m.

12. DISCUSIÓN

El desarrollo del paladar es un proceso complejo, donde están involucrados tanto factores extrínsecos como intrínsecos, entre ellos se destaca el medio ambiente, los hábitos de la madre, consumo de cigarrillo, de fármacos y la dieta; además de las vías de señalización que permitirán la fusión completa de las crestas palatinas^{112,154}. Cualquier alteración en este proceso llevará a la formación de diferentes defectos, entre los más comunes el labio y/o paladar fisurado.

Se han investigado diversos genes implicados en el cierre normal del paladar en modelos animales¹⁵⁵, sin embargo el 70% de los casos de labio y/o paladar fisurado son de tipo no sindrómico, lo que quiere decir que las influencias medioambientales juegan un papel crítico para la presencia de estas alteraciones.

La nutrición y la dieta materna son uno de los factores reguladores del desarrollo craneofacial puesto que pueden modular el riesgo de defectos craneales, fisuras oropalatinas y del cierre del tubo neural¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. Así, la discusión se orientará a los resultados encontrados en este trabajo en el biomodelo de obesidad materna asociados a las medidas lineales fetales, la expresión y localización de las proteínas MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en las crestas palatinas.

12.1 Modelo de obesidad inducida por dieta

Para el estudio de la obesidad, los modelos animales han sido de gran importancia para la comprensión de los procesos fisiológicos que regulan el equilibrio energético y la genética de la obesidad. Entre los biomodelos empleados se encuentran: aquellos que realizan mutaciones monogénicas de forma espontánea en colonias de ratones, otros, con mutaciones aleatorias, producto de agentes mutagénicos; modelos donde un gen específico ha sido alterado o sobreexpresado, y por último modelos animales que emplean otras especies como primates no humanos y perros¹⁶⁰. Sin embargo este tipo de modelos no simulan la realidad que se ve en la sociedad humana. Una de las hipótesis manejadas en la actualidad para explicar la pandemia de la obesidad en humanos, es la disponibilidad de alimentos elevados en grasa y carbohidratos.

Diferentes tipos de dieta han sido implementadas para el establecimiento de la obesidad en biomodelos, permitiendo el estudio de cambios comportamentales, el incremento de peso y las alteraciones que lleva consigo esta patología, como el síndrome metabólico, aterosclerosis y diabetes mellitus. Entre los tipos de dieta

reportados en la literatura, se encuentran las dietas altas en grasa, las dietas altas en carbohidratos y la dieta de cafetería (dieta de CAF)^{161,162}.

La dieta de CAF se fundamenta en el principio de que, es el animal el que selecciona entre alimentos ofertados que incluye galletas, dulces, queso y carnes procesadas además de la dieta estándar. Estos alimentos son ricos en sal, azúcar, grasa y tratan de simular la dieta humana del mundo Occidental¹⁶⁰. Algunos autores reportan como desventajas de este tipo de dieta, la dificultad de replicarla y la adquisición de los datos de los alimentos consumidos ¹⁶³. Sin embargo, publicaciones recientes demuestran que este es un modelo que ha sido estandarizado y permite la reproducibilidad y el amplio estudio de la obesidad¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Además, en este estudio se monitoreó el alimento consumido, y se calculó la ingesta total de los biomodelos, produciendo animales obesos a las seis semanas de alimentación¹⁵². Otros autores han reportado que esta dieta es un modelo adecuado para el estudio de la obesidad y el síndrome metabólico humano^{166,167}.

Entre algunas de las investigaciones realizadas en biomodelos de obesidad materna, se encuentran las de Bayol y colaboradores en el 2005 ¹⁶⁸. Estos autores emplearon ratas Wistar donde investigaron el efecto de la dieta de CAF durante la gestación y lactancia. El efecto de la dieta fue evaluado sobre el músculo esquelético y la celularidad del tejido adiposo, así como también los genes involucrados con el crecimiento muscular y metabolismo en la descendencia, encontrando que las ratas nacidas de madres alimentadas con dieta de cafetería exhibieron un 25% de reducción en el área seccional de músculo con aproximadamente 20% menos fibras compradas con los animales control. Bayol y colaboradores en el 2007 ¹⁶⁹ con el mismo modelo, encontraron que la dieta de CAF durante la gestación y la lactancia es un factor contribuyente para el desarrollo de la obesidad en la descendencia. Sin embargo, los estudios relacionados con dieta de cafetería y alteraciones craneofaciales y/o palatogénesis no han sido reportados previamente.

Trabajos previos reportados por nuestro grupo muestran que el biomodelo de obesidad generado presenta una disminución en su perfil reproductivo, que se ve reflejado en una reducción de la tasa de viabilidad embrionaria, acompañado por un incremento en la grasa retroperitoneal y gonadal¹⁷⁰. Esto se asocia con los hallazgos reportados por Bazzano y colaboradores en un modelo de obesidad inducida por dieta de cafetería. En este estudio las hembras presentan una reducción de la reserva ovárica y un aumento de quistes foliculares, lo que altera el proceso ovulatorio¹⁷¹.

12.2 Importancia de la nutrición materna en el desarrollo fetal

En el embarazo las demandas metabólicas incrementan, dado los cambios fisiológicos de la madre gestante y las exigencias del feto. En esta etapa se evidencia la importancia de un adecuado balance nutricional, dado que el consumo excesivo de macronutrientes, o la deficiencia en el consumo de proteínas, y/o vitaminas y deficiencia de minerales o el consumo de sustancias inapropiadas (alcoholismo) impactan de manera directa sobre el desarrollo embriofetal⁴².

Las dietas occidentales, están representadas por una dieta alta en energía y poca densidad nutricional, característica de la comida chatarra. Esta dieta que se asocia con la ausencia de la ingesta del desayuno y el alto consumo de bebidas azucaradas, provocan un desbalance nutricional, ya que la ingesta de micronutrientes es menor a los valores recomendados diariamente¹⁷²⁻¹⁷⁵. Por tal motivo, los micronutrientes constituyen uno de los temas más estudiados en salud pública, y la evidencia ha demostrado que un consumo inadecuado de micronutrientes tendrá repercusiones a nivel preconcepcional, fertilidad, concepción e implantación, placentación y embriogénesis⁶⁶.

Con lo que respecta a la embriogénesis, se ha enfocado gran interés en el rol del folato y ácido retinoico; un desbalance en el consumo y concentración de dichos nutrientes puede afectar procesos biológicos como: la proliferación, diferenciación celular alterada y un aumento en la apoptosis^{170,176}. Diferencias en la concentración celular de los nutrientes y sus intermediarios resultan en cambios hormonales relacionados con los nutrientes o alteraciones en las vías de señalización intracelulares. Ya se ha reportado previamente el rol que tienen el folato y la vitamina A o ácido retinoico en la expresión genética. El ácido fólico, o ácido pteroil L-glutámico, es conocido también como vitamina B9, es una vitamina hidrosoluble del complejo de vitaminas B, indispensable para la formación de proteínas estructurales como la hemoglobina. El Gen MTHFR está implicado en la metabolización del folato, polimorfismos en este gen se han asociado al aumento de riesgos de fisuras orofaciales¹⁷⁷. Además los bajos niveles de folato en el embarazo debido a la malnutrición y polimorfismos en el gen MTHFR C677T resulta en un aumento del riesgo de fisuras oropalatinas¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Además el ácido fólico tiene un rol crítico en el cierre del tubo neural, por tal motivo se recomienda que las mujeres en gestación consuman suplementos 0,4 mg/ diarios en el embarazo y 4.0 mg diarios en caso de tener historia de alteraciones en el cierre del tubo neural^{181,182}.

Por otro lado, la vitamina A es una molécula liposoluble de gran interés en la palatogénesis debido a que se une a receptores específicos de membrana o receptores intracelulares. El ácido retinoico participa en el desarrollo del sistema nervioso central, migración de la cresta neural¹⁸³. Un exceso de ácido retinoico puede saturar o inactivar sus receptores resultando en daño y reducción de la señalización. Se ha encontrado que las mujeres que consumen vitamina A temprano en el embarazo dan a luz niños con malformaciones en las estructuras derivadas de la cresta neural¹⁷⁶. Se recomienda que la ingesta de vitamina A sea por debajo de 300µg (10.000 IU)/ diarios, ya que niveles por encima de 9000 µg(30.000 IU)/ diarios pueden ser teratogénicos¹⁸⁴.

La deficiencia de zinc en etapas tempranas en el embarazo resulta en fallas de la implantación, abortos y malformaciones fetales, incluyendo labio y paladar hendido, malformaciones en el cerebro y ojo, anomalías cardíacas, y sistemas respiratorio y urogenital, lo cual ha sido demostrado en modelos animales¹⁸⁵. Esta deficiencia de zinc puede influenciar el desarrollo embrio-fetal debido a una disminución en la proliferación celular, o reducción en la síntesis de proteínas, aumento en el daño celular oxidativo o aumento de la apoptosis y reducción en la unión de hormonas y factores de transcripción de regiones de dedos de zinc¹⁸⁶.

Estudios en biomodelos demuestran que deficiencias nutricionales *in utero* pueden ocasionar un aumento significativo en el porcentaje de tejido graso visceral, disminución del tejido magro y aumento de marcadores de estrés oxidativo en el plasma ¹⁸⁷. Además de resistencia a la insulina y perfil de adipoquinas proaterogénicas durante la etapa adulta como hiperleptinemia o hipoadiponectinemia ¹⁸⁸.

En una revisión de la literatura publicada por Echeverry et al en el 2009¹⁸⁹, estos autores evidenciaron el efecto de los micronutrientes durante la gestación; encontraron que el zinc, magnesio, vitamina A y niacina previenen la disfunción endotelial, el estrés oxidativo y la alteración en los niveles de adipoquinas. La disminución de los niveles de zinc en humanos se ha asociado a alteraciones con disminución de leptina plasmática. Además de estados de estrés oxidativo, que se demuestra por el daño en el ADN, lípidos y proteínas. La deficiencia de magnesio en la gestación en biomodelos, muestra que las crías presentan mayor tejido adiposo visceral, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa y disminución de leptina. En cuanto al calcio, este inhibe la lipólisis y disminuye la adipogénesis, y en modelos en ratón la ingesta de este micronutriente reduce la producción de radicales libres estimulado por dietas hipercalóricas. Esto es debido a un aumento

de factores antiinflamatorios como adiponectina e IL-5 y disminución de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 en el tejido adiposo visceral.

Dados estos antecedentes, un desbalance en el consumo de carbohidratos, lípidos y una pobre dieta en micronutrientes puede afectar directamente la formación craneofacial, y se debe de dar vital importancia al papel del ácido fólico y la vitamina A ya que éstos últimos son críticos en la formación de las diferentes estructuras cráneo-maxilares.

12.3 Peso placentario y peso fetal

El peso de placenta y el peso fetal fueron equivalentes para ambos grupos experimentales. Ambos valores son indicadores del crecimiento fetal apropiado¹⁹⁰; siendo el peso fetal un indicador de la nutrición fetal, y de las funciones placentarias de transporte, metabolismo y endocrinas. Una razón del peso de la placenta/ peso fetal anormalmente baja puede indicar una placenta anormal con compromiso funcional, y un compromiso del medio intrauterino. Una razón aumentada presume disminución de las reservas placentarias: los fetos tienden a mostrar restricción del crecimiento intrauterino asimétrico, sugiriendo que pequeñas placentas limitan el óptimo crecimiento fetal¹⁹¹⁻¹⁹³. Estos resultados sugieren que el modelo de obesidad inducida por dieta de cafetería no provocó efectos en el tamaño de los biomodelos, ni restricción del crecimiento fetal. Sin embargo, se necesitan más estudios tendientes a comprobar la función de la placenta en el paso adecuado de los nutrientes al feto.

12.4 Medidas de edad fetal: Longitud cráneo rabadilla y estadio de Theiler

Las medidas de la longitud cráneo-rabadilla no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Estas mediciones son importantes para determinar el estadio de desarrollo fetal. En un modelo experimental de diabetes inducida por streptozotocina Kappen *et al*¹⁵⁸ evaluaron los efectos del pellet Lab diet 5001 y 5015, comparado con un grupo control, en ratones de la cepa FVB en diferentes estadios de desarrollo: E8.5, 9.5, 10.5, 12.5, 15.5 y 18.5. Encontraron una alta correlación de la longitud cráneo-rabadilla en el estadio 10.5 tanto en el grupo control como aquellos del grupo diabético, indicando que la longitud cráneo-caudal es adecuada para evaluar el tamaño total del embrión sin importar su estado metabólico. Sin embargo para estadios posteriores las diferencias se tornaron significativas. Esto sugiere que para el modelo de obesidad materna tanto la

longitud cráneo rabadilla y el estadio de Theiler es adecuada en ambos grupos en el estadio E16.5.

12.5 Medidas lineales fetales

Las medidas lineales fetales propuestas en este estudio, corresponden a medidas de tejidos blandos craneofaciales fetales tomadas desde las vistas, lateral, coronal y frontal, las cuales son de gran utilidad porque permiten describir y cuantificar de manera rápida y sencilla, asimetrías poco evidentes a simple vista, sin embargo en este estudio no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las medidas evaluadas para ambos grupos experimentales.

Los estudios reportados en la literatura sobre este tipo de medidas son escasos, ya que muchos se limitan a hacer una descripción visual de las asimetrías y/o alteraciones. A continuación se mencionan algunos estudios que resaltan la importancia de la morfometría lineal para la toma de medidas craneofaciales en biomodelos.

González y colaboradores ¹⁹⁴ evaluaron los efectos de la exposición temprana al ácido retinoico en fetos de rata Sprague Dawley en el estadio 22, tomando medidas lineales de referencia sagitales y frontales, como por ejemplo: la longitud maxilar, distancia entre los globos oculares, longitud antero-posterior de la cara, longitud del maxilar, y longitud mandibular; encontraron que ninguno de los fetos controles presentó malformaciones, y el 100% de los embriones tratados con ácido retinoico presentaron defectos craneofaciales, como fisuras faciales, exoftalmos, malformaciones e inserción baja de los pabellones auriculares. El análisis morfométrico reveló un aumento de la distancia entre los poros nasales, globos oculares y también una reducción de la distancia lateral del maxilar, y mandíbula.

García y colaboradores ¹⁹⁵, también evaluaron los cambios morfológicos, en fetos de rata Wistar en estadio 21 expuestos a una mezcla de etilenglicol celosolve. En este trabajo los autores determinaron el peso, longitud cráneo-rabadilla y tomaron las medidas craneofaciales en el plano frontal: el diámetro biparietal, distancia intercantal. En el plano sagital midieron la longitud occipital-nasal y la longitud mandibular. La distancia intercantal equivale a los puntos de referencia tomados en este trabajo. Sin embargo, la longitud occipital-nasal, tomaron como punto de referencia el cartílago nasal a diferencia de este estudio donde se tomó el punto nasion. De igual forma la distancia interparietal se tomó en el plano frontal,

mientras que en el estudio se tomó en la vista coronal. Estos autores encontraron anomalías atípicas en la morfología craneofacial, lengua protruida, edema, signos de retardo en el crecimiento, extremidades cortas, y la frecuencia y severidad aumentó en relación directa con el aumento de concentraciones en la mezcla.

Las medidas lineales morfométricas craneofaciales en rata Wistar han sido ampliamente estudiadas en desnutrición.¹⁹⁶⁻²⁰² Oyhenart *et al*, Miller *et al*, Cesani *et al*, Gonzales *et al*^{196,197,199}, han evidenciado el efecto de la desnutrición materna y el desarrollo craneofacial en ratas Wistar, por medio de la implementación de radiografías laterales y dorsoventrales, y toma de medidas lineales del neurocráneo y esplanocráneo, demostrando su utilidad para evidenciar cambios en las estructuras craneofaciales. Si bien en este estudio no se encontraron diferencias entre las medidas evaluadas en los grupos experimentales, esto en particular puede deberse al empleo de diferentes técnicas, ya que los autores citados evalúan tejidos duros y este estudio se evaluó tejidos blandos⁷⁷⁻⁸³.

La morfometría geométrica es otra técnica que ha sido empleada para realizar medidas craneofaciales en modelos experimentales. Esta técnica permite el análisis de la forma y el tamaño, usando datos de mediciones que son transformadas a datos resultantes que contienen información de la forma sola, y pueden ser analizados usando análisis multivariable y la visualización de herramientas que pueden localizar diferencias en la forma entre grupos^{203,204}. Autores como Young *et al*²⁰⁵, Parsons *et al*²⁰⁶, Olasdottir *et al*²⁰⁷ han empleado esta técnica con diferentes cepas de ratones para el estudio de la palatogénesis y síndromes craneofaciales, demostrando que es una manera más exacta de evidenciar cambios en la morfometría facial, sin embargo su complejidad radica en la dificultad para el establecimiento de puntos de referencia y la gran capacitación en la técnica que debe tener el evaluador.

La morfometría geométrica y lineal son técnicas complementarias que actualmente son utilizadas en el campo de las ciencias biomédicas y de diagnóstico craneofacial.

12.6 Estadio de la palatogénesis

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el estadio de la palatogénesis más frecuente en la rata Wistar E16.5 fue el de crecimiento vertical para ambos grupos experimentales, seguido de elevación horizontal, estadio intermedio y por último adhesión. Ninguno de los biomodelos evaluados presentó fusión completa del paladar. Estos resultados difieren con los reportados por Ferguson^{114,115}. Este autor estudió de manera detallada y descriptiva la

palatogénesis en la rata Wistar, a nivel macroscópico, microscópico y ultraestructural de E13 a E19, tomando el tapón vaginal como día 0, en el presente estudio equivale al día 0,5. Según este autor, la elevación del paladar ocurre entre el día 16.5 y 16.9; estas edades serían equivalentes al día 16 y 16.4 para nuestro estudio. Es importante considerar la “edad de desarrollo”; para esta estimación se tienen en cuenta las características morfológicas fetales externas, que fueron determinados por el estadio de Theiler. En este estudio la mayoría de los fetos estuvieron en estadio de Theiler 22. En el estudio de Zeiler *et al*¹¹⁷, se tuvieron en cuenta los criterios morfológicos y el desarrollo del paladar y compararon su valor en predecir las fases de desarrollo palatino con la edad cronológica en la rata Sprague-Dawley en los días E15 a E17 ¼. La edad cronológica se determinó considerando el día de apareo como “día cero”. Estos autores emplearon el método de medición de la longitud de los dedos de las patas y la medición mandibular y maxilar, determinando que la edad cronológica no es un buen predictor del desarrollo del paladar, sólo la medida de las patas es útil para la predicción cronológica de la palatogénesis, confirmado en el presente estudio donde el estadio de Theiler 22 fue el más frecuente y corresponde con un estadio de crecimiento vertical en las crestas palatinas, tanto para el grupo control y obeso, indicando que el estadio de la palatogénesis no se afectó en el modelo de obesidad materna inducida por dieta de cafetería.

12.7 Obesidad materna y metaloproteinasas de matriz en la palatogénesis

La palatogénesis es un proceso complejo que involucra la remodelación de la matriz extracelular. Muchos estudios en modelos murinos han determinado la expresión de estas proteasas en diferentes estadios de la palatogénesis.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en las crestas palatinas de rata Wistar E16.5, por primera vez en un modelo de obesidad inducida por dieta de cafetería.

La participación de MMPs y TIMPs en la palatogénesis de murinos ha sido previamente reportada^{29,30,113,124,146-149,208}. (Ver Anexo 17.14), sólo Morris *et al*, Brown *et al*²⁹, de Oliveira¹⁴⁹, y Gkantidis *et al*¹¹³, emplearon técnicas de inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia para evaluar la expresión de MMPs y TIMPs en la palatogénesis de murinos. Estos autores describieron las zonas de expresión de MMPs y TIMPs de manera cualitativa sin emplear la técnica de densitometría óptica.

12.7.1 Expresión de MMP-2 en el paladar de rata Wistar E16.5 para el grupo control/Ob

Los resultados encontrados de la expresión de MMP-2 tanto en el grupo control como en el obeso en el crecimiento vertical; demuestran que está presente en la región mesenquimal nasal, maxilar y oral. En la región epitelial se encontró en el citoplasma de células epiteliales y peridermicas. Estos resultados son similares a los de Oliveira et al¹⁴⁹ y Morris et al¹⁴⁷. Sin embargo, en el estudio de Morris et al¹⁴⁷ no se encontró expresión de MMP-2 en la región epitelial.

En la elevación horizontal la inmunomarcación mesenquimal aumentó, siendo mayor en la región maxilar, central, medial. Estos resultados son similares a los reportados por Morris et al¹⁴⁷ y de Oliveira et al¹⁴⁹. Esto se asocia con la diferenciación celular del linaje osteoblástico.

Las MMPs pueden degradar o modificar las proteínas de membrana basal y otros componentes de la MEC. Blavier et al³⁰, empleando la técnica de hibridación *in situ* observaron que la expresión del mensajero de la proteína MMP-2 se encuentra restringida a las células mesenquimales.

Pratt et al en 1973, propusieron que en la palatogénesis en rata, hay una acumulación de glucosaminoglicanos (GAGs), principalmente el ácido hialurónico, el cual consiste en moléculas cargadas electrostáticamente, capaces de unirse más de diez veces a su propio peso en agua y pocos cambios en su concentración resulta en cambios grandes de presión osmótica. El aumento de ácido hialurónico resulta en un aumento de contenido de agua de la matriz extracelular (MEC) y en la turgencia de las crestas palatinas y en la producción de una fuerza de elevación^{209,210}.

Singh et al en 1994, investigaron la composición de GAG en las crestas palatinas en rata en diferentes estadios de la palatogénesis²¹¹ y encontraron ácido hialurónico, heparan sulfato, y condroitin 4-sulfato. También hubo un aumento significativo en el porcentaje de ácido hialurónico en la reorientación y fusión palatina.

La MMP2 es una enzima clave en el metabolismo de la MEC que, es originalmente conocida por degradar gelatina, además hidrolisa el colágeno tipo IV (presente en las membranas basales), elastina, entactina, fibronectina, además de moléculas de fibrilina, que son componentes principales de la matriz extracelular

elástica de microfibrillas ²¹². Además, la MMP2 es capaz de unirse al colágeno tipo I nativo en los fragmentos N-terminal $\frac{3}{4}$ y los fragmentos $\frac{1}{4}$ C-terminal, una función típica de las colagenasas. Se ha descrito que los colágenos más abundantes en los paladares de murinos son el tipo I, III, y V ²¹³.

La MMP2 también regula el metabolismo de MEC mediante la interacción con moléculas de superficie celular como la integrina receptora de vitronectina $\alpha v\beta 3$. Una amplia distribución de MMP2 y su interacción con integrinas, la especificidad al sustrato y los mecanismos peculiares de expresión y activación, como su habilidad de adherirse a las macromoléculas de matriz (vía del dominio de fibronectina tipo II), sugiere que este proceso de activación de MMP-2 latente depende de la interacción cooperativa entre un número de moléculas diferentes en el ambiente pericelular. La interacción permite que MMP-2 tenga un rol en la regulación de las interacciones célula-célula, célula-matriz, que probablemente ocurren durante los cambios posicionales en las crestas palatinas durante la palatogénesis²¹⁴

12.7.2 Correlaciones de MMP2 para los grupos Ctrl/Ob

En el presente estudio, se analizó la localización de MMP-2 en los paladares del grupo control y obeso en el estadio E16.5. Los resultados muestran que las correlaciones entre el grupo control vs obeso en la región mesequimal y epitelial para la cresta derecha y cresta izquierda fueron altas para cada grupo; esto sugiere que las concentraciones aumentan de manera proporcional en ambas crestas.

Sin embargo las correlaciones entre la región mesequimal vs epitelial fueron negativas para el grupo control y positivas para el grupo obeso; lo que quiere decir que en el grupo control, la MMP-2 se comporta de forma independiente tanto en el mesénquima y en el epitelio, mientras que en el grupo obeso se encontró que si ésta enzima aumenta su expresión en el mesénquima, también lo hará en el epitelio.

La expresión elevada de MMP/TIMP ha sido asociada con muchas enfermedades del sistema nervioso central (SNC), enfermedad de Alzheimer, injuria cerebral isquémica, infecciones del SNC y esclerosis múltiple. Los niveles elevados de proteínas de MMP/TIMP han sido usualmente interpretadas con respecto a un aumento en la actividad proteolítica de MMPs y asociado a patologías²¹⁵. En condiciones de obesidad se ha demostrado que los adipocitos humanos producen y secretan MMP-2 y MMP-9, siendo estas enzimas reguladores clave de la diferenciación de adipocitos²¹⁶.

Gkantidis y Col¹¹³ demostraron la actividad gelatinolítica en la elevación del paladar, específicamente en la membrana basal y el mesénquima adyacente en el sitio exacto de la invaginación epitelial. Evidenciaron que después de que se forma la cavidad nasofaríngea encima del paladar secundario, la actividad gelatinolítica se mantiene asociada con el margen lateral del pliegue epitelial y aumenta en la elevación. El aumento de la actividad gelatinolítica se asocia a una formación de invaginaciones epiteliales. Además, la función de MMPs se ha asociado con una motilidad celular epitelial o incluso apoptosis. Además la contribución de la MMP2 en el epitelio indica una mayor degradación de colágeno tipo IV, un componente principal de la membrana basal²¹⁷. Bulleit y Zommerman²¹⁸ reportaron inhibición de la reorientación de las crestas palatinas por la remoción del epitelio oral en la reorientación del paladar secundario.

La correlación entre la expresión de MMP-2 en las crestas palatinas y el estadio de la palatogénesis, fue negativa, lo que quiere decir que el estadio de la palatogénesis no es determinante para la expresión de esta MMP, esto es corroborado por diferentes autores, donde demuestran la participación de MMP-2 en toda la formación del paladar^{113,146,147}.

12.7.3 Expresión de MMP-9 en el paladar de rata Wistar E16.5 para el grupo ctrl/Ob

En el estadio de crecimiento vertical, la inmunomarcación de MMP-9 fue leve en todas las regiones del mesénquima en crecimiento vertical para el grupo control y obeso, con una mayor expresión en la región del mesénquima nasal, y maxilar, aumentado en la membrana basal. También hubo una inmunomarcación positiva para todo el epitelio, a nivel citoplasmático y en las células peridermicas.

En la elevación de las crestas hubo una inmunomarcación positiva mayor a nivel del mesénquima central y maxilar. Estos resultados son similares a los encontrados por Morris *et al*¹⁴⁷, a diferencia que éstos, no encontraron inmunomarcación positiva de MMP-9 en la región epitelial. Por otro lado estudios recientes con Zimografía *in situ*, Gkantidis *et al*¹¹³, evaluaron la actividad gelatinolítica de MMP-2, MMP-9, encontrando que ésta actividad aumenta en la región epitelial previo a la fusión del paladar, además de otras regiones epiteliales, como los pliegues nasofaríngeos (estructuras evidentes cuando las crestas están elevadas), corroborando la presencia de las gelatinasas a nivel epitelial. Nuestros resultados difieren con los hallados por de Oliveira *et al*¹⁴⁹, ya que éstos no encontraron expresión de MMP-9 en el estadio de crecimiento vertical, sin

embargo en la elevación los resultados son similares a los hallados en este trabajo.

La poca expresión de MMP-9 en las crestas palatinas al inicio de la formación del paladar y la posterior expresión en estadios superiores, sugiere que células de la membrana basal y células diferenciadas, como osteoblastos y osteoclastos en sitios osteogénicos, son los responsables de la producción de esta MMP.^{149,219}

12.7.4 Correlaciones de MMP9 para los grupos Ctr/Ob

En la región mesenquimal la inmunomarcación de MMP-9 para las crestas, presentó una correlación positiva para el grupo control; mientras que para el grupo obeso la correlación fue negativa; esto indica que para el grupo control cuando la MMP-9 aumenta en una cresta, en la otra también; sin embargo para el grupo obeso hay una expresión diferencial en cada una de las crestas. En la región epitelial hubo una correlación positiva alta para ambas crestas en los dos grupos.

La correlación negativa para las crestas palatinas en la región mesenquimal, en el grupo obeso, sugiere que la dieta es un factor que influencia la reorganización del mesénquima, esto puede estar relacionado con un retardo o diferencia en la sincronía en la elevación de las crestas, dado que según lo reportado por los diferentes autores, éstos no encontraron una expresión diferencial de MMP-9 entre las crestas palatinas. Presentando esta metaloproteinasa una mayor participación una vez las crestas están en posición horizontal, lo que sugiere su importancia en el remodelación de la MEC y permitiendo el crecimiento de las crestas palatinas; ya que es producida por células diferenciadas.

Finalmente se encontró una correlación alta entre MMP-9 y el estadio de la palatogénesis. Lo que indica que el estadio de la palatogénesis es determinante para la expresión de esta proteína. Esto es confirmado por Oliveira y colaboradores¹⁴⁹, los cuales establecen que la MMP-9 se expresa en mayor proporción en el momento de la elevación palatina, y esto se asocia a una mayor diferenciación de las células osteoblásticas productoras de matriz.

12.7.5 Expresión de TIMP-2 en el paladar de rata Wistar E16.5 para los grupos Ctr/Ob

En el estadio de crecimiento vertical, para ambos grupos Ctr/Ob, el TIMP-2 se expresó en el mesénquima de las regiones maxilares y centrales, y en la membrana basal epitelial igual a lo reportado previamente por Morris et al¹⁴⁷. Sin

embargo, estos autores no encontraron expresión de TIMP-2 en la región epitelial, a diferencia de este estudio donde hubo expresión de TIMP-2 a nivel de las células peridermicas y una mayor expresión en las células epiteliales planas adyacentes al germen dental.

En la elevación del paladar la expresión de TIMP-2 aumentó en la región mesenquimal maxilar asociado a sitios osteogénicos y en la región medial de las crestas.

De manera interesante, en el grupo control la inmunomarcación de TIMP-2 en la región epitelial fue más restringida para ciertas células epiteliales, en diferentes regiones del germen dental, epitelio oral, medial y nasal. Sin embargo para el grupo obeso la inmunomarcación fue más intensa en toda la región epitelial, demarcada en el citoplasma de las células epiteliales.

12.7.6 Correlaciones de TIMP2 para los grupos Ctrial/Ob

Las correlaciones para la expresión de TIMP-2 en la región mesenquimal fueron positivas altas para ambos grupos, lo que indica que si en una cresta aumenta en la otra también lo hará.

Sin embargo, en la región epitelial la correlación fue negativa para el grupo control, lo que indica que la expresión de TIMP-2 en el epitelio es independiente en cada cresta, y para el grupo obeso la correlación fue positiva alta lo que indica que si en la cresta derecha aumenta en la izquierda también lo hará.

Los resultados de las correlaciones entre las regiones mesenquimal vs epitelial para TIMP-2 son negativas para el grupo control, lo que indica que el marcador se comporta de manera independiente en cada zona. Sin embargo, para el grupo obeso la correlación fue positiva alta, lo que indica que este marcador aumenta en ambas regiones (epitelial y mesenquimal).

Mecanismos normales de equilibrio biológico generan la producción de TIMPs, que buscan regular la actividad proteolítica de las MMPs. Posiblemente el aumento en la expresión de TIMP-2 en el epitelio del grupo obeso sugiere el probable rol protector desarrollado por los TIMPs que permite controlar la degeneración de la membrana basal epitelial²²⁰.

El TIMP-2 en el dominio C-terminal puede interactuar independiente de MMP, y el dominio N-terminal es involucrado directamente con MMP y es responsable de la inhibición de la actividad catalítica de las MMPs. Estudios recientes han mostrado que el TIMP-2 se une con la $\alpha 3\beta 1$ integrina por medio del dominio C-terminal²²¹,

pero esta interacción se ha encontrado que detiene el crecimiento celular.²²². La $\alpha 3\beta 1$ es un receptor que interactúa con ligandos como el colágeno, fibronectina y laminina 1 y 5. Esta integrina $\alpha 3\beta 1$ es expresada en una variedad de células tipo epitelial y su expresión es estimulada o correlacionada con la progresión en muchos tipos de cáncer, incluyendo el carcinoma escamocelular²²³. Algunas de las funciones de $\alpha 3\beta 1$ en células transformadas o inmortalizadas son atribuibles a la habilidad de $\alpha 3\beta 1$ de regular genes que estimulan la expresión de MMP-9 y ciclooxigenasa²²³. Esto sugiere que sobre-expresión de TIMP-2 en el epitelio del grupo obeso, podría inhibir la degradación epitelial.

Feldman et al encontraron que una sobreexpresión de TIMP-2 en las células cancerígenas de colon inhiben el crecimiento tumoral y la angiogénesis in vivo. Además, TIMP-2 mejora la expresión de RECK (the reversal inducing cysteine rich protein with Kazal motif), una proteína de membrana con actividad inhibitoria para MMP-2, 9 y 14²²⁴. El aumento de RECK puede disminuir la expresión de MMP y llevar a una disminución de la migración celular.

Nieuwesteeg y colaboradores investigaron el papel de los dominios C- y N-terminal para TIMP-2 en embriones de *Xenopus laevis*, encontrando que una sobreexpresión de TIMP-2 con dominios N-C terminal resultan en severos defectos del desarrollo y muerte, y cambios en la expresión de MMP-2 y -9 indicando que los dominios individuales pueden regular MMPs mediante diferentes mecanismos.²²⁵

En cuanto a la expresión de TIMP-2 y el estadio de la palatogénesis, las correlaciones fueron negativas para ambas crestas, lo que indica que el estadio de la palatogénesis no es determinante para la expresión de TIMP-2, esto es corroborado por diferentes autores, donde se evidencia la participación de este inhibidor en estadios diferentes¹⁴⁷.

12.8 Regulación de micronutrientes en la expresión de MMPs/TIMPs

Este trabajo evidenció que una dieta rica en carbohidratos y lípidos y pobre en micronutrientes tiene una repercusión directa en la descendencia; provocando un desbalance en la expresión de MMPs/TIMPs en el paladar; demostrando una expresión diferencial de MMP-9 en el mesénquima palatino en el grupo obeso, además una correlación positiva de MMP-2 y TIMP-2 en la región epitelial y mesenquimal para el grupo obeso. Estos resultados pueden ser explicados por variaciones epigenéticas producto de la dieta de cafetería; ya que los

componentes dietéticos (como los aminoácidos, dieta alta en grasa o alta en glucosa, vitaminas, factores bioactivos) pueden afectar la función del genoma y la expresión genética *in utero* y durante la vida temprana²²⁶. La epigenética se define como la herencia de la información basada a nivel de la expresión de genes más que en la secuencia misma del gen. Este código epigenético incluye: el código de metilación del ADN; el código histónico (metilación, acetilación y fosforilación de histonas) y el código corregulador. La evidencia soporta cómo los nutrientes modifican el patrón de metilación del ADN, a gran escala o en locus específicos^{227,228}.

En los mamíferos, la embriogénesis temprana es el periodo más crítico para el establecimiento del epigenoma. Alguna alteración en estos programas en el tiempo puede ser irreversible y pueden conllevar a una desregulación de la expresión genética^{229,230}. Las alteraciones medioambientales como la nutrición pueden conllevar a marcas epigenéticas, que una vez establecidas, se mantienen estables en el tiempo²³¹. Algunos autores han reportado que la dieta materna alta en grasas puede alterar la metilación del ADN y la expresión genética en la descendencia; como es el caso de los cambios de metilación y expresión de los opioides y la dopamina de genes relacionados en el cerebro de la descendencia, metilación reducida y aumento de la expresión del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina-1^a (Cdkn1a) durante el desarrollo neonatal del hígado²³². Además, estudios recientes han evidenciado que la dieta alta en grasa en el embarazo y la lactancia induce a una hipermetilación del ADN, incluyendo genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos y colesterol²³³.

Por tal motivo, es de gran importancia para futuros estudios investigar los cambios epigenéticos inducidos por dieta de cafetería en genes implicados en el desarrollo palatino, ya que hay suficiente evidencia que soporta que el estado nutricional en el embarazo puede inducir alteraciones permanentes en la expresión genética, mediante modificaciones epigenéticas.

Esta investigación, permitió un mayor entendimiento de la influencia de los hábitos nutricionales de la madre en el desarrollo palatino, evidenciando un desbalance en la expresión de MMPs/TIMPs en el epitelio y mesénquima, demostrando que la dieta de cafetería es un modelo apropiado para el estudio de la obesidad y sus efectos en el desarrollo embrionario. La continuidad de este estudio se encuentra encaminada a seguir evaluando los cambios en MMPs/TIMPs en humanos; dado éstos son escasos y se han relacionado con polimorfismos en diversas metaloproteinasas asociados a la presencia de labio y paladar fisurado no sindrómico.

13. CONCLUSIONES

- El ácido fólico, zinc y ácido retinoico son micronutrientes, los cuales a diferentes concentraciones van a ser críticos para la formación del paladar y el cierre del tubo neural. La dieta de cafetería, es alta en macronutrientes; lípidos y carbohidratos y pobre en micronutrientes. Se estima que estas alteraciones en la dieta generen cambios epigenéticos en la regulación de las MMPs y TIMPs los cuales juegan un papel fundamental en la remodelación de la matriz extracelular y la formación completa del paladar.
- Las medidas lineales craneofaciales de tejidos blandos son una técnica sencilla, rápida y reproducible que pueden ser implementadas para el estudio de biomodelos en diferentes estadios de desarrollo, y se correlacionan ampliamente con las que se utilizan en las áreas clínicas para el diagnóstico de alteraciones craneofaciales. La obesidad materna no produjo cambios en las estructuras craneofaciales evaluadas, sin embargo, se encontraron alteraciones bioquímicas en los tejidos impliados en la formación del paladar.
- La dieta de cafetería produjo cambios en el patrón de expresión de MMP-9 en el mesénquima de las crestas palatinas del grupo obeso, lo cual se puede asociar a una alteración en la sincronía de elevación de las crestas palatinas.
- El estadio de la palatogénesis es un factor determinante para la mayor expresión de MMP-9, lo que indica que esta MMP aumenta con la diferenciación celular.
- La MMP-2 y TIMP-2 aumentaron su expresión en la región epitelial y mesenquimal del paladar en el grupo obeso, lo que sugiere un desbalance en el equilibrio MMP/TIMP en la palatogénesis.

14. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda para futuras investigaciones, la incorporación de estadios fetales posteriores para el estudio de MMP-2, MMP-9 y TIMP- 2 en los procesos de elevación, adhesión y cierre del paladar.
2. Complementar el estudio con técnicas de biología molecular que permitan evaluar la expresión del ARN mensajero de las proteínas evaluadas, así como también la evaluación de la actividad genatínolítica en el desarrollo palatino.
3. Proyectar futuras investigaciones que permitan abordar los cambios epigenéticos en la descendencia provocados por la dieta de cafetería.

15. DIVULGACIÓN

- ✓ **Presentación póster:** *Estudio de la palatogénesis en un biomodelo animal de obesidad materna inducida por dieta de cafetería*, IX Congreso Colombiano de Morfología. Pereira, Risaralda, octubre 31, Noviembre 1 y 2 del 2013.
- ✓ **Premio Nacional:** Primer puesto modalidad póster, IX Congreso Colombiano de Morfología. Pereira, Risaralda, octubre 31, Noviembre 1 y 2 del 2013
- ✓ **Resumen** publicado en la Revista Médica de Risaralda 2013; 19 (Suppl 2): i – XX

- ✓ **Presentación oral:** Comparación histológica del paladar Mus musculus en dos estadios, XV Simposio de investigaciones en salud, Universidad del Valle. Octubre de 2013
- ✓ **Resumen** publicado en Revista Gastrohnpup Año 2013 Volumen 15 Número 3: 168-169(julio-diciembre)

- ✓ **Presentación oral:** *Caracterización del desarrollo craneofacial en el estadio E16.5 en un modelo murino de obesidad*. XXV Encuentro Nacional de Investigación Odontológica, ACFO, Octubre 2, 3 y 4 de 2014, Santa Marta-Magdalena.
- ✓ **Resumen publicado en:** Memorias ACFO 2014 XXV Encuentro Nacional de Investigación Odontológica, Página 19.

- ❖ **Presentación póster:** *Descripción histológica del paladar de rata Wistar en estadio E16.5*, XVI Simposio de investigaciones en Salud Octubre 22 y 23 del 2014, Universidad del Valle
- ❖ **Resumen publicado en:** Revista Gastronhrip Año 2014 Volumen 16 3: 138-161 Página 142
- ❖ **Presentación oral:** Expresión de metaloproteinasas en el proceso de la palatogénesis, IV Seminario de Estomatología Pediátrica y Ortopedia Maxilar, realizado el 20 y 21 de noviembre de 2015, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá-Colombia
- ❖ **Publicación de artículos científicos:** Cuéllar E, Ortiz MA, Villavicencio J. Expresión de metaloproteinasas en el proceso de la palatogénesis: revisión de la literatura. Univ Odontol. 2014 Jul-Dic; 33 (71): [_http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.empp](http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.empp)

- ❖ Cuellar R, Pustovrh MC, The role of enamelysin (MMP-20) in tooth development: systematic review. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2016; 27 (1) 154-176.DOI: [http// dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v27n1a8](http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v27n1a8)

16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shetty P, Schmidhuber J. Introductory lecture the epidemiology and determinants of obesity in developed and developing countries. *Int J Vitam Nutr Res* 2006;76:157-162.
2. Racusin D, Stevens B, Campbell G, Aagaard KM. Obesity and the risk and detection of fetal malformations *Seminars in perinatology*: Elsevier; 2012: p. 213-221.
3. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *Jama* 2010;303:235-241.
4. Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *Jama* 2004;291:2847-2850.
5. Heslehurst N, Rankin J, Wilkinson J, Summerbell C. A nationally representative study of maternal obesity in England, UK: trends in incidence and demographic inequalities in 619 323 births, 1989–2007. *International Journal of Obesity* 2010;34:420-428.
6. Sahu MT, Agarwal A, Das V, Pandey A. Impact of maternal body mass index on obstetric outcome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2007;33:655-659.
7. Leung T, Leung T, Sahota D, Chan O, Chan L, Fung T et al. Trends in maternal obesity and associated risks of adverse pregnancy outcomes in a population of Chinese women. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2008;115:1529-1537.
8. Benkeser R, Biritwum R, Hill A. Prevalence of overweight and obesity and perception of healthy and desirable body size in urban, Ghanaian women. *Ghana medical journal* 2012;46:66-75.
9. Callaway LK, Prins JB, Chang AM, McIntyre HD. The prevalence and impact of overweight and obesity in an Australian obstetric population. *Medical Journal of Australia* 2006;184:56.
10. Colchero M, Sosa-Rubi S. Heterogeneity of income and lifestyle determinants of body weight among adult women in Mexico, 2006. *Social science & medicine* 2012;75:120-128.

11. Gutiérrez J, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L et al. Encuesta nacional de Salud y nutrición. Resultados nacionales: Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX); 2012.
12. Correia LL, Silveira DMld, Silva AC, Campos JS, Machado MMT, Rocha HAL et al. Prevalence and determinants of obesity and overweight among reproductive age women living in the semi-arid region of Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva* 2011;16:133-145.
13. Seabra G, Padilha PdC, Saunders C. Pregestational overweight and obesity: prevalence and outcome associated with pregnancy. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2011;33:348-353.
14. Nación MdSdl. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud: Documento de Resultados 2007: Ministerio de Salud de la Nación Buenos Aires; 2007.
15. Mardones F. Evolución de la antropometría materna y del peso de nacimiento en Chile, 1987-2000. *Revista chilena de nutrición* 2003;30:122-131.
16. Fonseca Centeno Z, social. Mdlp. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010–ENSIN. Bogotá: ICBF 2010.
17. Gamboa LF, Forero N. Body mass index as a standard of living measure: a different interpretation for the case of Colombia. Facultad de Economía, Universidad del Rosario 2009.
18. http://www.paho.org/chi/index.php?view=article&catid=662%3Arepresentacin-en-chile&id=179%3Aobesidad&format=pdf&option=com_content). *Obesidad*; 2007.(Citado el 28 de diciembre de 2015)
19. Cnattingius S, Bergstrom R, Lipworth L, Kramer MS. Prepregnancy weight and the risk of adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 1998;338:147-152.
20. Hendler I, Blackwell S, Bujold E, Treadwell M, Wolfe H, Sokol R et al. The impact of maternal obesity on midtrimester sonographic visualization of fetal cardiac and craniospinal structures. *International journal of obesity* 2004;28:1607-1611.
21. Watkins ML, Rasmussen SA, Honein MA, Botto LD, Moore CA. Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics* 2003;111:1152-1158.

22. Shaw GM, Velie EM, Schaffer D. Risk of neural tube defect—affected pregnancies among obese women. *Jama* 1996;275:1093-1096.
23. Wong S, Chan F, Cincotta R, Oats J, McIntyre H. Routine ultrasound screening in diabetic pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2002;19:171-176.
24. Cedergren MI. Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstetrics & Gynecology* 2004;103:219-224.
25. Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *Jama* 2009;301:636-650.
26. Werler MM, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Prepregnant weight in relation to risk of neural tube defects. *Jama* 1996;275:1089-1092.
27. Anderson JL, Waller DK, Canfield MA, Shaw GM, Watkins ML, Werler MM. Maternal obesity, gestational diabetes, and central nervous system birth defects *Epidemiology. United States*; 2005. p. 87-92.
28. Waller DK, Shaw GM, Rasmussen SA, Hobbs CA, Canfield MA, Siega-Riz A-M et al. Prepregnancy obesity as a risk factor for structural birth defects. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 2007;161:745-750.
29. Brown NL, Yarram SJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res* 2002;81:826-830.
30. Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, DeClerck YA, Kaartinen V. TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 2001;12:1457-1466.
31. Isaza C, LA M. Anomalías y síndromes asociados con labio y/o paladar hendido. *Colomb Med* 1991;20:55-61.
32. Li Z, Bowerman S, Heber D. Health ramifications of the obesity epidemic. *Surgical Clinics of North America* 2005;85:681-701.
33. Cedergren M, Kallen B. Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac J* 2005;42:367-371.
34. Cedergren MI, Kallen BA. Maternal obesity and infant heart defects. *Obes Res* 2003;11:1065-1071.

35. ACOG Committee Opinion number 315, September 2005. Obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2005;106:671-675.
36. Martineau M, Nelson-Piercy C. Venous thromboembolic disease and pregnancy. *Postgrad Med J* 2009;85:489-494.
37. Sirimi N, Goulis DG. Obesity in pregnancy. *Hormones* 2010;9:299-306.
38. Walsh SW. Obesity: a risk factor for preeclampsia. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:365-370.
39. Perlow JH, Morgan MA. Massive maternal obesity and perioperative cesarean morbidity. *American journal of obstetrics and gynecology* 1994;170:560-565.
40. Morin KH, Reilly L. Caring for obese pregnant women. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing* 2007;36:482-489.
41. Rosenn B. Obesity and diabetes: a recipe for obstetric complications. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2008;21:159-164.
42. Leddy MA, Power ML, Schulkin J. The impact of maternal obesity on maternal and fetal health. *Rev Obstet Gynecol* 2008;1:170-178.
43. Rasmussen SA, Chu SY, Kim SY, Schmid CH, Lau J. Maternal obesity and risk of neural tube defects: a metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:611-619.
44. Stott-Miller M, Heike CL, Kratz M, Starr JR. Increased risk of orofacial clefts associated with maternal obesity: case-control study and Monte Carlo-based bias analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2010;24:502-512.
45. Moore LL, Singer MR, Bradlee ML, Rothman KJ, Milunsky A. A prospective study of the risk of congenital defects associated with maternal obesity and diabetes mellitus. *Epidemiology* 2000;11:689-694.
46. Vujkovic M, Ocke MC, van der Spek PJ, Yazdanpanah N, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Maternal Western dietary patterns and the risk of developing a cleft lip with or without a cleft palate. *Obstet Gynecol* 2007;110:378-384.
47. Oddy WH, De Klerk NH, Miller M, Payne J, Bower C. Association of maternal pre-pregnancy weight with birth defects: evidence from a case-control

- study in Western Australia Aust N Z J Obstet Gynaecol. Australia; 2009. p. 11-15.
48. Blomberg MI, Kallen B. Maternal obesity and morbid obesity: the risk for birth defects in the offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88:35-40.
49. Izedonmwun OM, Cunningham C, Macfarlane TV. What is the Risk of Having Offspring with Cleft Lip/Palate in Pre-Maternal Obese/Overweight Women When Compared to Pre-Maternal Normal Weight Women? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of oral & maxillofacial research* 2015;6.
50. Gonzáles YG. Informe final del evento anomalías congénitas hasta el periodo epidemiológico 13 del año 2012: Instituto Nacional de Salud; 2012.
51. Duque AM, Estupiñán BA, Huertas PE. Labio y paladar fisurados en niños menores de 14 años *Colomb Med* 2002; 33: 108-112
52. Pachajoa H, Ariza Y, Isaza C, Mendez F. [Major birth defects in a third-level hospital in Cali, Colombia, 2004-2008]. *Rev Salud Publica (Bogota)* 2011;13:152-162.
53. Agredo AFL, Rincón APM, Borrero AMD. Caracterización de pacientes con fisuras labiopalatinas atendidos en el Hospital Universitario del Valle en el periodo 2002-2011. *Universitas Odontológica* 2014;33:8.
54. Serrano CA, Ruiz JM, Quiceno LF, Rodríguez MJ, Labio y/o paladar hendido: una revisión. *Ustasalud* 2009; 8: 44 - 52.
55. Iwata J-i, Parada C, Chai Y. The mechanism of TGF- β signaling during palate development. *Oral diseases* 2011;17:733-744.
56. Kaartinen V, Cui XM, Heisterkamp N, Groffen J, Shuler CF. Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev Dyn* 1997;209:255-260.
57. Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res* 2009;88:22-33.
58. Zambrano MA, López J, López M, Rojas N, Santo Tomás U, Odontóloga OU et al. Estudio comparativo del análisis cefalométrico posteroanterior de padres

con hijos con labio y/o paladar hendido no sindrómico y de padres con hijos sin hendidura. *Ustasalud Odontología* 2006; 5: 15-25

59. Cifuentes-Cifuentes Y, Arteaga-Díaz C, Infante-Contreras C, Clavijo-López EG, Quintero-Guzmán C. Prevalencia y caracterización de los recién nacidos con anomalías craneofaciales en el Instituto Materno Infantil de Bogotá. *Revista de Salud Pública* 2008;10:423-432.

60. Jamilian A, Nayeri F, Babayan A. Incidence of cleft lip and palate in Tehran. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 2007;25:174.

61. Rajabian MH, Sherkat M. An epidemiologic study of oral clefts in Iran: analysis of 1669 cases. *Cleft Palate–Craniofacial Journal*, March 2000, Vol. 37 No. 2

62. Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. *Journal of Pediatric Nursing* 2000;15:242-249.

63. Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human molecular genetics* 2004;13:R73-R81.

64. Salud O. Actualización de la Clasificación Internacional de Enfermedades, Décima Revisión (CIE-10). *Boletín Epidemiológico* 2010.

65. Fathallah Z. Effects of socioeconomic factors on the incidence and pattern of oro-facial cleft. *Basrah Journal of Surgery* 2007;13.

66. Cetin I, Berti C, Calabrese S. Role of micronutrients in the periconceptual period. *Hum Reprod Update* 2010;16:80-95.

67. Al Omari F, Al-Omari I. Cleft lip and palate in Jordan: birth prevalence rate. *The Cleft palate-craniofacial journal* 2004;41:609-612.

68. Cooper ME, Stone RA, Liu Y-e, Hu D-N, Melnick M, Marazita ML. Descriptive epidemiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China, from 1980 to 1989. *The Cleft palate-craniofacial journal* 2000;37:274-280.

69. Vanderas AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft palate J* 1987;24:216-225.

70. Otero L, Gutiérrez S, Cháves M, Vargas C, Bermúdez L. Association of MSX1 with nonsyndromic cleft lip and palate in a Colombian population. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* 2007;44:653-656.
71. Chavarriaga-Rosero J, González-Caicedo MX, Rocha-Buelvas A, Posada-López A, Agudelo-Suárez AA. Factores relacionados con la prevalencia de Labio y Paladar Hendido en la población atendida en el Hospital Infantil “Los Ángeles”. Municipio de Pasto (Colombia), 2003-2008. *Rev.CES Odont.*2011;24(2)33-41
72. de la Teja-Ángeles E, Durán-Gutiérrez A, Espinosa-Victoria L, Ramírez-Mayans JA. Manifestaciones estomatológicas de los trastornos sistémicos más frecuentes en el Instituto Nacional de Pediatría. Revisión de la literatura y estadísticas del instituto. *Acta Pediátrica de México* 2008;29.
73. Hurtado A, Rojas L, Sanchez D, García A, Ortiz M, Aguirre A. Prevalencia de caries y alteraciones dentarias en niños con labio fisurado y paladar hendido de una fundación de Santiago de Cali. *Revista Estomatología* 2008;16.
74. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 1997;4:211-232.
75. Claffey KP, Wilkison W, Spiegelman B. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:16317-16322.
76. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
77. Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circulation research* 1998;83:1059-1066.
78. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 1993;28:500-510.
79. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* 2011;12:233.
80. Pustovrh MC, Capobianco E, Martinez N, Higa R, White V, Jawerbaum A. MMP/ TIMP balance is modulated in vitro by 15dPGJ(2) in fetuses and placentas from diabetic rats. *Eur J Clin Invest* 2009;39:1082-1090.

81. Lijnen H, Maquoi E, Holvoet P, Mertens A, Lupu F, Morange P et al. Adipose tissue expression of gelatinases in mouse models of obesity. *Thromb Haemost* 2001;85:1111-1116.
82. Maquoi E, Munaut C, Colige A, Collen D, Lijnen HR. Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. *Diabetes* 2002;51:1093-1101.
83. Bauters D, Scroyen I, Van Hul M, Lijnen HR. Gelatinase A (MMP-2) promotes murine adipogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2015;1850:1449-1456.
84. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Ramirez B, Silva C, Rotellar F et al. Increased adipose tissue expression of lipocalin-2 in obesity is related to inflammation and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities in humans. *Journal of molecular medicine* 2009;87:803-813.
85. Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Tinelli C, Salvadeo S, Ciccarelli L et al. Matrix metalloproteinase-2 and-9 levels in obese patients. *Endothelium* 2008;15:219-224.
86. Cuéllar E, Salazar MAO, Flórez JV. Expresión de metaloproteinasas en el proceso de palatogénesis: revisión sistemática de la literatura/Expression of Metalloproteinases in Palate Development: Systematic Literature Review. *Universitas Odontologica* 2015;33:31-42.
87. Locascio A, Nieto MA. Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Current opinion in genetics & development* 2001;11:464-469.
88. Odell GM, Oster G, Alberch P, Burnside B. The mechanical basis of morphogenesis: I. Epithelial folding and invagination. *Developmental biology* 1981;85:446-462.
89. Narasimha M, Leptin M. Cell movements during gastrulation: come in and be induced. *Trends in cell biology* 2000;10:169-172.
90. Moore KL, Persaud T, Shiota K. Atlas de embriología clínica. Ed. Médica Panamericana; 1996.
91. Flores Cruz MG, Escobar A. Migración neural normal. *Salud mental* 2011;34:61-66.

92. Montiel-Eulefi E, Montiel JF. Origen y migración de células troncales. *International Journal of Morphology* 2012;30:1332-1337.
93. Chávez Viamontes José Ángel. Consideraciones sobre las teorías de la neurulación en humanos. *AMC [Internet]*. 2012 Feb [citado 2016 Mayo 05]; 16(1): 1-4. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552012000100001&lng=es.
94. Spörle R, Schughart K. Neural tube morphogenesis. *Current opinion in genetics & development* 1997;7:507-512.
95. Scott LA. Oocyte and embryo polarity *Seminars in reproductive medicine*; 1999: p. 171-183.
96. Revuelta R. La cavidad bucal del nacimiento a la infancia: Desarrollo, patologías y cuidados. *Perinatol Reprod Hum [Internet]* 2009;23.
97. Gómez de Ferraris M. Campos Muñoz A. *Histología y embriología bucodental*. 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana 2002.
98. Veitch E, Begbie J, Schilling TF, Smith MM, Graham A. Pharyngeal arch patterning in the absence of neural crest. *Current Biology* 1999;9:1481-1484.
99. Szabo-Rogers HL, Smithers LE, Yakob W, Liu KJ. New directions in craniofacial morphogenesis. *Developmental biology* 2010;341:84-94.
100. Eames BF, Schneider RA. The genesis of cartilage size and shape during development and evolution. *Development* 2008;135:3947-3958.
101. Baltzinger M, Ori M, Pasqualetti M, Nardi I, Rijli FM. Hoxa2 knockdown in *Xenopus* results in hyoid to mandibular homeosis. *Developmental dynamics* 2005;234:858-867.
102. Sadler TW, Langman J. *Langman embriología médica: con orientación clínica*. Ed. Médica Panamericana; 2007.
103. Minoux M, Rijli FM. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development* 2010;137:2605-2621.

104. Chai Y, Maxson RE. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Developmental Dynamics* 2006;235:2353-2375.
105. Richman JM, Lee SH. About face: signals and genes controlling jaw patterning and identity in vertebrates. *Bioessays* 2003;25:554-568.
106. Gritli-Linde A. Molecular control of secondary palate development. *Dev Biol* 2007;301:309-326.
107. Cuervo R, Covarrubias L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development* 2004;131:15-24.
108. Parada CE, Bayona F. Palatogénesis y hendiduras palatinas: implicación de TGF [beta] 3 y BMPS. *Acta Biológica Colombiana* 2004;9:13.
109. Montenegro MA, Rojas M. Aspectos Moleculares en la Formación de la Cara y del Paladar. *International Journal of Morphology* 2005;23:185-194.
110. Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG. Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet* 1992;51:1377-1385.
111. Ray HJ, Niswander L. Mechanisms of tissue fusion during development. *Development* 2012;139:1701-1711.
112. Bush JO, Jiang R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development* 2012;139:231-243.
113. Gkantidis N, Blumer S, Katsaros C, Graf D, Chiquet M. Site-specific expression of gelatinolytic activity during morphogenesis of the secondary palate in the mouse embryo. *PLoS One* 2012;7:e47762.
114. Ferguson MW. Palatal shelf elevation in the Wistar rat fetus. *J Anat* 1978;125:555-577.
115. Ferguson MW. Palate development. *Development* 1988;103:41-60.
116. Asling CW, Nelson MM, Dougherty HD, Wright HV, Evans HM. The development of cleft palate resulting from maternal pteroylglutamic (folic) acid deficiency during the latter half of gestation in rats. *Surg Gynecol Obstet* 1960;111:19-28.

117. Zeiler KB, Weinstein S, Gibson RD. A study of the morphology and the time of closure of the palate in the albino rat. *Arch Oral Biol* 1964;9:545-554.
118. Coleman R. Development of the rat palate. *The Anatomical Record* 1965;151:107-117.
119. Walker BE. Correlation of embryonic movement with palate closure in mice. *Teratology* 1969;2:191-197.
120. Ross RB, Lindsay WK. The cervical vertebrae as a factor in etiology of cleft palate. *Cleft Palate J* 1965;36:273-281.
121. Walker B, Fraser F. Closure of the secondary palate in three strains of mice. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1956;4:176-189.
122. Hassel JR, Orkin RW. Synthesis and distribution of collagen in the rat palate during shelf elevation. *Dev Biol* 1976;49:80-88.
123. Moss ML, Salentijn L. The primary role of functional matrices in facial growth. *American journal of orthodontics* 1969;55:566-577.
124. Hirata A, Katayama K, Tsuji T, Natsume N, Sugahara T, Koga Y et al. Heparanase localization during palatogenesis in mice. *Biomed Res Int* 2013;2013:760236.
125. Brown GD, Nazarali AJ. Matrix metalloproteinase-25 has a functional role in mouse secondary palate development and is a downstream target of TGF-beta3. *BMC Dev Biol* 2010;10:93.
126. Evrosimovska B, Velickovski B, Dimova C, Veleska-Stefkovska D. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases). *Journal of Cell and Animal Biology* 2011;5:113-120.
127. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006;11:1696-1701.
128. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
129. Salo T, Liotta LA, Tryggvason K. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 1983;258:3058-3063.

130. Murphy G, McAlpine CG, Poll CT, Reynolds JJ. Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1985;831:49-58.
131. Seltzer JL, Eschbach ML, Eisen AZ. Purification of gelatin-specific neutral protease from human skin by conventional and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1985;326:147-155.
132. Nakano T, Scott PG. Purification and characterization of a gelatinase produced by fibroblasts from human gingiva. *Biochemistry and Cell Biology* 1986;64:387-393.
133. Collier IE, Krasnov PA, Strongin AY, Birkedal-Hansen H, Goldberg GI. Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:6776-6781.
134. Clark IM, Young DA, Rowan AD. *Matrix metalloproteinase protocols*. Springer; 2001.
135. Sopata I, Wize J. A latent gelatin specific proteinase of human leucocytes and its activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 1979;571:305-312.
136. Mainardi CL, Seyer JM, Kang AH. Type-specific collagenolysis: a type V collagen-degrading enzyme from macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 1980;97:1108-1115.
137. Rantala-ryhänen S, Ryhänen L, Nowak FV, Uitto J. Proteinases in human polymorphonuclear leukocytes. *European Journal of Biochemistry* 1983;134:129-137.
138. Wilhelm S, Collier I, Marmer B, Eisen A, Grant G, Goldberg G. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:17213-17221.
139. Goldberg GI, Strongin A, Collier I, Genrich L, Marmer B. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of

the proenzyme with stromelysin. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:4583-4591.

140. Meng N, Li Y, Zhang H, Sun X-F. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. *Histol Histopathol* (2008) 23: 1003-1010141. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends in Genetics* 1990;6:121-125.

142. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb j* 1991;5:2145-2154.

143. Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004;48:411-424.

144. Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi A-L, Karjalainen-Lindsberg M-L, Kähäri V-M et al. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *Journal of Investigative Dermatology* 1997;109:96-101.

145. Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood* 1997;89:1708-1715.

146. Morris-Wiman J, Du Y, Brinkley L. Occurrence and temporal variation in matrix metalloproteinases and their inhibitors during murine secondary palatal morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1999;19:201-212.

147. Morris-Wiman J, Burch H, Basco E. Temporospacial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 2000;202:129-141.

148. Mansell JP, Kerrigan J, McGill J, Bailey J, TeKoppele J, Sandy JR. Temporal changes in collagen composition and metabolism during rodent palatogenesis. *Mech Ageing Dev* 2000;119:49-62.

149. de Oliveira Demarchi AC, Zambuzzi WF, Paiva KB, da Silva-Valenzuela M, Nunes FD, de Cassia Savio Figueira R et al. Development of secondary palate requires strict regulation of ECM remodeling: sequential distribution of RECK, MMP-2, MMP-3, and MMP-9. *Cell Tissue Res* 2010;340:61-69.

150. Letra A, Silva RM, Motta LG, Blanton SH, Hecht JT, Granjeirol JM et al. Association of MMP3 and TIMP2 promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012;94:540-548.
151. Salazar DHR (2014). Evaluación de músculos sometidos a periodos de isquemia inducida y reperfusión: análisis histoquímico y morfométrico Morfología (Trabajo de grado Maestría). Cali-Valle: Universidad del Valle
152. Smith MY, Aleyda HS, David M, Carolina P, Liliana S. Perfil bioquímico de un modelo de obesidad inducido por dieta. *Revista Gastrohup Año 2014 Volumen 16 Número 3: 138-161*
153. Theiler K. *The house mouse: atlas of embryonic development*. Springer Science & Business Media; 2013.
154. Zhu H, Kartiko S, Finnell RH. Importance of gene-environment interactions in the etiology of selected birth defects *Clin Genet. Denmark; 2009. p. 409-423.*
155. Cobourne MT. The complex genetics of cleft lip and palate. *The European Journal of Orthodontics* 2004;26:7-16.
156. Krapels IP, Vermeij-Keers C, Müller M, de Klein A, Steegers-Theunissen RP. Nutrition and genes in the development of orofacial clefting. *Nutrition reviews* 2006;64:280-288.
157. Kutbi HA. The role of obesity, diabetes, and hypertension in cleft lip and cleft palate birth defects 2014.
158. Kappen C, Kruger C, MacGowan J, Salbaum JM. Maternal diet modulates the risk for neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Reprod Toxicol* 2011;31:41-49.
159. Kappen C. Modeling anterior development in mice: diet as modulator of risk for neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2013;163c:333-356.
160. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. *Laboratory Animals. Laboratory Animals* 2008;42:413J432.
161. Gajda AM. High fat diets for diet-induced obesity models. *J Res Diets* 2009.
- 162 Rothwell NJ, Stock MJ. The cafeteria diet as a tool for studies of thermogenesis. *J Nutr* 1988;118:925-928.

163. Moore BJ. The cafeteria diet--an inappropriate tool for studies of thermogenesis. *The Journal of nutrition* 1987;117:227-231.
164. De Schepper JA, Smitz JP, Zhou XL, Louis O, Velkeniers BE, Vanhaelst L. Cafeteria diet-induced obesity is associated with a low spontaneous growth hormone secretion and normal plasma insulin-like growth factor-I concentrations. *Growth Horm IGF Res* 1998;8:397-401.
165. López IP, Marti A, Milagro FI, Zulet MdA, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA et al. DNA Microarray Analysis of Genes Differentially Expressed in Diet-Induced (Cafeteria) Obese Rats. *Obesity research* 2003;11:188-194.
166. Lalanza JF, Caimari A, del Bas JM, Torregrosa D, Cigarroa I, Pallàs M et al. Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: Metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour 2014.
167. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity* 2011;19:1109-1117.
168. Bayol SA, Simbi BH, Stickland NC. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *The Journal of physiology* 2005;567:951-961.
169. Bayol SA, Farrington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food'diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food'and a greater propensity for obesity in rat offspring. *British Journal of Nutrition* 2007;98:843-851.
170. Tejada ME, Pustovrh MC, Salazar L, Reproductive profile of a murine model of diet induced obesity *Placenta* 2015;36:469-521.
171. Bazzano M, Torelli C, Pustovrh M, Paz D, Elia E. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reproductive biomedicine online* 2015;31:655-667.
172. Nicklas TA, Baranowski T, Cullen KW, Berenson G. Eating patterns, dietary quality and obesity. *Journal of the American College of Nutrition* 2001;20:599-608.

173. Paeratakul S, Ferdinand DP, Champagne CM, Ryan DH, Bray GA. Fast-food consumption among US adults and children: dietary and nutrient intake profile. *Journal of the American dietetic Association* 2003;103:1332-1338.
174. Drewnowski A, Specter S. Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. *The American journal of clinical nutrition* 2004;79:6-16.
175. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American journal of clinical nutrition* 2005;81:341-354.
176. Finnell RH, Shaw GM, Lammer EJ, Brandl KL, Carmichael SL, Rosenquist TH. Gene–nutrient interactions: importance of folates and retinoids during early embryogenesis. *Toxicology and applied pharmacology* 2004;198:75-85.
177. Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J et al. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 2004;24:104-105.
178. van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocké MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM et al. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *American journal of epidemiology* 2003;157:583-591.
179. van Rooij IA, Ocké MC, Straatman H, Zielhuis GA, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Preventive medicine* 2004;39:689-694.
180. Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman AM, Spauwen PH, Steegers EA, Thomas CM et al. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology* 1999;60:253-257.
181. Geisel J. Folic acid and neural tube defects in pregnancy: a review. *The Journal of perinatal & neonatal nursing* 2003;17:268-279.
182. Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *The American journal of clinical nutrition* 2007;85:285S-288S.
183. Maden M, Gale E, Kostetskii I, Zile M. Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Current Biology* 1996;6:417-426.

184. Miller RK, Hendrickx AG, Mills JL, Hummler H, Wiegand U-w. Periconceptional vitamin A use: how much is teratogenic? *Reproductive Toxicology* 1998;12:75-88.
185. Keen CL, Clegg MS, Hanna LA, Lanoue L, Rogers JM, Daston GP et al. The plausibility of micronutrient deficiencies being a significant contributing factor to the occurrence of pregnancy complications. *The Journal of nutrition* 2003;133:1597S-1605S.
186. Mackenzie GG, Zago MP, Keen CL, Oteiza PI. Low intracellular zinc impairs the translocation of activated NF- κ B to the nuclei in human neuroblastoma IMR-32 cells. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:34610-34617.
187. Venu L, Harishankar N, Krishna TP, Raghunath M. Does maternal dietary mineral restriction per se predispose the offspring to insulin resistance? *European journal of endocrinology* 2004;151:287-294.
188. Lagishetty V, Nandiwada VB, Kalashikam RR, Manchala R. Effect of maternal vitamin and mineral restrictions on the body fat content and adipocytokine levels of WNIN rat offspring. *Nutrition & metabolism* 2007;4:1.
189. Echeverry I, Ramírez-Vélez R, Ortega J, Mosquera M, Mateus JC, Aguilar A. Efecto potencial del ejercicio físico y del consumo de micronutrientes durante la gestación en factores maternos y placentarios asociados con enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) del adulto. *Colomb Med* 2009;4:448-459.
190. Stieve H. Feto-placental weight ratio. *Anay Anz* 1940;90:225-242.
191. Boyd J, Hamilton W. General description of specimens: statistics of placental growth. *The human placenta*. Cambridge, England: W Heffer and Sons, Ltd 1970;112.
192. Pardi G, Marconi AM, Cetin I. Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses—a review. *Placenta* 2002;23:S136-S141.
193. Cardoso V, Mazzitelli N, Veiga MA, Furlán R, Grandi C. Medidas del crecimiento placentario y su relación con el peso de nacimiento y la edad gestacional. *Revision bibliográfica. Rev. Hosp. Matern. Infant. Ramon Sarda* 2012;31:69-74.
194. González T, Lassaletta L, Martínez L, Tovar J, Martorell V. Estudio morfométrico de las malformaciones craneofaciales experimentales inducidas

por ácido retinoico. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial* 2003;25:288-293.

195. García-Peláez I, Aguirre-Luna OM, Saavedra-Ontiveros D, Arteaga-Martínez M, GARCÍA-PELÁEZ I, AGUIRRE-LUNA O et al. Teratogenic effect of ethylene glycol-methyl cellosolve mixture in rats. II. Craniofacial and limb abnormalities. *Int J Morphol* 2010;28:1173-1180.

196. Oyhenart EE, Rossi MFC, Pucciarelli HM. Influencia del retardo del crecimiento intrauterino sobre la diferenciación craneana postnatal. *Revista Argentina de Antropología Biológica* 1999;2:135-150.

197. Miller JP, German RZ. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. *The Journal of nutrition* 1999;129:2061-2069.

198. Oyhenart EE, Orden B, Fucini MC, Muñe MC, Pucciarelli HM. Sexual dimorphism and postnatal growth of intrauterine growth retarded rats. *Growth Development and Aging* 2003;67:73-84.

199. Cesani M, Fia, Orden B, Zucchi M, Muñe MC, Oyhenart EE et al. Effect of undernutrition on the cranial growth of the rat. *Cells Tissues Organs* 2003;174:129-135.

200. Cesani MF, Orden AB, Oyhenart EE, Zucchi M, Muñe MC, Pucciarelli HM. Growth of functional cranial components in rats submitted to intergenerational undernutrition. *Journal of anatomy* 2006;209:137-147.

201. Cesani MF, Oyhenart EE, Pucciarelli HM. Effect of Intergenerational Chronic Undernutrition on Ponderal, and Linear Growth. *ISRN nutrition* 2014;2014.

202. Gonzalez PN, Oyhenart EE, Hallgrímsson B. Effects of environmental perturbations during postnatal development on the phenotypic integration of the skull. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 2011;316:547-561.

203. Bookstein FL. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology.* Cambridge University Press; 1997.

204. Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD. *Geometric morphometrics for biologists: a primer.* Academic Press; 2012.

205. Young NM, Wat S, Diewert VM, Browder LW, Hallgrimsson B. Comparative morphometrics of embryonic facial morphogenesis: implications for cleft-lip etiology. *Anat Rec (Hoboken)* 2007;290:123-139.
206. Parsons TE, Kristensen E, Hornung L, Diewert VM, Boyd SK, German RZ et al. Phenotypic variability and craniofacial dysmorphology: increased shape variance in a mouse model for cleft lip. *J Anat* 2008;212:135-143.
207. Olafsdottir H, Darvann TA, Hermann NV, Oubel E, Ersboll BK, Frangi AF et al. Computational mouse atlases and their application to automatic assessment of craniofacial dysmorphology caused by the Crouzon mutation *Fgfr2(C342Y)*. *J Anat* 2007;211:37-52.
208. Iamaroon A, Wallon UM, Overall CM, Diewert VM. Expression of 72-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-2) in the developing mouse craniofacial complex. *Arch Oral Biol* 1996;41:1109-1119.
209. Pratt RM, Goggins JF, Wilk A, King C. Acid mucopolysaccharide synthesis in the secondary palate of the developing rat at the time of rotation and fusion. *Developmental biology* 1973;32:230-237.
210. Brinkley LL, Bookstein FL. Cell distribution during mouse secondary palate closure. *Development* 1986;96:111-130.
211. Singh G, Moxham B, Langley M, Waddington R, Embery G. Changes in the composition of glycosaminoglycans during normal palatogenesis in the rat. *Archives of oral biology* 1994;39:401-407.
212. Ashworth JL, Murphy G, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochemical Journal* 1999;340:171-181.
213. Foreman DM, Sharpe PM, Ferguson MW. Comparative biochemistry of mouse and chick secondary-palate development in vivo and in vitro with particular emphasis on extracellular matrix molecules and the effects of growth factors on their synthesis. *Archives of oral biology* 1991;36:457-471.
214. Kerrigan J, Mansell J, Sengupta A, Brown N, Sandy J. Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh* 2000;45:351-358.
215. Moore CS, Crocker SJ. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am J Pathol* 2012;180:12-16.

216. Bouloumié A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9 involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 2001;50:2080-2086.
217. Hornebeck W, Emonard H, Monboisse J-C, Bellon G. Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression *Seminars in cancer biology*: Elsevier; 2002: p. 231-241.
218. Bulleit RF, Zimmerman EF. The influence of the epithelium on palate shelf reorientation. *J Embryol Exp Morphol* 1985;88:265-279.
219. Blavier L, Delaisse J. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *Journal of Cell Science* 1995;108:3649-3659.
220. La Fleur M, Underwood JL, Rappolee DA, Werb Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *The Journal of experimental medicine* 1996;184:2311-2326.
221. Csaki C, Mobasher A. Diverse Roles of Integrin Receptors in Articular Cartilage. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. Springer; 2008.
222. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2010;1803:55-71.
223. Kawano K, Katak SS, Murai M, Yao C-C, Kramer RH. Integrin $\alpha 3\beta 1$ engagement disrupts intercellular adhesion. *Experimental cell research* 2001;262:180-196.
224. Oh J, Seo D-W, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM et al. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Research* 2004;64:9062-9069.
225. Nieuwesteeg M, Walsh L, Fox M, Damjanovski S. Domain specific overexpression of TIMP-2 and TIMP-3 reveals MMP-independent functions of TIMPs during *Xenopus laevis* development. *Biochemistry and Cell Biology* 2012;90:585-595.

226. Chango A, Pogribny IP. Considering Maternal Dietary Modulators for Epigenetic Regulation and Programming of the Fetal Epigenome. *Nutrients* 2015;7:2748-2770.
227. García-Vallejo F. La genómica nutricional: un nuevo paradigma de la investigación de la nutrición humana. *Colomb Med* 2004;35:150-160.
228. Felipe VG, C. DM. La epigenómica. In: Valle Ud, editor. *Introducción a la;* 2008.
229. Lumey L, Ravelli A, Wiessing L, Koppe J, Treffers P, Stein Z. The Dutch famine birth cohort study: design, validation of exposure, and selected characteristics of subjects after 43 years follow-up. *Paediatric and perinatal epidemiology* 1993;7:354-367.
230. Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome new perspective against the epidemic. *Diabetes* 2005;54:1899-1906.
231. Burdge, Graham C.; LILLYCROP, Karen A. Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. *Annual review of nutrition*, 2010, vol. 30, p. 315-339.
232. Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J, Vickers MH. Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. *PloS one* 2011;6:e21662.
233. Yu H-L, Dong S, Gao L-F, Li L, Xi Y-D, Ma W-W et al. Global DNA methylation was changed by a maternal high-lipid, high-energy diet during gestation and lactation in male adult mice liver. *British Journal of Nutrition* 2015;113:1032-1039.
- 234 Buchwalow IB, Böcker W. *Immunohistochemistry: basics and methods.* Springer Science & Business Media; 2010.

17. ANEXOS

Procedimientos operacionales estándar (POEs)

17.1 POE para preparación de soluciones

 <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p>Preparación de soluciones fijadoras para conservación de las cabezas de rata Wistar E16.5</p>	<p>SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

Materiales

Elementos de protección

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Pinza con garra • Vasija de vidrio • Bandeja metálica • Tarros para el almacenamiento de la muestra debidamente rotulados • Cinta de enmascarar | <ul style="list-style-type: none"> • Guantes desechables • Tapaboca • Gorro • Bata |
|---|--|

Reactivos	Equipos
1. PLP paraformaldehído	1. Cámara extractora (FEX 120)
2. Alcohol al 70%	
3. Solución A	2. Rotador
4. Solución B	
5. ETDA + PB 0.1 M Ph 7.0	3. Balanza Analítica
6. NaOH(Calibrar pH)	
7. Ácido clorhídrico (Calibrar pH)	4. Plancha
8. Sucrosa al 30% más PB pH 7.4	5. pH-metro

El proceso de fijación es un método que se refiere al tratamiento del tejido con varias finalidades:

1. Conservar los tejidos de forma que muestren el mayor parecido posible a su estado *in vivo*.
2. Aumentar la dureza del tejido para facilitar la preparación de finas películas de éste.
3. Destruir bacterias y gérmenes que pudieran encontrarse en ellos.
4. Interrumpir los procesos celulares dinámicos que ocurren a la muerte de la célula.

Existen diferentes forma de fijar los tejidos, dependiendo del tipo de fijador, de la estructura a fijar y lo que se quiere observar. Uno de los métodos más eficientes para fijar es por medio de fijadores químicos, se utilizan soluciones acuosas compuestas por moléculas fijadoras que establecen puentes entre las moléculas celulares, manteniéndolas en sus lugares originales e impidiendo su degradación. Existen dos métodos de fijación química:

Inmersión: Las piezas de tejido se sumergen en solución fijadora, dependiendo dela velocidad de penetración del fijador, el volumen recomendado debe ser 20veces superior al de la pieza.

Perfusión: es el método de mayor utilización en animales de experimentación, ya que el líquido fijador como el PLP (Periodato-Lisina-Paraformaldehído), es inyectado en el sistema circulatorio del espécimen, por lo tanto, fija los órganos de adentro hacia fuera, lo que da excelentes resultados cuando la técnica es realizada con éxito.

1. Procedimiento

1.1 Preparación de los reactivos

El PLP se prepara con antelación al procedimiento y se realiza con los reactivos mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de la solución fijadora PLP

Reactivo	Para 470 c.c.	Para 235 c.c.	Para 117,5 c.c.	Para 94 c.c.
Agua destilada	235 c.c.	117,5 c.c.	58,75 c.c.	47 c.c.
Paraformaldehído	10 g	5 g	2.5 g	2 g
Buffer fosfato 0,2 M	235 c.c.	117,5 c.c.	58,75 c.c.	47 c.c.
Peryodato	1,07 g	0,535 g	0,2675 g	0,214 g
Lysina	6,85 g	3,425 g	1,7125 g	1,37 g
NaOH 1Normal	G O T A A	G O T A A	G O T A A	G O T A A

1. Calentar agua destilada a 58°C.
2. Agregar lentamente el paraformaldehído (realizar en cabina, libera vapores peligrosos). La sustancia obtenida es de apariencia lechosa.
3. Realizando agitación y a 58 °C, aclarar gota a gota con NaOH (1 normal, preferiblemente menos de 6 gotas) hasta que la solución obtenga apariencia cristalina.
4. Tapar recipiente contenedor con aluminio y dejar enfriar en nevera verificando que alcance la temperatura ambiente.
5. Una vez frío, se agrega el buffer fosfato 0,2 molar.
6. Posteriormente agregar el peryodato y finalmente la lisina.
7. Filtrar la solución
8. Medir que el pH final se encuentre entre 7.2 y 7.4.
9. Guardar en Nevera a 4°C preferiblemente en fracciones de 350 ml a 400 ml, cantidad estimada para realizar la perfusión en ratas (250ml – 300ml para ratones o cualquier otro tejido de interés)

NOTA:

- Muy importante es definir el pH de la solución de fijación dependiendo del pH óptimo del anticuerpo. Tener preparadas soluciones de NaOH y HCl al 0,1M y 1M.
- Al momento de perfundir o a sumergir el tejido, la solución fijadora PLP debe estar a temperatura ambiente.

1.2 Preparación del lugar de trabajo

Se trabaja en campana extractora para evitar inhalar vapores de los diferentes reactivos a utilizar. Se deben tener listos los materiales que se necesitaran para todo el procedimiento.

Alcohol etílico al 70%

Es un líquido transparente inflamable, muy volátil y de olor agradable. En el comercio se puede encontrar puro (llamado absoluto o de 100°), o desnaturalizado diluido al 90 o 70%.

Preparación: Como fijador único tomar 70-90 ml de alcohol y llevar hasta 100 ml de agua destilada.

Preserva el glucógeno y la actividad de ciertas enzimas tisulares, fija los pigmentos y se emplea en las extensiones citológicas. Por alterar escasamente la estructura antigénica de los tejidos, es un buen fijador para inmunohistoquímica.

Preparación de alcohol 70%

Existe una tabla de diluciones de alcohol en la que se detalla que para obtener alcohol al 70° partiendo del 96° se debe agregar 40,85 cc (cc=ml) de agua destilada a 100 cc de alcohol 96°.

- Para preparar alcohol al 70° a partir de alcohol 96° se utiliza la fórmula:
- El alcohol de 96° es de 96% de concentración por volumen
- A 70 ml del alcohol al 96% se le añaden 26 ml de agua destilada
- Con esto el volumen final será 96 ml en los cuales están diluidos $0.96 \times 70 \text{ ml} = 67.2 \text{ ml}$ de alcohol puro en un volumen final de 96 ml, esto corresponde a $67.2/96 \times 100 = 70\%$ de concentración.

2. Técnica

Una vez obtenidas las muestras de cabezas de ratas Wistar en estadio E16 y P2, serán fijadas en PLP en 24 y 48 horas respectivamente. Se realizará la disección

adecuada de esta cabeza y se fijaran en alcohol al 70%. A las muestras de P2 se les realizará decalcificación con ETDA.

Preparación de Buffer fosfato (PB)

-Solución A

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 13.8 gr /500 ml de agua destilada

-Solución B

Fosfato de sodio dibásico anhidro se diluyen 14,2 gr/500 ml de agua destilada

-Solución A 100 ml solución B 400 ml. Para un total de 500 ml de PB al 0.2 M.

-Para que quede al 0.1 M se agregan 500 ml de agua destilada

A	B	pH	A	B	PH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

Preparación de Buffer Fosfato Salino (PBS)

Por cada 100ml de PB se le agrega 0,89 de Cloruro de Sodio

Preparación de Buffer de Bloqueo

Preparación de Buffer Fosfato Salino (PBS) más Tween 20.

Por cada 200 ml se le agrega 0.1% de Tween

199,9 ml más 0,1ml de Tween

Preparación NaOH al 10%

4 gr de Na OH para preparar 10cc de solución 10N.

4 gr de Na OH en 10 ml de H₂O destilada, no tapar mientras disuelve las lentejas, Se usa para adicionar al PLP para corregir el PH y agregar el PBS 0.2 M.

Preparación ácido clorhídrico

Un 1 N, o 1 normal de solución de HCl es, por lo tanto, lo mismo que un 1 M, o 1 molar de solución. Esto significa que la solución contiene 1 mol de HCl por litro de solución, o aproximadamente 35 gramos de HCl por litro.

Bibliografía

1. Montalvo C. Técnica histológica. Unam 2010. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf
2. Winkler. Ficha de seguridad química: Formaldehído al 37%. Disponible en: www.WinklerLtda.com
3. Laboratorio de Anatomía Patológica. Raimundo García del Moral. Interamericana – McGraw-Hill
4. García, P., Pombal, D., Megias M. 2010. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Facultad de Biología. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo. Pp. 9

17.2 POE para determinación del ciclo estral

 <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p>Protocolo frotis vaginal determinación del ciclo estral en rata Wistar</p>	<p>SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

1. Introducción

La determinación del ciclo estral es útil para la selección de la hembra que está lista para aparearse. El ciclo estral en murinos se puede dividir en 4 fases (proestro, estro, metaestro y diestro) y se repite cada 4 a 5 días, a menos de que se interrumpa por un embarazo o pseudoembarazo.

Los cambios que ocurren en el ciclo estral son evidentes en la fisiología y anatomía del animal. Estos cambios se pueden determinar mediante la citología vaginal, la medida de impedancia eléctrica, y análisis bioquímicos de orina, y observación visual de los genitales externos.

La evaluación de las células vaginales mediante citología, es aceptado como el método más acertado para identificar los cuatro estadios del ciclo estral.

Con el método de evaluación visual no hay riesgo de pseudopreñez o daño al epitelio vaginal, pero requiere práctica para adquirir la experticia necesaria..

Las hembras murinos que se identifican en proestro o estro son más receptivas a los machos, facilitando el acoplamiento y la preñez del animal.

La evaluación por citología se basa en determinar los grupos celulares presentes y a partir de la comparación con un estándar (figura 1), llegar a establecer un diagnóstico de la fase del ciclo en que se encuentra el animal.

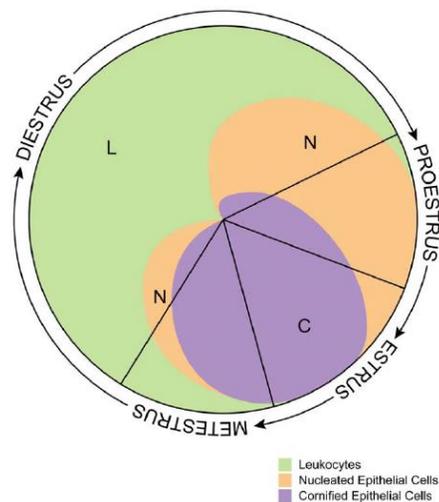


Figura 1. Identificación de la fase del ciclo estral como herramienta. Se evidencia la representación de los tipos celulares y la proporción relativa de cada tipo celular presente

Fuente: Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA (2012) *Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images*. PLoS ONE 7(4): e35538. doi:10.1371/journal.pone.0035538

2. DETERMINACIÓN DEL CICLO ESTRAL

2.1 Método visual

Para evaluar la fase del ciclo estral por observación visual cada ratón se debe sostener por la cola con sus extremidades descansando en la jaula. La abertura vaginal de cada hembra se evalúa con los criterios descritos por Champlin, et al. Se toma una imagen digital de cada animal. Es necesario evaluar a los animales

en la misma área con respecto a la luz del cuarto, la mesa de trabajo debe de tener disponible suficiente luz. La fuente de luz es importante de considerar porque puede cambiar la percepción del color vaginal de los tejidos y puede dificultar la evaluación. Se pueden usar luces portátiles. Se deben evitar luces LED porque tienen una tonalidad púrpura que hace difícil la detección visual.

La evaluación de los tejidos permitirá determinar la etapa del ciclo estral presente (Figura 2).

La abertura vaginal en proestro se caracteriza por tejido inflamado, húmedo, y téjido rosa. La abertura es amplia y hay arrugas o estriaciones en los bordes dorsales y ventrales.

Estro la entrada vaginal se vuelve menos rosada, menos húmeda e inflamada

Metaestro se caracteriza por una abertura vaginal que no está totalmente amplia , no inflamada y pueden verse escombros celulares blancos

Diestro la abertura vaginal es pequeña y cerrada sin hinchazón

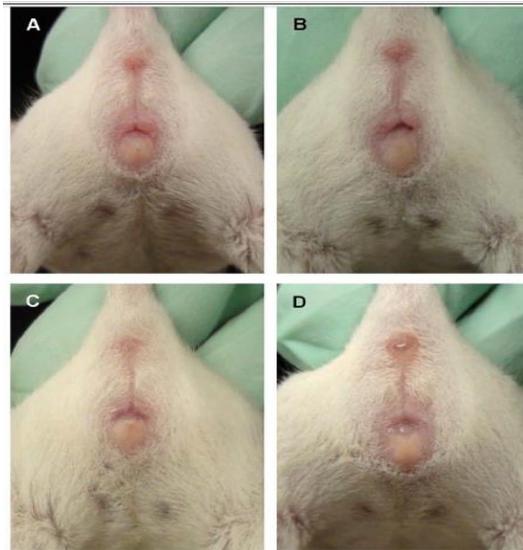


Figura 2. Se observan los cuatro estadios del ciclo estral en ratón. Proestro (A), Estro(B), Metaestro (C), diestro (D). **Fuente:** Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA (2012) *Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images*. PLoS ONE 7(4): e35538. doi:10.1371/ journal.pone.0035538

2.2 Método de citología vaginal

2.2.1 Con Hisopo

Se utiliza un hisopo con punta de algodón para recoger las células. El hisopo se inserta en la vagina del ratón y se mueve suavemente contra la pared vaginal, luego se remueve, y se transfieren las células a un portaobjeto, se seca y se tiñe con aproximadamente 400µL de colorante por 45 segundos.

La fase del ciclo estral se determina basado en la presencia o ausencia de leucocitos, células epiteliales cornificadas, y células epiteliales nucleadas. (Figura 3)

1. Proestro: Dura aproximadamente 12 horas, en esta etapa en la vagina se produce un engrosamiento epitelial. Cuando la hembra está en esta fase, la mayoría de las células son nucleadas y algunas células cornificadas están presentes. Algunos leucocitos pueden estar presentes si la hembra está en proestro temprano. Los ovarios están en plena producción folicular. El diámetro de la luz uterina es de 5 mm.

2. Estro: Dura de 9-15 horas, en el epitelio vaginal la mayoría de células cornificadas están presentes y muy pocas células epiteliales. Los estrógenos circulantes provocan cambios en el útero y aparece el deseo de apareamiento, aumenta la producción de FSH y LH en los dos días siguientes. El estro se caracteriza por cambios conductuales en el animal, se ve que la rata corre más que de costumbre, sacude las orejas y en presencia de otra rata presenta lordosis. La ovulación ocurre 8-11 horas después de la aparición del estro.

3. Metaestro: Si no hay interrupción por embarazo o pseudoembarazo el metaestro empezará. Se divide en 2 etapas. El metaestro I que dura 15 horas, se produce el pico del LH y la consecuente ovulación múltiple y espontánea, este pico está relacionado con las horas de luz que recibe el animal, si recibe 12 horas de luz al día y una temperatura ambiente de 20 a 22 °C se verá favorecida la función reproductiva. El poco de LH determina el final de la producción de estrógenos y comienzo de la producción de progesterona por los cuerpos lúteos, la progesterona determinará el comportamiento materno de la rata. El metaestro II dura 6 horas, en esta etapa la vagina se ve húmeda y los óvulos liberados se encuentran en el oviducto. En esta fase se inicia la regresión del epitelio vaginal, las células cornificadas se degeneran. El cuerpo lúteo se forma pero falla para luteinizarse completamente debido a la ausencia de progesterona. El revestimiento uterino empezará a mudar y evidencia de esto es la presencia de

células cornificadas y de leucocitos presentes. Algunas células epiteliales nucleadas pueden estar presentes en el metaestro tardío.

4. Diestro: es el estadio más largo durando más de dos días. El diámetro de la luz uterina es de 2.5 mm, los cuerpos lúteos producen abundante progesterona que desbloquea la producción de FSH y LH, esto inicia nuevamente el ciclo con el desarrollo de nuevos folículos. Hay presencia de leucocitos polimorfonucleares, y algunas células epiteliales durante el diestro tardío. Los leucocitos pueden permanecer como el tipo celular predominante.

2,2.2 Mediante lavado

En este método se introduce una micropipeta y se depositan suavemente 100 microlitros (aproximadamente 3 gotas) de suero fisiológico en la vagina, luego se recuperan y depositan sobre un porta objeto, las células pueden ser estudiadas en fresco o mediante tinción de Papanicolaou para realizar la caracterización respectiva.

Para llegar al diagnóstico de la fase del ciclo estral presente se recurre a la tipificación celular del ciclo estral descritas en el punto anterior, (Figura 3).

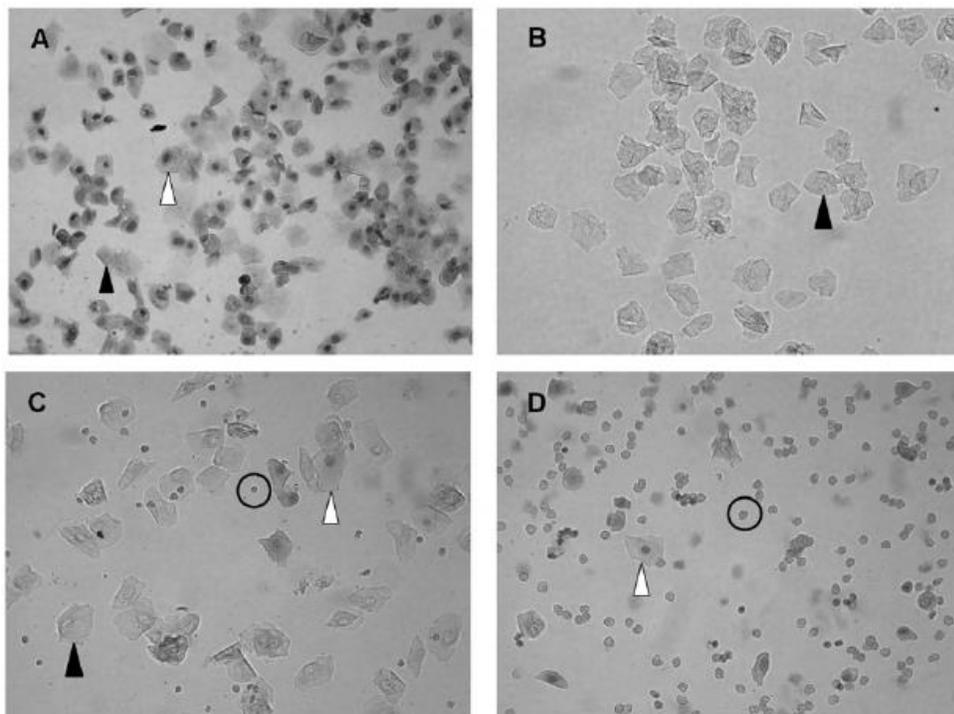


Figura 3: Citología vaginal representando las fases del ciclo estral. Los tres tipos celulares identificados: Leucocitos (círculos), células cornificadas (flechas negras), células epiteliales nucleadas (flecha blanca). Fases del ciclo estral: Proestro (A), estro (B), metaestro (C), diestro (D). **Fuente:** Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA (2012) *Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images*. PLoS ONE 7(4): e35538. doi:10.1371/ journal.pone.0035538

3. Aplicación

Una vez identificado la fase del ciclo estral en el que se encuentra la hembra, si esta se encuentra en proestro, es un animal viable para aparearse con el macho, ya que en esta fase del ciclo la hembra es receptiva, puesto que está ovulando. Al día siguiente por medio del método visual se verifica la presencia de tapón vaginal. De igual forma se puede confirmar con la citología vaginal la presencia de espermatozoides en el extendido.

Referencias bibliográficas

1. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA (2012) *Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images*. PLoS ONE 7(4): e35538. doi:10.1371/ journal.pone.0035538
2. MARCONDES, F, et al, *Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations*, Braz. J. Biol., 62(4A): 609-614, 2002
3. <http://es.scribd.com/doc/28128273/CICLO-ESTRAL>

17.3 POE eutanasia y disección de fetos de rata Wistar E16.5

 <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p>Protocolo de eutanasia y disección de fetos de rata Wistar estadio E16.5</p>	<p>SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

Elementos de protección

- Bata de laboratorio manga larga, antifluidos
- Gorro
- Guantes
 - Tapabocas

Fármacos/Reactivos

- Isoflurano
- Alcohol al 70%
- Fijador PLP
- Solución fisiológica
- Nitrógeno líquido

- Isopentano

Materiales e instrumental

- Pinzas con garra (2)
- Pinzas sin garra (2)
- Pinzas de Kelly (2)
- Tijeras (2)
- Cuchillas (2)
- Instrumental de microcirugía
- Recipientes metálicos
- Papel para forrar
- Cinta
- Frascos para almacenar los embriones (15)
- Placa de Petri (2)
- Marcador indeleble
- Regla
- Papel milimetrado (4 hojas)
- Cartulina negra (2)
- Pipetas (2)
- Servilletas
- Superficie de corcho
- Alfileres

Equipos

- Cámara digital
- Estereomicroscopio
- Lámpara de luz
- Caliper digital
- Balanza digital



1. Los biomodelos de 16.5 días de preñez fueron colocados en una caja acrílica realizó la eutanasia con isoflurano al 100% (ISOFLURANO USP®-BAXTER) impregnado en una mota de algodón, y se esperó alrededor de 15 minutos hasta observar que el biomodelo tuviera alterada su motricidad, cambio de color de sus pupilas (de rojas a rojas a negras) y haya quedado completamente inmóvil sin signos vitales (Fig. 1-3).

2. Posteriormente se realizó la disección y obtención de los embriones. Se situaron los biomodelos en una superficie limpia, se desinfectó la zona abdominal con alcohol al 70%. Se verifica nuevamente que el animal no tenga signos vitales, tocando sus extremidades y cerciorarse que no haya reflejos ante los estímulos. Se puede realizar una ligera punción con tijeras o cuchilla en el abdomen. Posteriormente, con una pinza con garra se estira la piel del abdomen como se muestra en la figura 5. Se realiza una incisión en la línea del diafragma con una tijera y se cortan los músculos abdominales para tener acceso a esta región (Fig 8)



Fig. No 1



Fig. No 2



Fig. No 3



3. En el abdomen los ovarios se localizan cerca a los riñones laterales al músculo psoas, embebidos en grasa. En el animal adulto los ovarios aparecen como masas de folículos a continuación del útero bicórneo. Una vez localizado el útero, se procede a realizar la disección de éste junto con los embriones para su posterior remoción y fijación individual.(Fig. 9 y 10).



4. Una vez se empiecen a tomar los embriones, se les asigna un código (No 1, 2, 3, 4...) seguido del código de la madre.

5. Se continúa con la toma de imágenes fotográficas con la cámara digital. En este paso se coloca el feto en una placa de petri y debajo se coloca un papel milimetrado como referencia. Una vez se tome la medida se toman imágenes en posición frontal, lateral derecha e izquierda y vista superior de la cabeza.

6. Cada embrión se colocarán en sus respectivos frascos roturados debidamente: fecha, código del biomodelo, agente fijador, especie.

17.4 POE toma de imágenes estereomicroscopio

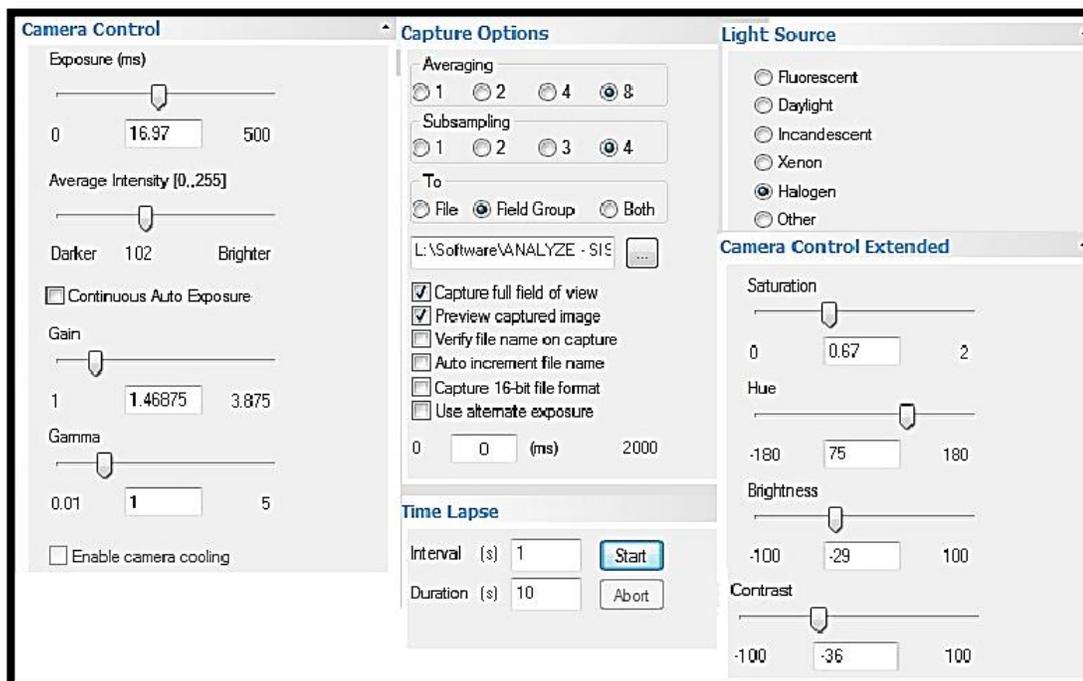
 <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p>Protocolo toma de imágenes en el estereomicroscopio de fetos de rata Wistar en estadio E16.5</p>	<p>SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

Materiales e instrumental requerido

- Esteromicroscopio MEIJI Techno con cámara Infinity 1
- Computador portátil con el Software INFINITY ANALIZE LUMENERA CORPORATION
- Placa de Petri
- Chupa de plástico
- Cartulina negra
- Solución fisiológica
- Papel milimetrado
- CD/ROM

Procedimiento:

1. Para la toma de imágenes es necesario que todos los embriones estén en solución fisiológica y estén almacenados en caja de icopor con hielo en su interior, cada uno identificado en su Petri con su respectivo número.
2. Acto seguido se prenden los equipos respectivos: estereomicroscopio, computador portátil con el programa INFINITY ANALYZE instalado.
3. La toma de imágenes debe realizarse en cuarto oscuro, luz apagada
4. La luz se proyecta desde arriba, con una cartulina negra como fondo. Es necesario ubicar al embrión en posición de decúbito lateral (derecho e izquierdo) y tener como referencia al lado derecho del embrión papel milimetrado.
5. Los parámetros generales para la toma de imágenes son los siguientes (algunos se pueden modificar para efectos prácticos p.ej exposición de luz)



6. El almacenamiento de las imágenes se realiza creando una carpeta con el código del biomodelo, el estadio, el grupo al que pertenece

7. El almacenamiento de los archivos se realiza en formato JPG, si es de preferencia PNG

8. El nombre de los archivos corresponde con los siguientes:

EMBRIÓN	RW (Rata Wistar)	Grupo (O/C) Obeso/control	Estadio	Código del embrión	Aumento 10x, 20x, 25x etc	Posición del embrión (lateral derecha o lateral izquierda)
----------------	-------------------------	----------------------------------	----------------	---------------------------	----------------------------------	---

Recomendación: una vez se toman las respectivas fotos de un biomodelo se entrega al encargado de la disección; tanto de corazón como de cabeza y el biomodelo debe permanecer en solución fisiológica.

9. Una vez se termine la toma de imágenes se guardan las imágenes en memoria USB, preferiblemente CD/RW.

10. Los equipos deben ser apagados. El sitio debe quedar limpio, y se diligencia el formato de uso de equipos indicando el nombre de la persona que utilizó el esteromicroscopio, el tiempo de uso y la firma.

17.5 POE Disección de cabeza fetal

 <p>Universidad del Valle</p> <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p>Protocolo de disección de la cabeza fetal de rata Wistar estadio E16.5</p>	<p>SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

Materiales

- Bandeja para el instrumental
- Toallas de papel
- Cuchilla
- Instrumental de microcirugía:
- Pinzas sin garra (2)
- Tijeras para microcirugía (2)
- Petri
- Gotero

Elementos de protección

- Guantes desechables
- Tapaboca
- Gorro
- Bata

Equipos

- Esteroscopio
 - Lámpara de mesa
-

En primer lugar se coloca el espécimen en una placa de Petri, bajo el estereoscopio se posiciona el embrión en decúbito supino, con ayuda manual se separa la cabeza del cuerpo y con una cuchilla se realiza el corte de la cabeza entera. En un recipiente debidamente rotulado con los siguientes datos: **Feto, estadio E16.5, número de muestra, fijador y fecha**, se fija en paraformaldehído por 24 horas, y luego se almacena en alcohol al 70% a 4°C. Para las muestras destinadas a histología con HE se postfijan en solución de Bouin por 12 horas y se realizan de 5-8 lavados con alcohol al 70% y se colocan en rotador para que se limpie más rápido. Aquellas muestras destinadas a inmunohistoquímica **no se realiza postfijación en solución de bouin; se dejan almacenadas en alcohol al 70%.**

Luego procedemos a retirar la piel de la cabeza con una pinza sin garra bajo estereomicroscopio. Cuando la cabeza esté completamente libre de piel se retira la calota craneal y meninges con una tijera y pinza sin garra, esto para los fetos en estadios E16.5, se aumentará la velocidad de penetración del fijador y evitará procedimientos de decalcificación.



Figura 1. Cabeza embrionaria de Rata Wistar en estadio E 16.5. Vista lateral izquierda, se retira piel y calota craneal

**17.6 POE Procesamiento histológico de las cabezas de rata Wistar
en estadio E 16.5**

 <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p align="center">Protocolo de deshidratación e inclusión de tejidos en parafina muestras de cabezas de rata Wistar en estadio E16.5</p>	<p align="center">SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

Introducción:

La inclusión es el proceso que tiene por objetivo “rellenar o infiltrar” completamente la muestra histopatológica con el medio que se va a utilizar para la imbibición del tejido. El fundamento del proceso radica en la ocupación completa con este medio de los espacios intra y extracelulares, inicialmente rellenos por el agua intratisular. La finalidad última del proceso es proporcionar a la pieza anatómica homogeneidad y dureza suficiente para que se puedan obtener secciones finas de calidad. El método de elección es la inclusión en parafina.

En la actualidad se utilizan parafinas las cuales están conformadas por diversas mezclas con polímeros plásticos de peso molecular controlado y otros aditivos que mejoran sus características como agente de inclusión. Estas mejoras pueden resumirse en: cortes más finos y uniformes, aumento de la dureza y homogeneidad del bloque, incremento de la viscosidad del medio y menor fragilidad de los bloques.

1. Objetivo.

- Realizar la deshidratación e inclusión en parafina de la cabeza de embriones de ratón *Mus musculus* en estadios E15, E18 y P1

Materiales	Elementos de protección
<ul style="list-style-type: none"> • Pinza con garra • Pinza Kelly • Pinzas lisas • Cuchilla “Minora” • Tabla de pasta • Toallas absorbentes • Cassettes de inclusión • Moldes metálicos • Lápiz 	<ul style="list-style-type: none"> • Guantes desechables • Tapaboca • Gorro • Bata

Reactivos	Equipos
<ol style="list-style-type: none"> 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% 8. Detergente 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cámara extractora (FEX 120) 2. Procesador de tejidos (Leica TP 1020) 3. Estación de inclusión (Histocentre 3) 4. Plancha (Thermolyne)

2. Preparación del lugar de trabajo

a. 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	Tiempos tejidos fetales
Alcohol 70%	1	25 minutos
Alcohol 80%	1	25 minutos
Alcohol 95%	2	25 minutos
Alcohol 100%	4	25 minutos
Xilol	2	25 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.

El tejido puede permanecer detenido en el primer paso de deshidratación (alcohol al 70 %) sin que ocurran daños en éste.

4. Inclusión final en parafina

Después de que salen los cassettes 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. Los cassettes después de que salen 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 los cassettes 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 el tejido; 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) y se le agrega 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.

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

5. Desinfección y eliminación de residuos

Residuos de formol buffer, ácido pícrico y alcohol 70%: Estos residuos deben descartarse en los recipientes asignados ó marcados como desechos de formol, alcohol más ácido pícrico.

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

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

17.7 POE Corte en el micrótopo de rotación

 <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p>Protocolo de corte en micrótopo de rotación de muestras de cabezas de rata Wistar en estadio E16.5</p>	<p>SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

Introducción

Las características tisulares y celulares microscópicas internas se observan con microscopios ópticos o electrónicos de transmisión. Con estos aparatos sólo se pueden observar grosores muy pequeños de tejido por problemas de difusión y penetración de la luz en el caso de los microscopios ópticos y de penetración de los electrones en el caso del microscopio electrónico de transmisión. Por tanto hay que hacer secciones de los tejidos a estudiar, que pueden ir desde un grosor de unos cuantos nanómetros hasta centenares de micras. Cuanto más delgada se

quiera hacer una sección de tejido más endurecido ha de estar dicho tejido. La dureza de los tejidos depende de sus características, de la fijación que se le haya realizado y sobre todo del material en que se ha incluido dicho tejido. Una manera más directa de endurecer el tejido es mediante congelación (Molist et al, 2011).

Los aparatos mecánicos para hacer secciones de un grosor de micrómetros se denominan micrótomos y existen diferentes tipos según el grosor que se quiera conseguir en las secciones, el medio de inclusión en el que se encuentre el tejido o si se ha endurecido por congelación o por inclusión. Los micrótomos más usados son:

- Micrótomos para parafina: Se utiliza principalmente para material incluido en parafina y se obtienen secciones de 5 a 20 μm de grosor, para observar con el microscopio óptico.
- Vibrátomo: Corta material no incluido, aunque sí fijado o duro, en secciones de 30 a centenares de μm de grosor, para observar con el microscopio óptico.
- Micrótomos de congelación: Con él se consiguen secciones de 30 a unas 100 μm de material congelado para su observación con el microscopio óptico.
- Criostato: Consigue secciones a partir de material congelado y se obtienen grosores de 10 a 40 μm , para observar con el microscopio óptico.
- Ultramicrótomos: Con él se corta material incluido en resinas y se obtienen secciones del orden de nanómetros de grosor, para observar con el microscopio electrónico de transmisión.
- Ultracriótomo: Su uso no está muy extendido pero se suele emplear cuando se necesitan secciones del orden de nanómetro de material que no se debe incluir, para observar con el microscopio electrónico de transmisión.

Más usados tradicionalmente para estudiar las características generales de los tejidos y de las células son el micrótomos para material incluido en parafina para observaciones con el microscopio óptico y el ultramicrótomos para observaciones con el microscopio electrónico de transmisión. El criostato se usa también frecuentemente en microscopía óptica por el ahorro de tiempo que supone ya que no necesita incluir el tejido, incluso se puede cortar material no fijado (Molist et al, 2011).

1. Objetivo.

Realizar la práctica de corte para la estandarización del protocolo aplicado a muestras de cabezas embrionarias de ratón embebidas en parafina

Materiales		Elementos de protección	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Pinceles 2. Cuchillas para micrótopo 3. Portaobjetos 4. canastillas metálicas para portaobjetos 5. Lápiz punta diamante 6. Toallas absorbentes 		<ul style="list-style-type: none"> • Bata de laboratorio manga larga 	
Reactivos		Equipos	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Agua destilada 2. Gelatina (Gelatin from porcine skin Type A) Sigma-Aldrich 3. Alcohol 4. Hielo 		<ol style="list-style-type: none"> 1. Micrótopo de rotación Leica RM 2135 2. Baño de maría (Boekel) 3. Estufa 	

4. Procedimiento

Antes de iniciar el procedimiento se debe realizar limpieza del sitio de trabajo, se debe tener listo el material que se va a utilizar. Además deben prepararse los reactivos necesarios antes de iniciar el corte.

4.1 Preparación de reactivos: Se agrega 2g de gelatina al agua destilada donde se depositaran las fracciones de tejido obtenidas del corte para permitir su estiramiento

4.1 Preparación del lugar de trabajo:

Reactivos (ver fichas de seguridad)	Riesgos
Gelatina: ✓ Combustión leve	Inhalación: No efectos Contacto piel: No efectos Contacto con los ojos: Irritación mecánica Ingestión: Grandes dosis pueden provocar trastornos gastrointestinales.
Alcohol	Altas concentraciones pueden provocar irritación de los ojos y del tracto respiratorio, náuseas, vómitos, excitación o depresión, adormecimiento y otros efectos narcóticos, coma, hasta la muerte .

El lugar para realizar el procedimiento debe de estar limpio, con buena iluminación y en él se deben tener listos los materiales que se necesitaran para todo el procedimiento, tales como:

- Cuchillas para desbastar
- Cuchillas para el micrótopo
- Pinceles
- Portaobjetos
- Baño de María con gelatina: la temperatura de trabajo es de 40°C; la gelatina se debe agregar y esperar hasta que se solubilice.

4.2 Técnica de corte

Hay que llevar a cabo una serie de procesos sobre el bloque de parafina antes de hacer el primer corte útil a la muestra.

1. Considerar cuál de las caras será la que primero se ponga en contacto con la cuchilla. Esta cara deberá ser más ancha que la opuesta, y ambas han de ser paralelas.
2. Retallar el bloque hasta hacer una pirámide truncada.
3. 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.
4. Los bloques retallados se colocan en una cubeta de hielo
5. Preparación del micrótopo para el corte:
 - Colocar la cuchilla: la cuchilla se saca de su contenedor 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: cuchillada orientada en un ángulo de uno 10° respecto a la superficie de corte.

-Grosor de corte de los tejidos para microscopia de luz: Grosor de 5 micras.

-Colocar 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.

6. 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.
7. 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.
8. Aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, las secciones se colocan sobre agua calentada a unos 35 °C a 40 °C y el calor las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión, que está en torno a los 60 °C. El estiramiento se realiza en el baño de agua con regulación térmica.
Nota: 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.
9. Al baño de maría se le agrega gelatina para que el tejido quede adherido al portaobjetos para un proceso posterior.
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.
11. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones están listos para el procesamiento posterior.

Después de terminar de trabajar en el micrótopo se debe dejar todo limpio y en su lugar; además de llenar los formatos de los equipos utilizados.

Referencias bibliográficas

- Molist, P. Pombal, M & Megías, M. 2011. Atlas de histología vegetal y animal, técnicas histológicas. Universidad de Vigo. 16 p.
- Winkler. Ficha de seguridad química: Gelatina. Disponible en: www.WinklerLtda.com
- UNAM. Etanol. Disponible en: <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf>

17.8 POE tinción de hematoxilina eosina

 <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p>Protocolo de coloración de hematoxilina eosina de cortes de cabezas de rata</p> <p>Wistar estadio E 16.5</p>	<p>SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar. Msc.</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

Introducción

Es la técnica de coloración más empleada en histología. El colorante básico, la hematoxilina, (previamente oxidada y transformada en hemateína a la que se le añade una sustancia mordiente para formar una laca, los cuales son sales metálicas de aluminio, plomo o hierro) colorea las estructuras ácidas de un color azul purpúreo; el núcleo los ribosomas y el retículo endoplasmático rugoso tienen gran afinidad por este colorante debido a su alto contenido en ADN y ARN, respectivamente. La eosina, por el contrario tiñe estructuras básicas al ser ácida; estas estructuras aparecen de una tonalidad rosa. La mayoría de las proteínas citoplasmáticas son básicas y por ello el citoplasma aparece con una tonalidad rosa.

Fundamento: en una coloración topográfica que sirve para el estudio de la estructura general de los tejidos

1. Objetivo.

Describir el patrón de distribución del epitelio del borde medial de los procesos palatinos en embriones de ratón *mus musculus* en los estadíos E15, E18 y P1 por medio de la técnica de coloración de hematoxilina y eosina

Materiales	Elementos de protección
<ol style="list-style-type: none"> 1. Vasos coplin 2. Cronómetro 3. Contenedores de la batería de tinción 4. Papel filtro 5. Soporte metálico para filtrar 6. Sharpie (marcador permanente) 7. Cinta de enmascarar 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Guantes desechables 2. Tapaboca 3. Gorro 4. Bata
Reactivos	Equipos
<ol style="list-style-type: none"> 1. Eosina 2. Agua destilada 3. Alcohol 95% 4. Alcohol 80% 5. Cristales de hematoxilina 6. Alcohol absoluto 7. Aluminio de Potasio 8. Óxido de mercurio 9. Ácido acético glacial 10. Ácido clorhídrico 11. Carbonato de litio 12. Xilol 13. Cónsul Mount 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cámara extractora (FEX 120)

2. Hematoxilina de Harris

Es la taca de hematoxilina más utilizada en coloración rutinaria de los núcleos celulares, debido fundamentalmente a su estabilidad (se conserva entre 6 y 12

meses) y su facilidad de manejo. Por tratarse de una coloración regresiva requiere diferenciación ácida meticulosa para obtener la intensidad deseada de coloración. La adición de cierta cantidad de ácido acético glacial a la solución final de hematoxilina incrementa la especificidad de la coloración nuclear y hace necesaria una diferenciación ulterior.

3. Procedimiento

Antes de iniciar el procedimiento se debe realizar limpieza del sitio de trabajo, se debe tener listo el material que se va a utilizar. Además deben prepararse los reactivos necesarios antes de iniciar la coloración:

Hematoxilina Harris

- ✓ Hematoxilina en cristales 5 g
- ✓ Alcohol absoluto 5 ml
- ✓ Alumbre de amonio o potasio 100 g
- ✓ Agua destilada 1,000 ml
- ✓ Oxido de mercurio (rojo) 2.5 g

Eosina

- ✓ Eosina-----20 g
- ✓ Agua destilada----- 500 ml
- ✓ Ácido Clorhídrico concentrado----- 10 ml

Alcohol ácido 1%

- Ácido clorhídrico -----1 mL
- Alcohol Etílico 96%-----100 mL

Carbonato de litio

- Carbonato de litio----- 2 g
- Agua destilada -----100 mL

Se disuelve la eosina en 250 ml, de agua; se agregan los 250 ml, de agua restantes y se agrega el ácido clorhídrico. Otra forma de prepararla es con alcohol absoluto en lugar del ácido clorhídrico concentrado.

NOTA: Si la hematoxilina será utilizada inmediatamente, agregar 2 a 4 ml, de ácido acético glacial por cada 100 ml, de solución para oxidar el colorante.

8.1 Preparación:

1. Disolver la hematoxilina en alcohol absoluto y el alumbre en el agua calentando levemente;
2. Mezclar las dos soluciones y calentar hasta el punto de ebullición lo más rápido posible;
3. Retirar del fuego, se agrega el óxido de mercurio poco a poco, cuidando que no haga mucha espuma y se tire, después se saca rápidamente y se sumerge en agua fría; una vez que está totalmente fría queda lista para usarse cuando se oxide.

3.2 Procedimiento de Coloración

1. Desparafinar

Dos cambios de xilol por 3 minutos c/u

2. Hidratar: con alcohol etílico o isopropílico en baños decrecientes

Dos lavados con alcohol al 100% por 3 minutos

.Dos lavados con alcohol al 95% por 3 minutos c/u

Un lavado con alcohol al 70% por 3 minutos

3. **Lavar** en agua corriente por tres minutos para permitir la hidratación de la muestra
4. **Coloración con la solución de hematoxilina:** se recomienda respetar el tiempo de coloración que recomienda cada tipo de solución de hematoxilina. Puede variar de 7-15 minutos.
5. **Lavar** en agua corriente por 3 minutos .
6. Diferenciar en alcohol ácido, dar baños no más de 3 segundos.
7. **Lavar** en agua corriente por 3 minutos .
8. Dar baños en carbonato de litio al 1% por 30 segundos.
9. . **Lavar** en agua corriente por 3 minutos .
- 10.. **Teñir** citoplasma con eosina por 1-3 minutos
11. **Deshidratar** en alcohol de 95% y alcohol absoluto 3 min en cada uno.
- 12.. Tres lavados con alcohol al 100% 3 minutos c/u
13. **Aclarar** en 2 pasos de xilol durante 3 minutos en cada uno.

14. Cubrir con resina sintética cónsul mount.

3.4 Montaje:

Al terminar el proceso de coloración se procede a montar las placas usando una gota de Consul Mount (soluble en xilol) en un cubreobjeto y se coloca sobre el tejido en el portaobjeto cuidando de no dejar burbujas.

3.5 Resultados:

- Hematoxilina: Tiñe azul a los núcleos celulares
- Eosina: Tiñe de color rosa las estructuras citoplasmáticas

3.6 Eliminación de residuos

Residuos: los residuos de los diferentes reactivos deben eliminarse en el recipiente etiquetado para tal fin.

Material usado debe ser bien lavado con jabón neutro. Dejar secar y organizar en su sitio respectivo.

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

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

Nota: Revisar las precauciones presentes en los rótulos de los reactivos para saber sus peligros y lo que se debe realizar en caso de accidente.

Reactivos (ver fichas de Riesgos seguridad)	
Eosina ✓ Nocivo, Combustible e Irritante leves	-Por inhalación de vapores, irritaciones en vías respiratorias. - en contacto con la piel, riesgo de absorción cutánea - por contacto ocular, irritaciones - por absorción, náuseas, vómitos, dolores de cabeza, vértigo, embriaguez, trastornos de visión, ceguera (lesión irreversible del nervio óptico). - efectos sistémicos, acidosis, hipotensión, ansiedad, espasmos, narcosis, coma.

Aluminio potásico- potasio y aluminio sulfato 12-hidrato	<p>Inhalación: Irritaciones en las membranas mucosas, nariz y tracto respiratorio. Tos.</p> <p>Contacto piel: Irritaciones. Posible enrojecimiento</p> <p>Contacto ojos: Irritaciones. Posible enrojecimiento.</p> <p>Ingestión: Nocivo leve. Efectos sólo para grandes dosis de ingestión. Dolor abdominal Molestias. Irritación gastrointestinal.</p> <p>Otros: Deficiencia de Fosfatos por Aluminio. Osteomalasia.</p>
<p>Carbonato de litio</p> <p>✓ Nocivo</p>	<p>Inhalación: Irritaciones en el tracto respiratorio superior. Tos, dolor al pecho y dificultad respiratoria. Afecta al sistema nervioso central. Si se absorbe pueden producirse efectos similares a los de vía ingestión.</p> <p>Contacto piel: Irritaciones. Enrojecimiento y dolor</p> <p>Contacto ojos: Irritaciones. Enrojecimiento y dolor</p> <p>Ingestión: Afecta al sistema nervioso central. Irritación gastrointestinal. Náuseas, vértigos, dolor abdominal, vómitos y diarrea. Apatía, somnolencia, letargo e incoordinación. Debilidad.</p> <p>Movimientos irregulares del ojo - Visión velada.</p> <p>Sonidos a los oídos. Efectos nocivos sobre corazón, cerebro y tiroides. Coma, edema pulmonar y falla renal.</p> <p>Otros. Afecta al sistema nervioso central. Daño a los riñones. Disturbios de la tiroides. Posible cancerígeno a nivel de tiroides.</p>
<p>Oxido de mercurio</p> <p>✓ Venenosos</p> <p>✓ Irritante-oxidante leve</p>	<p>Inhalación: Afecta al sistema nervioso central. Irritaciones en el tracto respiratorio. Tos, dolor, molestias al pecho y dificultad respiratoria. Dolor de cabeza, náuseas, vómitos y dolor abdominal - Anemia. Neumonitis. Temblores, colapso y posibilidad de muerte por falla renal.</p> <p>Contacto piel: Irritaciones y posibles quemaduras. Enrojecimiento y dolor - Sensibilización de la piel. Puede ser absorbido a través de la piel.</p> <p>Contacto ojos: Irritaciones y posibles quemaduras. Visión borrosa - Posible daño permanente.</p> <p>Ingestión: Afecta al sistema nervioso central. Irritaciones y posibles quemaduras y ulceraciones. Dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea - Anemia. Temblores, colapso y posibilidad de muerte por falla renal.</p> <p>Otros: Afecta al sistema nervioso central. Pérdida de la memoria - Desorden digestivo - Daño a los riñones. Alergia en piel expuesta. Posible teratógeno.</p>
<p>Ácido acético glacial</p> <p>✓ Corrosivo</p> <p>✓ Nocivo, combustible y reactivo</p>	<p>Inhalación: Destructivo de las membranas mucosas y tracto respiratorio. Irritaciones y quemaduras. Tos y dificultad respiratoria. Dolor de cabeza, náuseas y vómitos. Laringitis. Neumonitis química y edema pulmonar. Falla respiratoria y posibilidad de muerte.</p> <p>Contacto piel: Efecto corrosivo, con severas irritaciones y quemaduras</p> <p>Contacto con los ojos: Efecto corrosivo, con severas irritaciones y quemaduras. Posible daño permanente a los ojos, incluyendo ceguera.</p> <p>Ingestión: Severo daño corrosivo gastrointestinal y en el</p>

	estómago. Edema pulmonar. Náuseas, vómitos y diarrea. Falla respiratoria, paro respiratorio y posibilidad de muerte. Otros: Sensibilización de la piel. Asma.
Hematoxilina cristalizada	Inhalación: Irritante Contacto piel: ligeramente peligroso (irritante) Contacto con los ojos: irritante Ingestión: irritante
Xilol : ✓ inflamable ✓ nocivo e irritante	Inhalación: afecta el sistema nervioso central. Dolores de cabeza y vértigos. Náuseas y vómitos. Dificultad respiratoria. Edema pulmonar. A altas concentraciones se puede producir pérdida de la conciencia, falla respiratoria y posibilidad de muerte. Contacto piel: Irritación, enrojecimiento, puede ser absorbido por la piel (nocivo). Contacto con los ojos: irritaciones, posibles quemaduras. Ingestión: Nocivo. Afecta el sistema nervioso central, dolor de cabeza, vómitos, náuseas, mareo, dolor abdominal, diarrea, salivación y vértigos. Daño del hígado. Edema pulmonar, coma y posibilidad de muerte.
Alcohol	Altas concentraciones pueden provocar irritación de los ojos y del tracto respiratorio, náuseas, vómitos, excitación o depresión, adormecimiento y otros efectos narcóticos, coma, hasta la muerte.
Clorhídrico • Corrosivo • Nocivo y reactivo	Inhalación: Irritaciones severas, quemaduras y ulceraciones en nariz, garganta y laringe. Dolor de cabeza, vértigo, mareos, náuseas y vómitos. Tos y dificultad respiratoria. Bronquitis y neumonía. Edema pulmonar. Contacto piel: Enrojecimiento y quemaduras severas. Contacto ojos: Enrojecimiento y quemaduras. Destrucción de la cornea y posible ceguera. Ingestión: Irritaciones y quemaduras severas de boca, esófago y estómago. Náuseas, vómitos y diarrea. Shock y colapso. Otros: Dermatitis en piel expuesta. Decoloración y erosión dental. Bronquitis crónica. Gastritis.

Referencias

- García del Moral, Raimundo. Laboratorio de anatomía patológica, editorial interamericana MacGraw-Hill, 1993.
- Cortez SS y col, *Manual de técnicas histológicas para el apoyo en ciencias biológicas y de la salud*, Universidad Autónoma Metropolitana.2005; pág 33-34
- Sciencelab. Material Safety Data Sheet: Hematoxilina. Disponible en: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927184>

- Winkler. Ficha de seguridad química: ácido acético glacial. Disponible en: [www. WinklerLtda.com](http://www.WinklerLtda.com)
- UNAM. Etanol. Disponible en: <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf>
- Winkler. Ficha de seguridad química: Xilol. Disponible en: [www. WinklerLtda.com](http://www.WinklerLtda.com)
- Winkler. Ficha de seguridad química: Eosina Y. Disponible en: [www. WinklerLtda.com](http://www.WinklerLtda.com)
- Winkler. Ficha de seguridad química: potasio y aluminio sulfato 12-hidrato. Disponible en: [www. WinklerLtda.com](http://www.WinklerLtda.com)
- Winkler. Ficha de seguridad química: carbonato de litio. Disponible en: [www. WinklerLtda.com](http://www.WinklerLtda.com)
- Winkler. Ficha de seguridad química: Mercurio II oxido rojo. Disponible en: [www. WinklerLtda.co](http://www.WinklerLtda.co)

17.9 POE de inmunohistoquímica para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2

 <p>Universidad del Valle</p> <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p>Protocolo de inmunohistoquímica para MMP-2, MMP9 y TIMP2 ABC complex en cortes parafinados de cabezas fetales de rata Wistar en estadio E16.5</p>	<p>SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Oscar Tamayo. Msc.</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Oscar Tamayo. Msc.</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

Las técnicas de inmunohistoquímica emplean el uso de anticuerpos, los cuales pueden ser monoclonales o policlonales y la clave va a ser la reacción antígeno-anticuerpo. La base principal de todos los protocolos de inmunohistoquímica es la reacción antígeno-anticuerpo. La unión del anticuerpo primario a su antígeno es el paso fundamental y responsable de una buena calidad de la tinción inmunohistoquímica. Una vez se detecta la unión de los anticuerpos primarios a su espécimen usando un anticuerpo secundario marcado. Por lo tanto, hay dos métodos inmunohistoquímicos empleados; el método directo y el indirecto. El

primero es un solo paso el que crea la reacción directa entre el antígeno y el anticuerpo marcado. Y el método indirecto, requiere el uso de un anticuerpo primario y uno secundario ²³⁴. Los protocolos que se emplearon para la detección de MMP2, MMP9 y TIMP2, se estandarizaron teniendo en cuenta las fichas técnicas de los anticuerpos y algunos artículos publicados sobre la expresión de MMPs y TIMPs en el paladar de ratón ^{29,149}

Soluciones Buffer

1. PBS 0.05 M Ph 7.4 (1 litro)

- NaCl-----10.00 gramos
- KCl -----0,25 gramos
- Na₂HPO₄ sodium hydrogen phosphate anhydrous -----1,8 gramos
- KH₂PO₄ fosfato de potasio----- 0,3 gramos

Mezclar en beacker con magneto

2. BSA en PBS 0.05M pH 7.4 (0.1 litros)

- BSA -----5 gramos
- PBS 0.05 M----- 10 ml
- Tween 20 -----10 µl
- Azida sódica 10% ----- 2 gotas (aproximadamente 10 µl)

Mezclar **lentamente** en beacker con magneto

3. Tris HCl Stock

- Tris HCl-----39,4 gramos
- Agua destilada-----250 ml
- Agitar y medir pH agregando Tris base hasta llegar a pH 7.6

Solución de trabajo: de esta solución sacar 50 ml diluirla en 950 ml de agua y 9 gramos de NaCl

4. Buffer citrato

Solución A: ácido cítrico -----10,5 gramos / 500 cc de agua destilada

Solución B: C₆H₅Na₃O₇ (Citrato de sodio) 2H₂O

14, 7 gramos /500 cc de agua destilada

Solución de trabajo:

A: 18 ml

B. 82 ml

C agua destilada a 1000 cc

Almacenar a temperatura ambiente

Protocolo de inmunohistoquímica MMP-2, MMP-9 y TIMP-2

Día 1

1. Se desparafinan las secciones y se deshidratan

-Xilol (1) 30 segundos

-Xilol (2) 30 segundos

-Xilol (3) 30 segundos

-Alcohol 100% (1) 30 segundos

- Alcohol 100% (2) 30 segundos

- Alcohol 100% (3) 30 segundos

- Alcohol 95% (1) 30 segundos

- Alcohol 95% (2) 30 segundos

- Alcohol 95% (3) 30 segundos

2. Se realiza recuperación antigénica en vaporera, se precalienta 20 minutos con coplin y buffer citrato y se dejan las placas por 45 minutos

Solución A: ácido cítrico 10,5 gramos /500 cc de agua destilada

Solución B: 0.1 M citrato de sodio $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 14,7 gramos/500 cc de agua destilada

Solución de trabajo: A=18 ml

B= 82 ml

C= agua destilada hasta llegar a 1000cc

3. Al terminar la recuperación antigénica se hacen dos lavados de PBS 2 minutos cada uno

4. Con papel higiénico secar los bordes de la placa, y aplicar el lápiz. Se cubren las placas en peróxido 0.3 % y se colocan en cámara húmeda por 5 minutos

5. Se realizan 2 lavados en PBS 2 minutos cada uno

MMP9	MMP2	TIMP2
Rabbit polyclonal 1:500	Rabbit monoclonal 1:50 sc 1359	Goat biotin Dako E0466 1:50

Se adicionan a la mezcla de BSA+PBS+Ázida sódica el suero de caballo 10 µl

DÍA 2

7. No se recupera el anticuerpo primario, se lavan las placas en PBS 5 minutos

8. Se incuba el anticuerpo secundario 50 minutos

MMP9	MMP2	TIMP2
Anti-rabbit 1:200 45 minutos	Valve primary antibody enhancer 45 minutos	Anti-goat biotin Dako E0466 1:400 45 minutos

Mientras se incuba el secundario, se prepara el terciario 1 gota aproximadamente

ABC complex vector laboratorios Elite Vectastain: 1 gota A, 1 gota B

En solución de trabajo Tris HCl, nunca en la solución del anticuerpo primario que tiene ázida sódica einhibe la reacción.

* *Fórmula para solución de trabajo Tris HCl 25 ml de solución Stock Tris HCl completar con agua destilada y agregar 4,5 gramos de NaCl*

9. Se incuba el complejo terciario

MMP9	MMP2	TIMP2
Se incuba complejo ABC	Valve HRP polymer	Se incuba complejo ABC
30 minutos	30 minutos en cuarto oscuro	30 minutos

10. Lavar en PBS 5 minutos

11. Revelado: 0.02 gramos DAB (diaminobencidina) en polvo. (Usar todos los elementos de protección pertinentes, tapabocas, gorro y doble guantes, ya que este reactivo es carcinogénico).

10 μ L de H₂O₂

100 ml de tris HCl solución de trabajo

Aproximadamente de 10 a 20 minutos

12. Contratación con hematoxilina de Harris diluida por 20 segundos

13. Montaje y observación en el microscopio

**17.10 POE De medidas morfométricas fetales de rata Wistar
E16.5**

 <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p align="center">Protocolo de toma de medidas morfométricas de tercio inferior facial de fetos de rata Wistar en estadio E16.5 y determinación de estadio de Theiler</p>	<p align="center">SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar M. Msc. Mario Alejandro Ortiz Msc.</p>	<p align="right">Fecha de creación</p> <p align="center">dd mm aa</p>	
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar M. Msc. Mario Alejandro Ortiz Msc.</p>	<p align="right">Fecha de Aprobación</p> <p align="center">dd mm aa</p>	
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>	<p align="right">Fecha de Realización</p> <p align="center">dd mm aa</p>	

Introducción

En términos generales se emplea el término morfometría para englobar todos los procesos de extracción cuantitativa de datos a partir de imágenes. En su estricto sentido, es el análisis cuantitativo de las formas, término que engloba al tamaño y al aspecto o figura. El principal objetivo de la morfometría es probar, estadísticamente, las hipótesis sobre los factores que afectan las formas.

Objetivos

1. Establecer un protocolo de mediciones morfométricas de fetos de rata Wistar en estadio E16.5 de madres normopeso y obesas
2. Establecer la concordancia intra e interobservador en las mediciones morfométricas fetales, en 15 imágenes de embriones de rata Wistar E16.5 provenientes de madres normopeso y obesas.
3. Estimar el estadio de Theiler de fetos de rata Wistar en estadio E16.5 de madres normopeso y obesas

Procedimiento

Materiales

- Image J 1.46r Versión libre
- Imágenes de embriones en aumentos 15x y 20x
- Tabla de Excel para almacenar los datos

Muestra

Los embriones corresponden a madres provenientes del grupo control y obeso en estadio E16.5. Para un total de grupo control de 39 embriones y un grupo obeso de 27. La toma de imágenes se realiza bajo estereomicroscopio, computador portátil con el programa INFINITY ANALIZE.

Del total de imágenes de 537 se seleccionaron 15 imágenes, pertenecientes al grupo de embriones del grupo control y obeso.

Parámetros de medición

Se cuenta con la medición de tres expertos y la medición del investigador. Las cuatro personas emplearán las mismas imágenes. De tal forma, cada observador, deberá realizar dos mediciones en diferentes momentos.

Parámetros estadísticos

Con base en las mediciones del total de imágenes seleccionadas, se procede a calcular, Variabilidad interobservador, variabilidad intraobservador y variabilidad dada por el instrumento de medida

Medidas frontales	Descripción
1. Longitud canto interno del ojo	<i>Distancia del canto interno del ojo izquierdo y derecho</i>
2. Longitud inter-temporal	Porción más cóncava del temporal-porción más cóncava del temporal
3. Vertical verdadera	Porción más convexa del borde coronal-borde inferior de la mandíbula
*A: Distancia del canto interno del ojo derecho	Intersección de la vertical verdadera con la perpendicular que va al canto del ojo derecho
*A': Distancia del canto interno del ojo	Intersección de la vertical verdadera con la

Medidas sagitales Derechas	Descripción
1. Longitud Cráneo rabadilla	<i>Desde el vértice cefálico- ángulo de la rabadilla</i>
2. Longitud nasion-Protuberancia occipital	<i>Nasion- protuberancia occipital</i>
3. Longitud bregma-borde inferior de la mandíbula	Desde el punto bregma –gonion o borde inferior de la rama mandibular
4. Longitud del cartílago nasal-ángulo interno del ojo	Desde el cartílago nasal al canto interno del ojo
5. Longitud del Hocico	<i>Ápex del cartílago nasal- nasion</i>

izquierdo	perpendicular que va al canto del ojo izquierdo
------------------	---

Diferencia entre las dos medidas

Medidas coronales	Descripción
1. Perímetro cefálico	<i>Medición de la circunferencia de la cabeza</i>
2. Distancia interparietal	Medición del ancho de la cabeza (pterion-pterion)
3. Distancia anteroposterior	Medición desde la parte más anterior del hueso frontal-parte más posterior del hueso occipital

Técnica de medición

1. Calibración

- Antes de realizar las mediciones, el observador debe de realizar la calibración de la imagen. Para ello abrir la imagen a analizar; en la barra de menú: click en File, Open (Se selecciona la carpeta donde están almacenadas las imágenes) **(figura 1)**.
- Una vez seleccionada la imagen a medir, se selecciona un recuadro del papel milimetrado que equivale a 1 milímetro seleccionando la opción de la barra de "Straight": Analyze: Set scale **(Figura 2)**
- La distancia estipulada equivale a los recuadros seleccionados, cada cuadro equivale a 1 mm, por lo tanto; Known distance (1) : Unit of length (mm; milímetros) **(Figura 3)**
- Es necesario que cada observador apunte la distancia en pixeles realizada en la primera medición que realice, ya que en la segunda medición la calibración debe coincidir con el número de pixeles que utilizó en la primera. Ver recuadro verde en la **figura 3**.

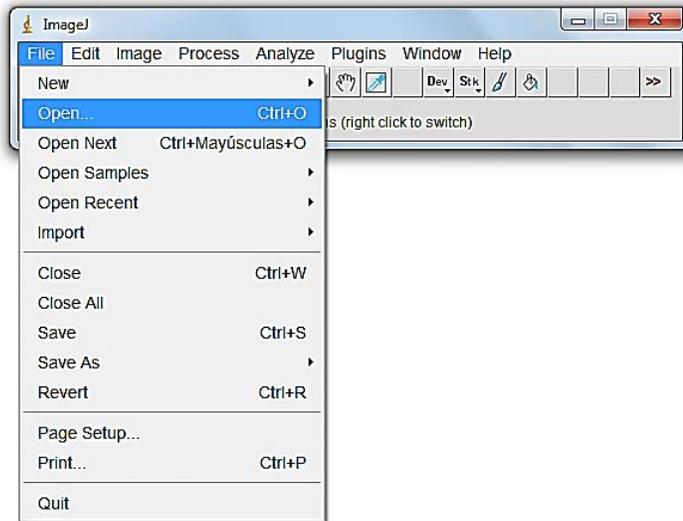


Figura 1. Ruta de acceso para la selección de la imagen a analizar

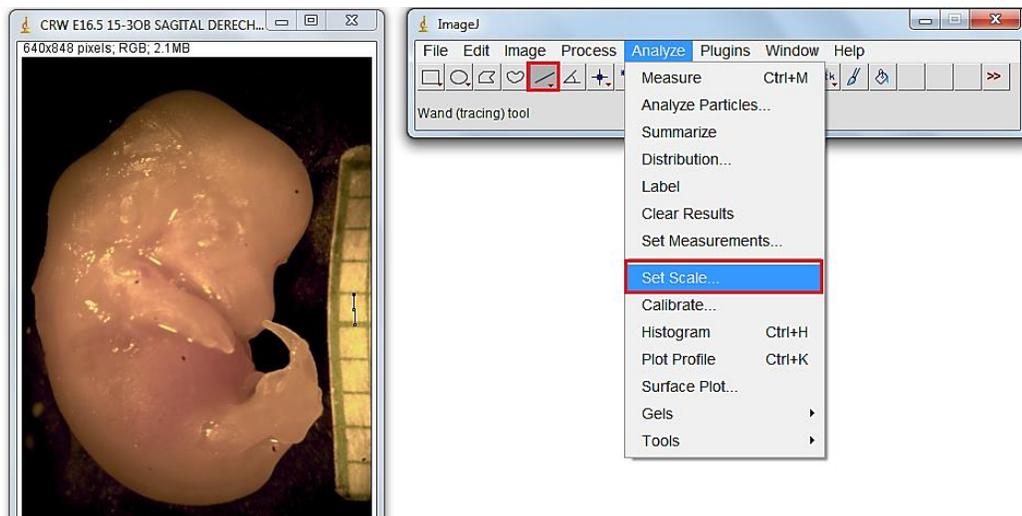


Figura 2. Ruta de acceso para realizar la calibración

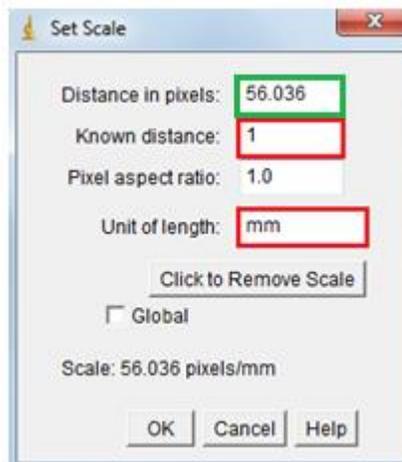


Figura 3. Cuadro de diálogo para selección de la calibración y unidad de medidas. Debe de realizarse para cada imagen por separado. Tener en cuenta que la distancia en pixeles sea la misma en cada calibración de la imagen a medir por separado.

2. Mediciones morfométricas sagitales derechas

- Se selecciona la el ícono “Straight” (seleccionado en rojo) de la barra de herramientas. Se realiza la medida deseada; en este caso la longitud cráneo rabadilla. Posteriormente se da click en: Analyze: Measure
- Se realizan las cinco mediciones, en el siguiente orden: 1. Longitud cráneo-rabadilla, 2. Longitud nasion-protuberancia occipital, 3. Longitud gonion-bregma, 4. Longitud cartílago nasal-ángulo interno del ojo, 5. Longitud del hocico (**Figura 4**)
- Una vez se toman las mediciones se da click en: Analyze: Measure y aparecerá el siguiente cuadro de diálogo (**Figura 5**).
- Una vez realizada la medición, se copia a un cuadro de Excel con la información de la medición.

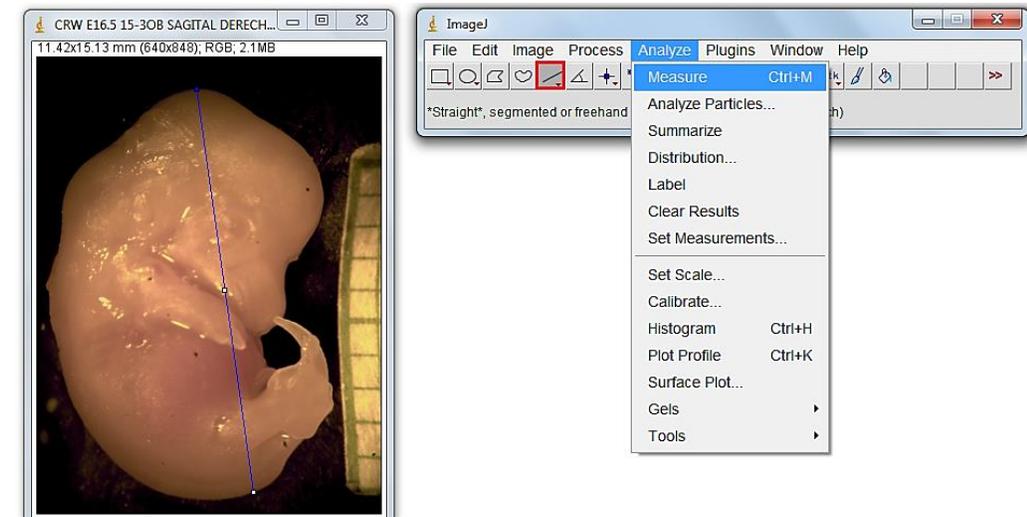


Figura 4. Ruta de acceso para la toma de medidas morfométricas sagitales derechas

File	Edit	Font	Results	
	Area	Perim.	Angle	Length
1	0.241	13.517	-81.955	13.517
2	0.135	7.535	154.163	7.535
3	0.099	5.535	-125.022	5.535
4	0.047	2.603	-64.841	2.603
5	0.028	1.535	-91.332	1.535

Figura 5. Cuadro de diálogo con las cinco medidas sagitales derechas en el orden correspondiente: 1. Longitud cráneo-rabadilla, 2. Longitud nasion-protuberancia occipital, 3. Longitud gonion-bregma, 4. Longitud cartílago nasal-ángulo interno del ojo, 5. Longitud del hocico. Sólo las medidas indicadas con rojo son las mediciones correspondientes en mm y son las que se copiarán en la tabla de Excel.

3. Mediciones frontales

- Para las medidas frontales se siguen los mismos pasos de calibración descritos en las **Figuras 1-3**
- Se toman las siguientes medidas de forma convencional siguiendo la misma ruta de acceso para la toma de medidas descrito en la **figura 4**
 - Longitud canto interno del ojo
 - Diámetro biparietal
- Para la toma de la referencia llamada “Vertical verdadera” se sigue la siguiente ruta: Edit: Draw (**Figura 6**). Esto con el fin que la medida quede fija para realizar las últimas tres mediciones que corresponden a:
 - *A': Distancia del canto interno del ojo izquierdo
 - *A: Distancia del canto interno del ojo derecho
 - Diferencia entre las dos medidas

Cada una de estas medidas debe de ser medida, y posteriormente dibujada según lo estipulado en la figura 6. Una vez realizadas todas las medidas frontales se procede a: Analyze: Measure y se seleccionan solo las medidas indicadas en rojo para copiar en la hoja de Excel (**Figura 7**).

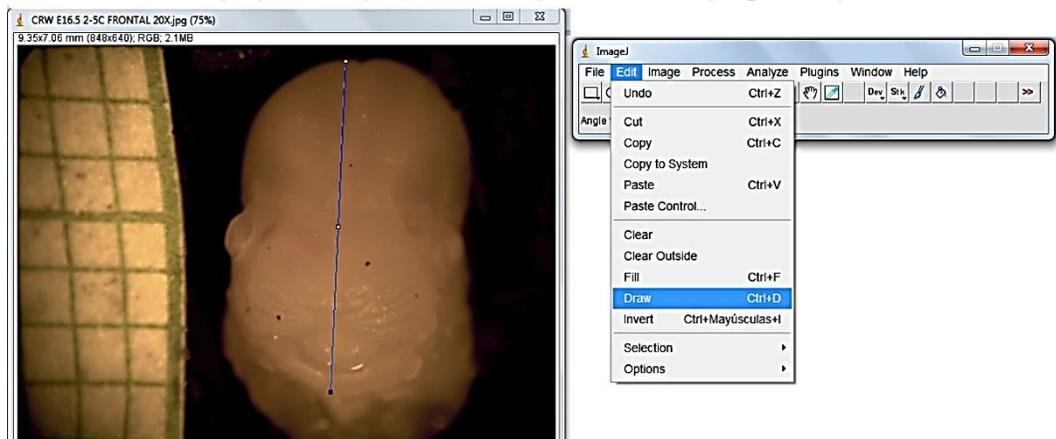


Figura 6. Ruta de acceso para dibujar la Vertical verdadera

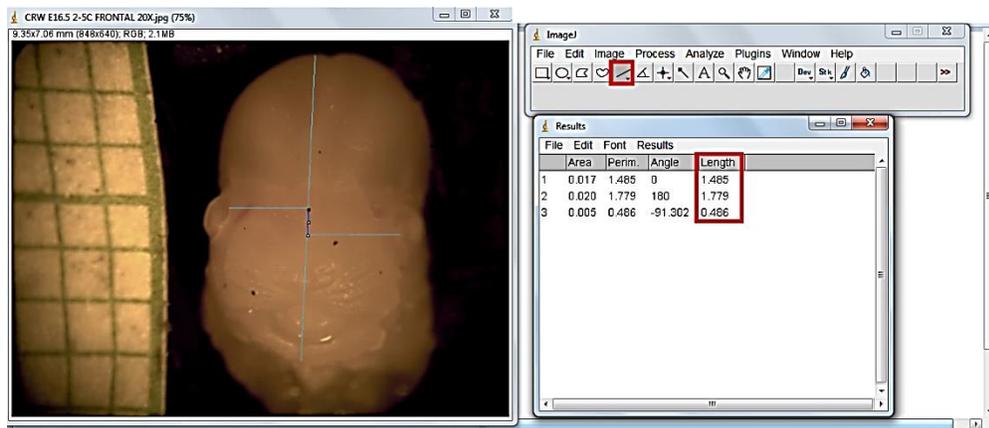


Figura 7. Ruta de acceso para la toma de medidas morfométricas frontales

3. Mediciones coronales

- Para las medidas coronales se siguen los mismos pasos de calibración descritos en las **Figuras 1-3**
- En la barra de herramientas se selecciona el ícono llamado “Polygon selection” (resaltado en rojo) se procede a la medida del perímetro cefálico **Figura 8.**
- Analyze: Measure y se toma el dato denominado perímetro (resaltado en rojo). **Figura 8.**

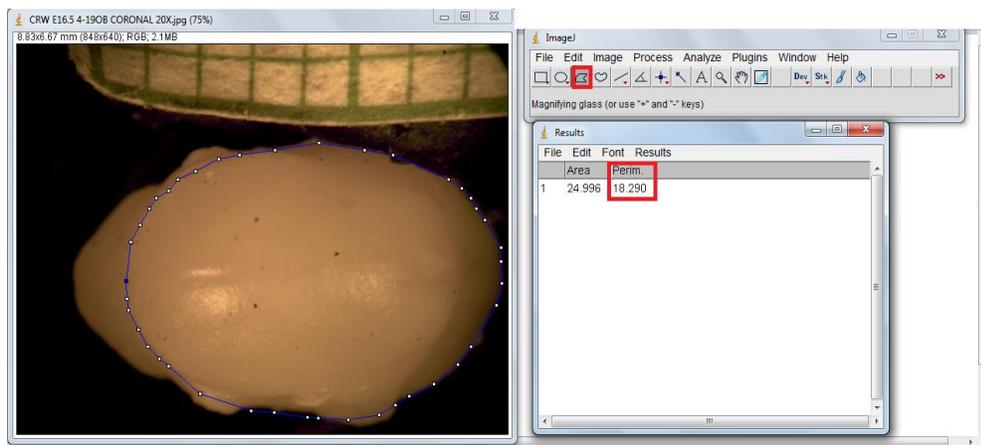


Figura 8. Ruta de acceso para la toma del perímetro cefálico

- La toma de la distancia interparietal y anteroposterior se realiza seleccionando el ícono “Straight” de la barra de herramientas
- Se seleccionan los puntos de referencia y click en Analyze: Measure

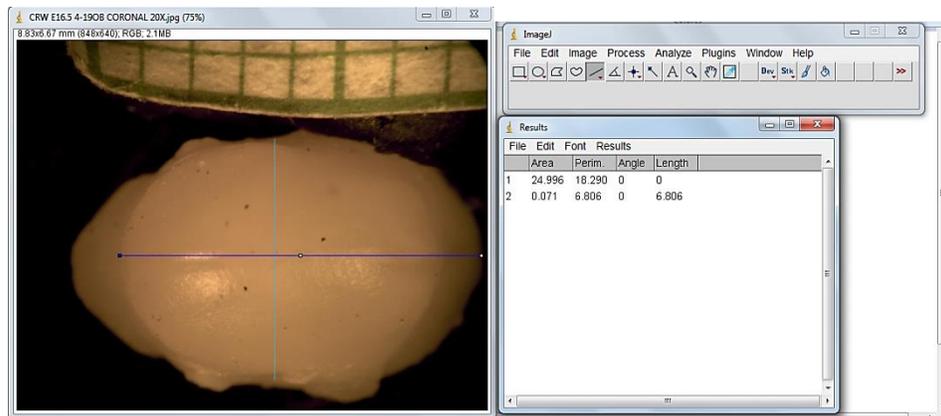


Figura 9. Ruta de acceso para la toma de medidas coronales

17.11 POE Estimación del estadio de Theiler

 <p>Universidad del Valle</p> <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p align="center">Protocolo estimación del estadio de Theiler en rata Wistar E16.5</p>	<p align="center">SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar M. Msc. Mario Alejandro Ortiz Msc.</p>	<p>Fecha de creación dd mm aa</p>	
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD Liliana Salazar M. Msc. Mario Alejandro Ortiz Msc.</p>	<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>	
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>	<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>	

Tabla 2. Estimación del estadio de Theiler en embriones de rata Wistar E16.5

Nombre de la variable	Dependiente/independiente	Tipo de variable	Unidad operacional
Estadio de Theiler	Independiente	Cualitativa/ordinal	1-Estadio de Theiler 22 2- Estadio intermedio (22-23) 3-Estadio 23

Definición	1-Estadio Theiler 22: con magnificación, se pueden ver que los dedos individuales están separados en el antepié. En contraste, en el retropié hay interdigitaciones entre los dedos de los pies, pero no están separados. Numerosos folículos pilosos pueden estar organizados en la piel, excepto en la región de la cabeza. Los somitas son discernibles sólo en la parte distal de la cola. El pabellón de la oreja en crecimiento está hacia adelante y cubre sólo una parte del meato auditivo externo. La hernia umbilical es muy conspicua en este estadio	2- Estadio intermedio entre Theiler 22 y 23: con características de ambos.	3-Estadio 23: La característica más prominente que define este grupo es la separación de los dedos de los pies y los dedos de las manos. Están claramente divergentes y no se volverán paralelos hasta mucho después. El pabellón auricular cubre más de la mitad del meato auditivo externo. En fresco, las venas superficiales están usualmente visibles. En los especímenes fijados, las elevaciones discretas de los folículos pilosos pueden ser vistos en todo el cuerpo. Los párpados todavía están abiertos. Los 65 somitas no pueden ser detectados por la inspección externa.
------------	--	---	--

Estadio 22---Día 14 11-12 mm

Externamente: con magnificación, se pueden ver que los dedos individuales están separados en el antepié. En contraste, en el retropié hay interdigitaciones entre los dedos de los pies, pero no están separados. Numerosos folículos pilosos pueden estar organizados en la piel, excepto en la región de la cabeza. Los somitas son discernibles sólo en la parte distal de la cola. El pabellón de la oreja en crecimiento está hacia adelante y cubre sólo una parte del meato auditivo externo. La hernia umbilical es muy conspicua en este estadio

- El **antepié** se compone de los cinco metatarsianos que forman el metarso y las falanges del pie. Al igual que los dedos de la mano, el dedo gordo tiene dos falanges (proximal y distal), mientras que el resto de los dedos tienen tres falanges. Las articulaciones entre las falanges se llaman interfalángicas

y las que existen entre el metatarso y las falanges se denominan metatarsfalángeas. Su función es dinámica.

- El **retropié** está compuesto por el astrágalo y el calcáneo o talón. Los dos huesos largos que componen la pierna, la tibia y el peroné, se conectan con la parte superior del astrágalo para formar el tobillo. Tiene función estabilizadora.

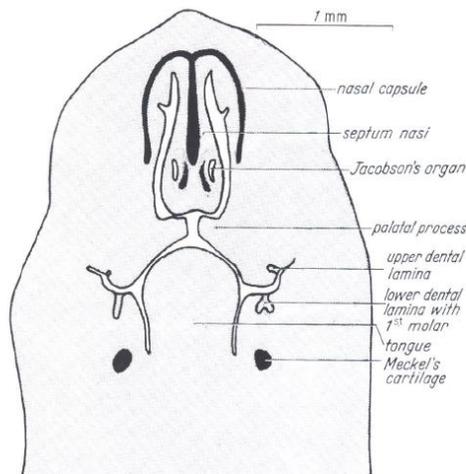
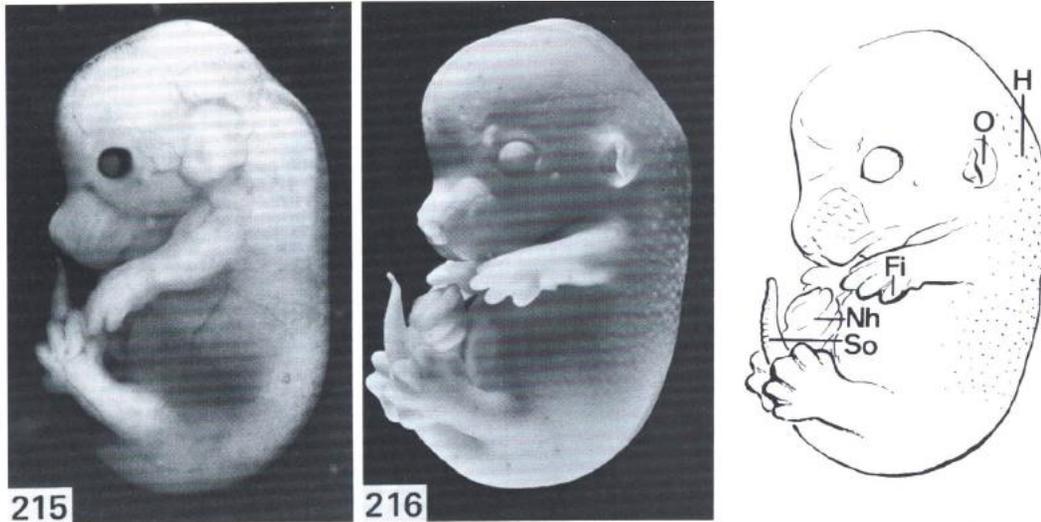


FIG. 226. Transverse section of nasal cavities (for plane of section see Fig. 25, *armus*).

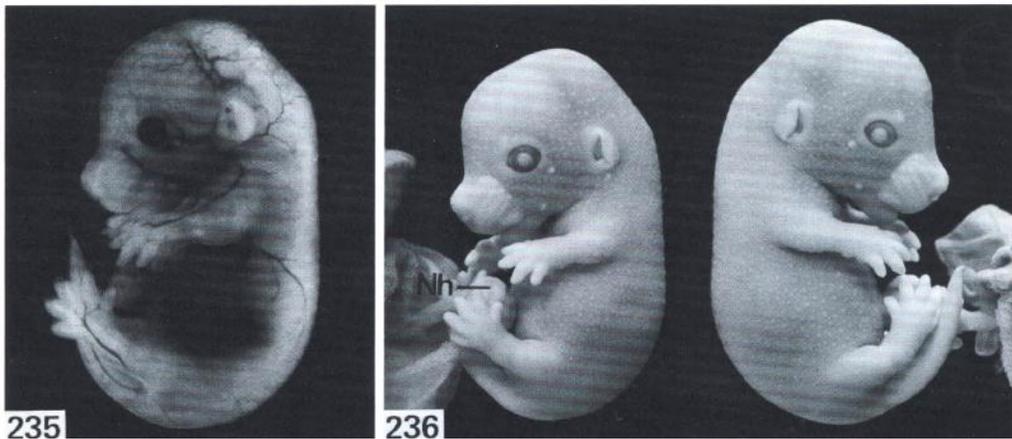
Estadio 23---- Día 15

12 -14 mm

Características externas

La característica más prominente que define este grupo es la separación de los dedos de los pies y los dedos de las manos . Están claramente divergentes y no se volverán paralelos hasta mucho después. El pabellón auricular cubre más de la mitad del meato auditivo externo. En fresco, las venas superficiales están usualmente visibles. En los especímenes fijados, las elevaciones discretas de los folículos pilosos pueden ser vistos en todo el cuerpo. Los párpados todavía están abiertos. Los 65 somitas no pueden ser detectados por la inspección externa.

La longitud varía de 11.5 a 14 mm. En las secciones sagitales no hay diferencias importantes del estadio anterior y el siguiente.



<u>Species</u>	<u>Stage</u>	16	17	18	19	20	21	22	23
Human	Days	40	42	44	48	52	54	55	58
Mouse	Days	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16
Rat	Days	14	14.5	15	15.5	16	16.5	17	17.5

Bibliografía

- <http://www.emouseatlas.org/emap/home.htm>

17.12 POE Densitometría óptica de las crestas palatinas

 <p>Departamento de Morfología</p> <p>Unidad de Histología</p>	<p>Protocolo de densitometría crestas palatinas de rata Wistar E16.5</p> <p>programa Image pro plus</p>	<p>SELLO SECO</p>
<p>REVISADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD</p>		<p>Fecha de creación dd mm aa</p>
<p>APROBADO POR: Maria Carolina Pustovrh, PhD</p>		<p>Fecha de Aprobación dd mm aa</p>
<p>REALIZADO POR: Estefanía Cuéllar Rivas</p>		<p>Fecha de Realización dd mm aa</p>

Introducción

El siguiente protocolo se realiza con el objetivo de cuantificar la cantidad de marcadores de MMP2, MMP9 y TIMP2 presentes en las crestas palatinas laterales de rata Wistar en estadio E16.5. La medición se realizará por medio de la densitometría óptica, la cual es una herramienta útil para cuantificar la marcación en técnicas de inmunohistoquímica. El programa de *Image Pro Plus* nos permitirá determinar la densitometría en el mesénquima y epitelio de la región palatina de cada una de las crestas, derecha e izquierda.

Es necesario conocer la anatomía de las crestas palatinas para determinar el área a cuantificar, el siguiente esquema representa el área de una cresta palatina en varios estadios de formación del paladar (Ver figura No 1). La zona marcada en gris, representa el epitelio de la cresta, el cual a su vez está dividido por las zonas que éste delimita (N: nasal, M: Medial, O: oral, tg: Germen dental).

Para la cuantificación del epitelio y del mesénquima, se realizará la medición de cada uno de ellos por separado, a su vez se tomarán tres medidas en diferentes tiempos decididos por los investigadores.

Medición del epitelio de la cresta palatina

Para la toma de medidas, el epitelio en particular será analizado en su totalidad, seleccionado el epitelio nasal, medial, oral y adyacente al germen dental (si este último está presente). Tomando como referencia la membrana basal del epitelio y el límite apical del mismo.

Medición del mesénquima palatino

Para la toma del mesénquima palatino se delimitará la zona representada en la gráfica partiendo como referencia la membrana basal del epitelio (nasal, medial, oral y germen dental) y trazando una línea perpendicular oblicua (no necesariamente recta) como lo muestra la figura 1.

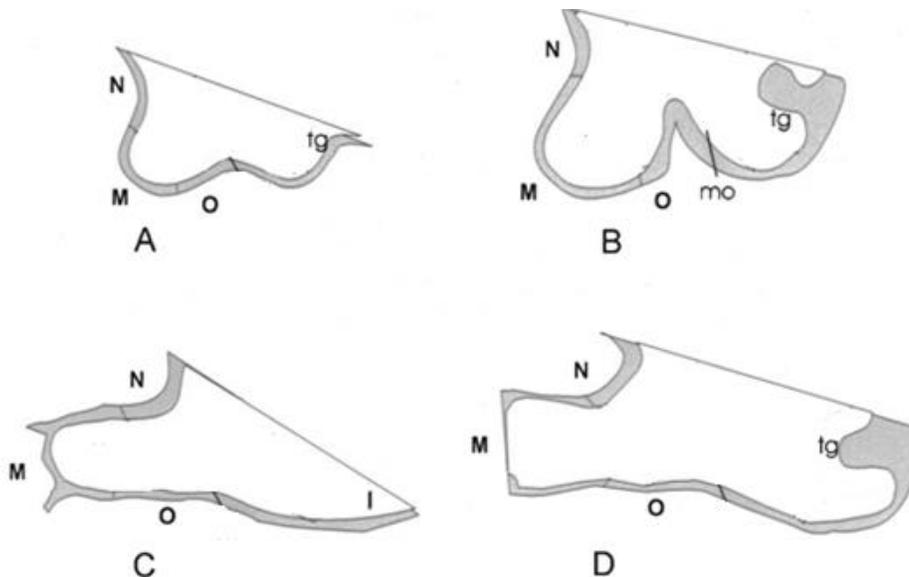


Figura 1; Adaptada de Morris y col 2000; A: iniciación, B: Crecimiento vertical, C: Elevación, D: Adhesión. Las siglas demarcan las zonas límites a demarcar: N: nasal, M: medial, O: oral, TG: germen dental

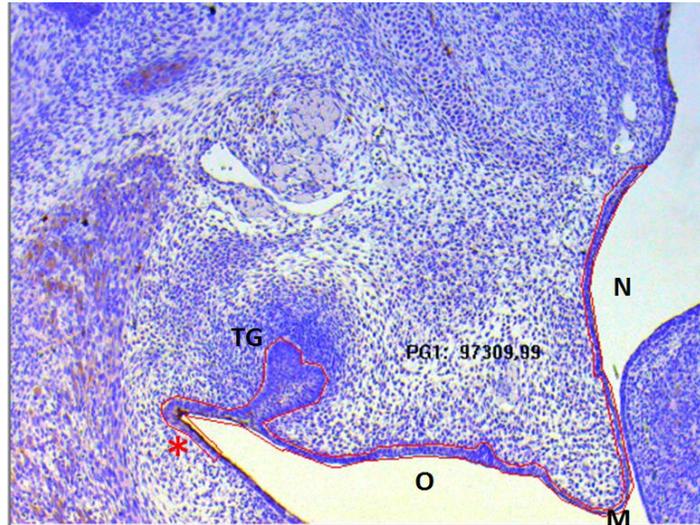


Figura 2. Área seleccionada del epitelio de la cresta palatina derecha. Las regiones seleccionadas; N: nasal, M: medial, O: oral, TG: germen dental, y en asterisco (*) corresponde al borde de la cresta hasta donde se selecciona la zona epitelial a analizar

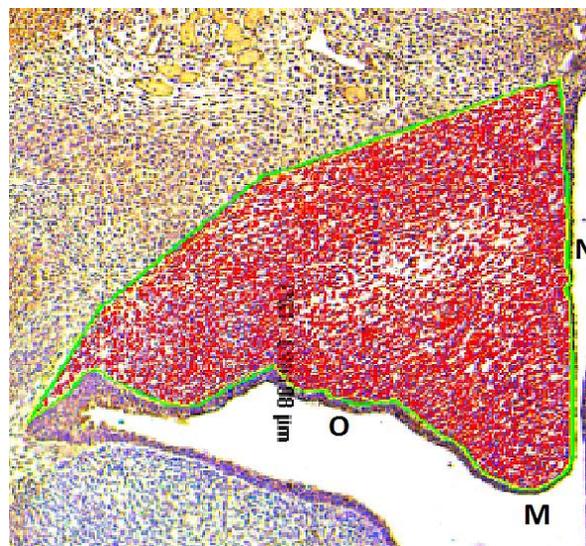


Figura 3. Área seleccionada del mesénquima de la cresta palatina derecha.
Las regiones seleccionadas; N: nasal, M: medial, O: oral, y en asterisco

PROCEDIMIENTO

1. El primer paso para el análisis de densitometría es cumplir con los parámetros de la toma de imágenes que estas sean las mismas para las imágenes a analizar para la misma proteína
2. Las imágenes para analizar están en un aumento de 10 X

Los parámetros de las imágenes para cada uno de los marcadores a analizar son los siguientes:

Aumento 10x:

MMP-2	MMP-9	TIMP-2
-Exposición 46,8 ms	-Exposición 46,8 ms	-Exposición 46,8 ms
-Ganancia 2,3 x	-Ganancia 2,3 x	-Ganancia 2, 3x
-Saturación 2,40	-Saturación 2,15	-Saturación 2,15
-Gamma 1,40	-Gamma 1,40	-Gamma 1,40
Formato capturado: 2048 x 1536	Formato capturado: 2048 x 1536	Formato capturado: 2048 x 1536
-Histograma: 0-255	-Histograma: 0-255	Tono: 145
-Tono: 157	-Tono: 145	-Saturación 16
-Saturación: 19	-Saturación 16	

Tabla 1. Parámetros de la toma de imágenes en microscopio óptico

3. Se debe realizar la calibración de las imágenes con la regleta de calibración, seleccionando el aumento de 10 x

4. Se selecciona en la siguiente ruta del programa: **File-open-Carpeta de aumentos-Aumento de 10x-Abrir**

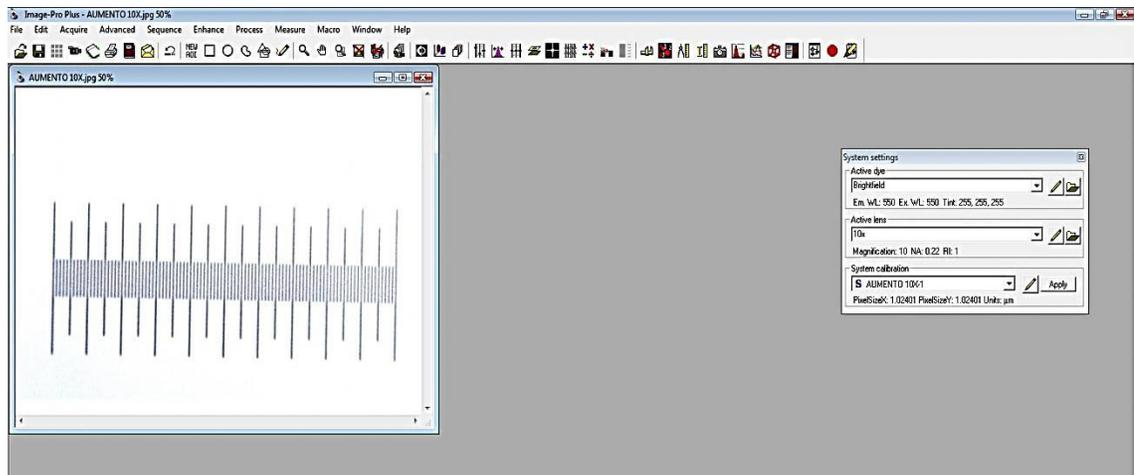


Figura 4. Calibración Aumento 10X con rejilla de calibración

5. Se selecciona la opción: **Measure-calibration-Spatial calibration Wizard-Calibrate the active image-Next**

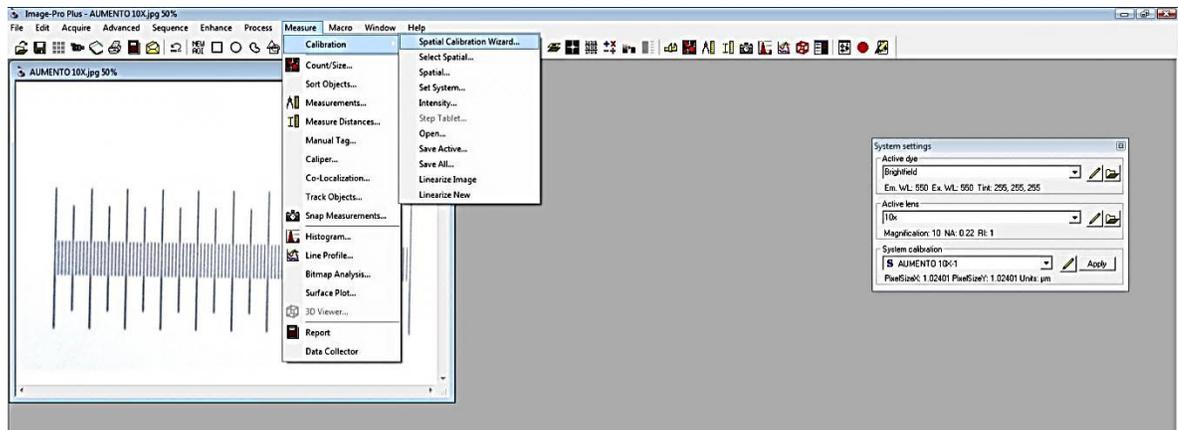


Figura 4.1 Calibración Aumento 10X

6. Se da el nombre de "AUMENTO DE 10", y se selecciona la unidad de medición en micras (μms)

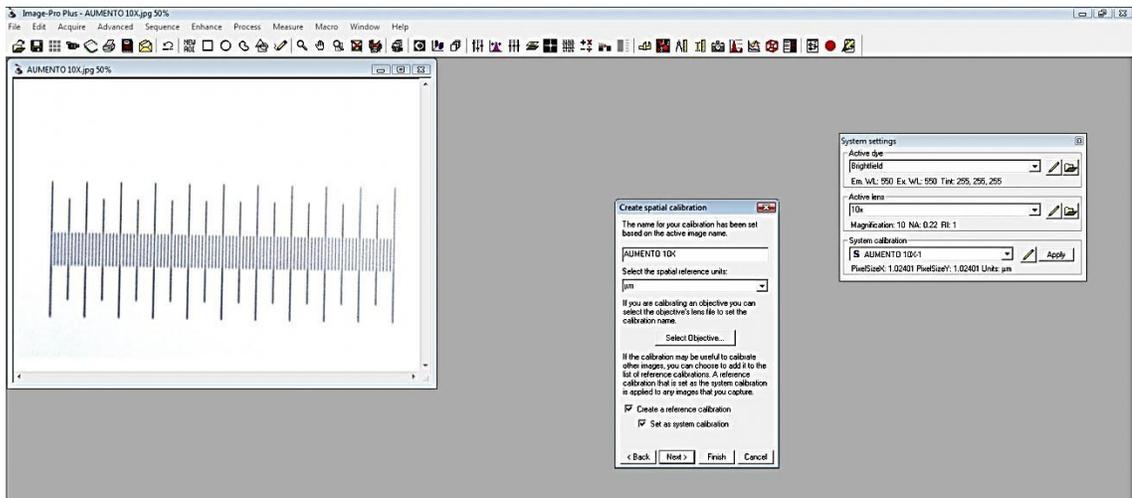


Figura 4.2 Calibración Aumento 10X

7. Se da la opción de: **create a reference calibration, set as a system calibration-next**

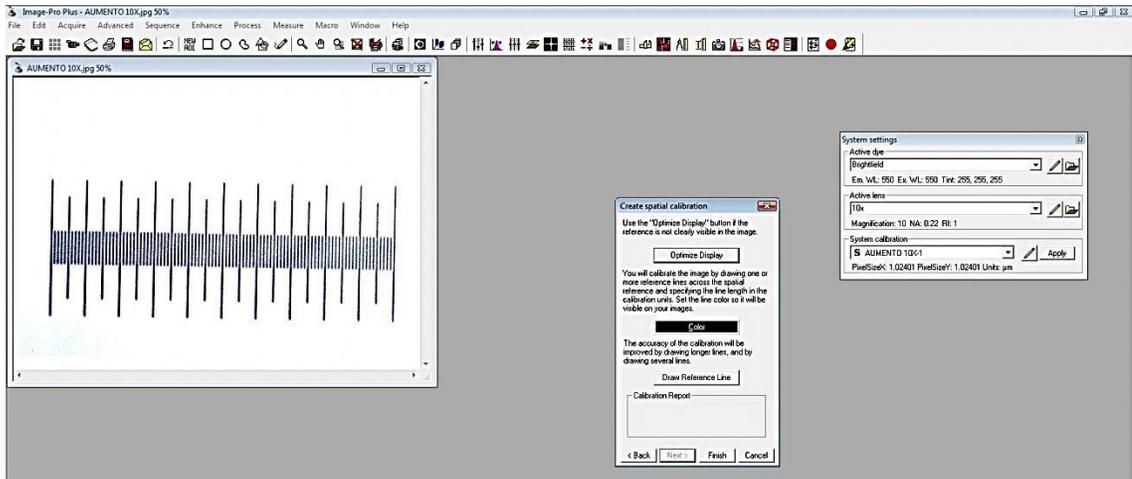


Figura 4.3 Calibración Aumento 10X

8. Se da la opción de optimizar color, se da zoom a la imagen y se selecciona las unidades, cada línea de la regleta son 10 micras, se seleccionan 50 desde el borde de cada línea, y se da la escala equivalente de 50 micras y aceptar.

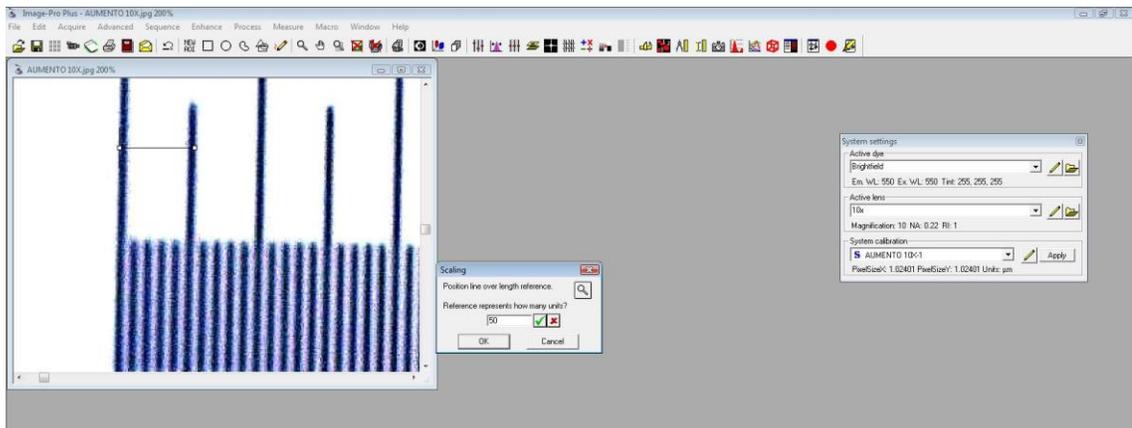


Figura 4.4 Calibración Aumento 10X

9. Se verifica que haya quedado correctamente calibrada midiendo la distancia en la misma regleta en unidades de micras, en el ícono de mediciones y medir distancia.

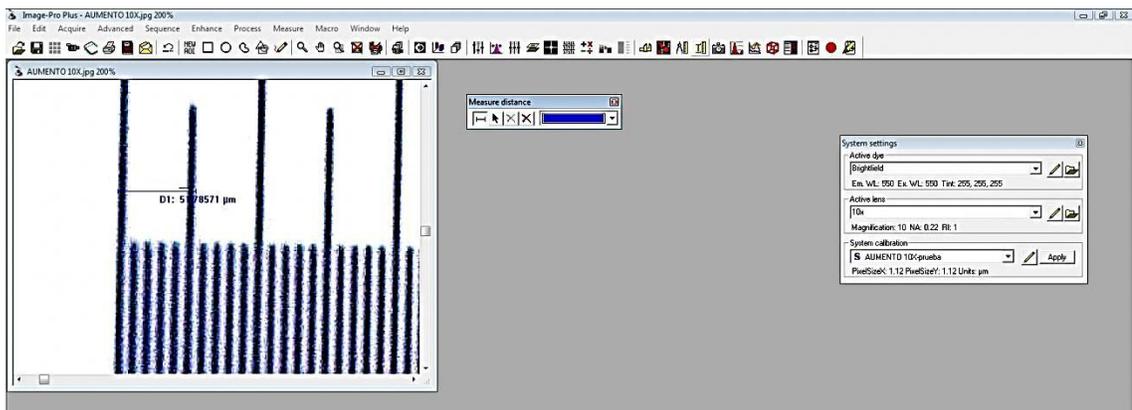


Figura 4.5 Calibración Aumento 10X

Una vez se ha realizado la correcta calibración se procede a medir la imagen

10. Se selecciona la imagen a medir y se procede a dar en la opción **medir-calibración- set system** y se da la opción de “AUMENTO DE 10X” y aplicar.

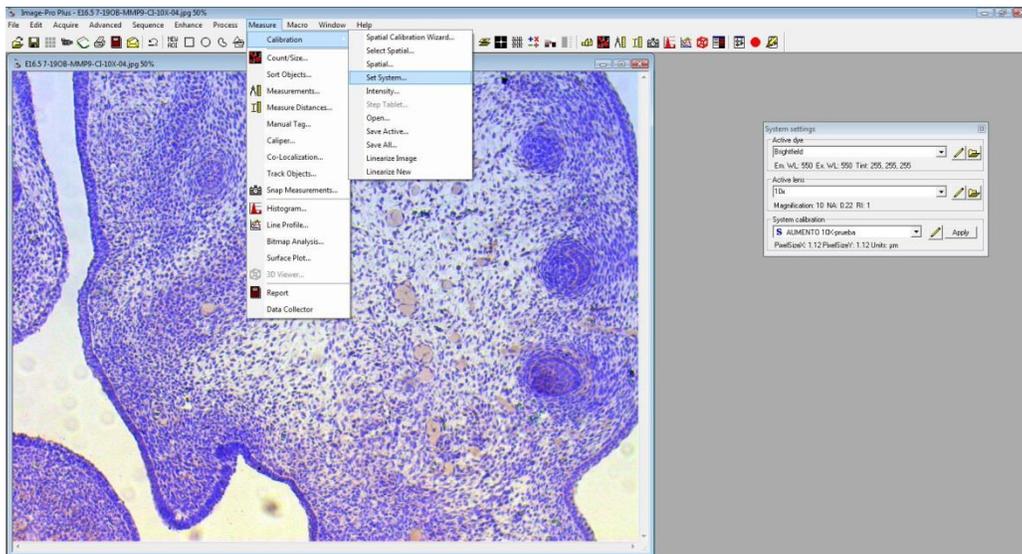


Figura 5. Apertura de la imagen a analizar. Se calibra con el aumento de 10X

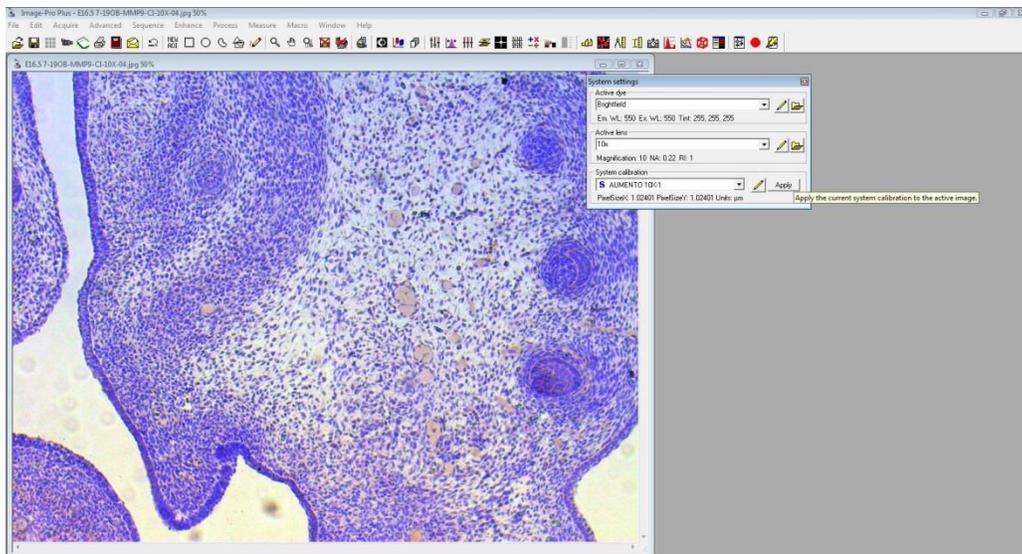


Figura 5.1 Apertura de la imagen a analizar. Se calibra con el aumento de 10X

11. Se selecciona el área a medir con la opción de compás, señalada en rojo en la barra de herramientas, posterior a esto saldrá el recuadro de mediciones, y se da click en el recuadro señalado en rojo.

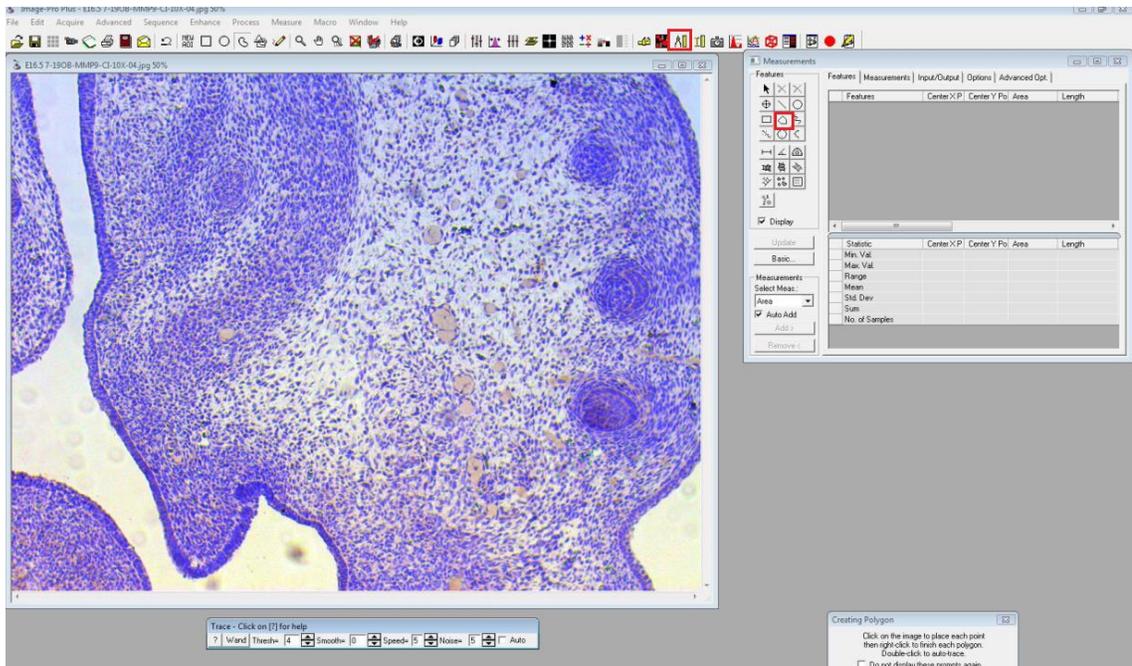


Figura 6. Selección del mesénquima para estimar el área de la cresta

12. Se selecciona la zona del mesénquima de la cresta, bordeando la lámina basal del epitelio, desde la zona que esta adyacente al tabique nasal, trazando una línea oblicua hasta el límite del epitelio oral, una vez señalada el área se da click con el botón secundario del mouse, se toma el dato del área y se escribe en el formato de Excel.

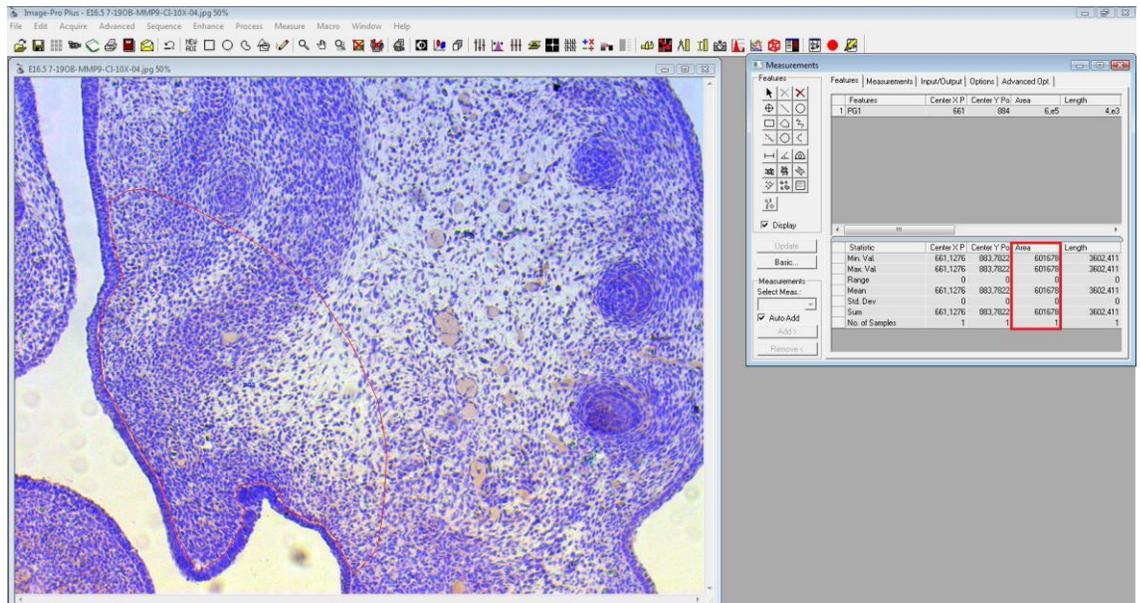


Figura 6.1 Selección del mesénquima para estimar el área de la cresta, se obtiene la medida en micras y se anota en el formato de Excel

13. Se cierra la ventana de medidas, y se selecciona el ícono marcado en rojo en la barra de herramientas, se selecciona el área previamente demarcada y con el botón secundario termina de delimitar el área la cual quedará de color verde.

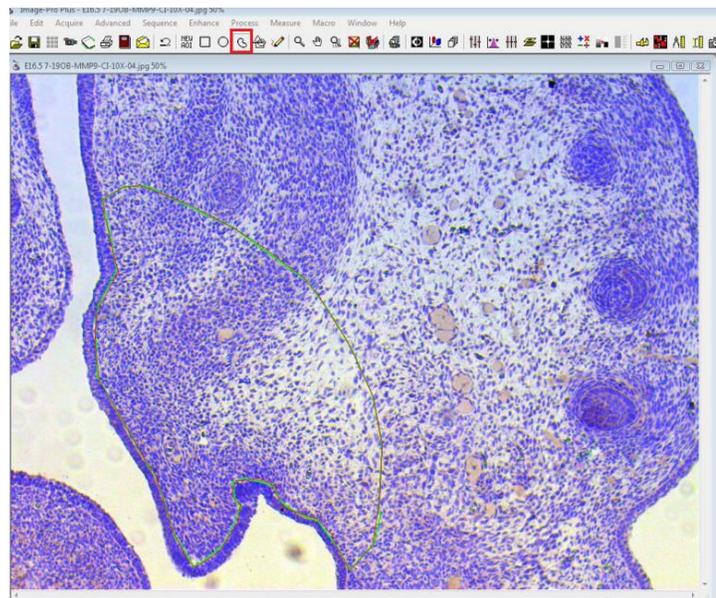


Figura 6.2 Selección del área del mesénquima demarcada para realizar la densitometría

14. Se procede a realizar la medición del marcador: en medición, *Contar y medir, seleccionar colores*, y se da nombre al marcador en el recuadro que dice "Class 1" se reemplaza por el nombre de la proteína a medir ya sea "MMP-2, MMP-9, TIMP-2"

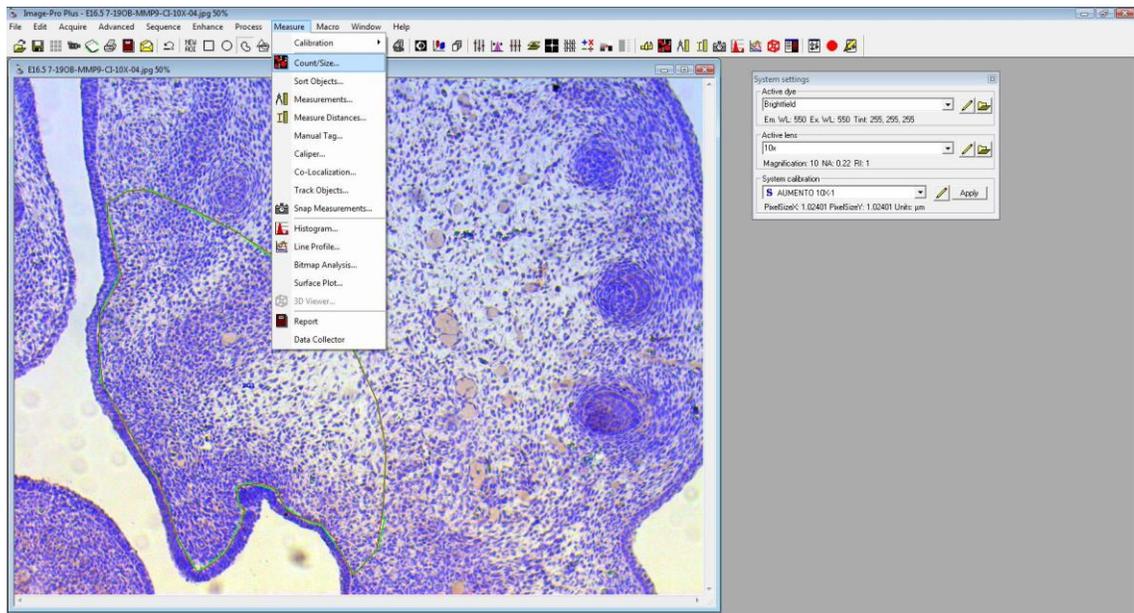


Figura 6.3 Selección del área del mesénquima demarcada para realizar la densitometría

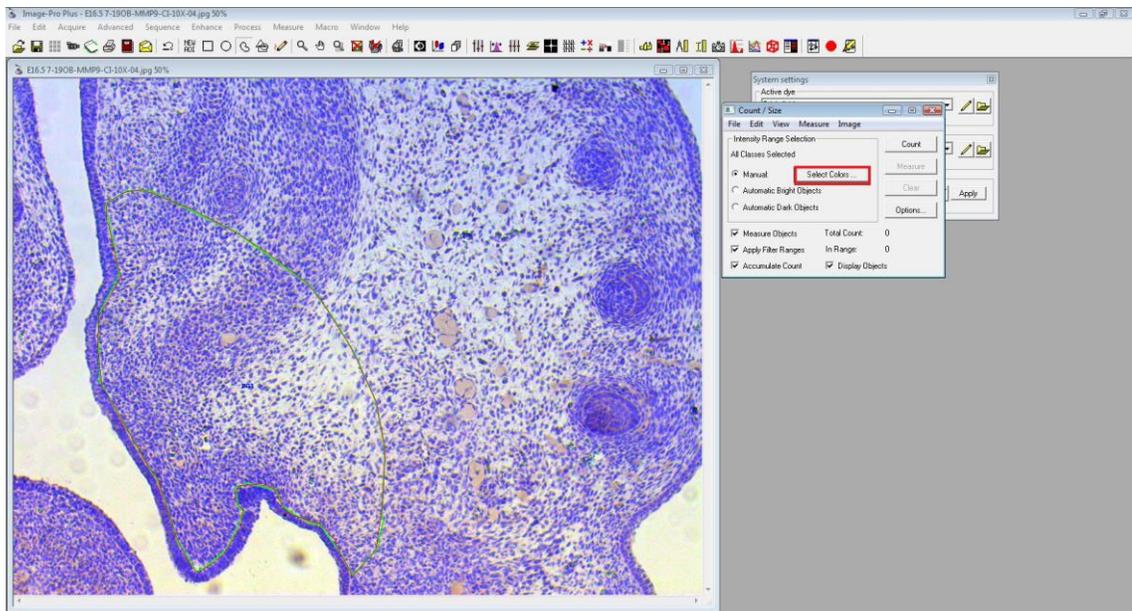


Figura 6.4 Selección del área del mesénquima demarcada para realizar la densitometría

13. En el recuadro que dice 3x3 se cambia al de 1x1, lo cual significa que la medición se hará pixel por pixel. Se da click en el ícono del gotero resaltado en rojo para empezar a realizar el conteo del marcador.

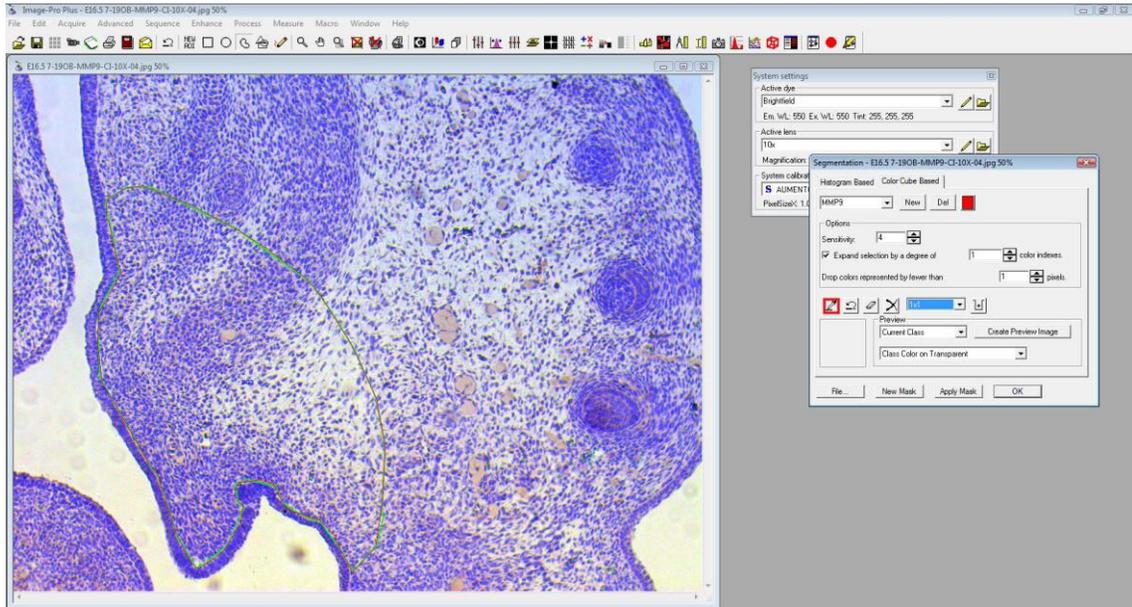


Figura 7. Selección de pixeles marcados con las proteínas de interés

Se da zoom a la imagen con el mouse, y se seleccionan los pixeles de en la escala de verdes, café y amarillos más intensos, en un umbral de RGB de rojo (23-251), verde (53-248), azul (2-80). Si se selecciona un pixel incorrecto se da la opción del ícono de borrar y nuevamente el gotero para seleccionar. Una vez se han seleccionado los pixeles se da la opción *ok*.

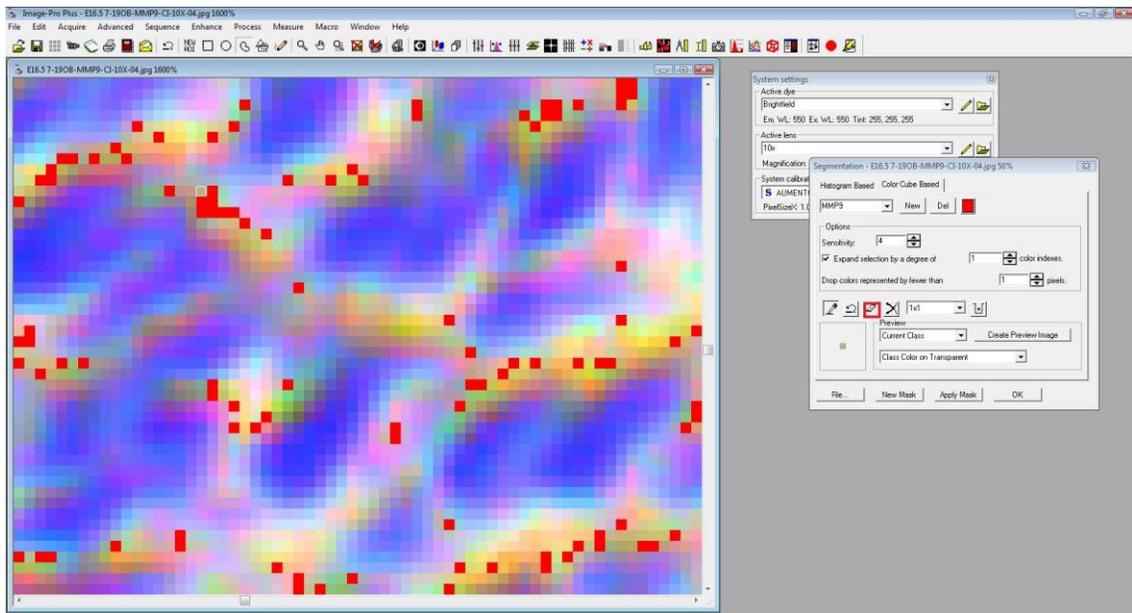


Figura 7. 1 Selección de pixeles marcados con las proteínas de interés

14. Se da la opción de medir, Seleccionar medidas, y se da la opción de densidad/sumatoria y aceptar

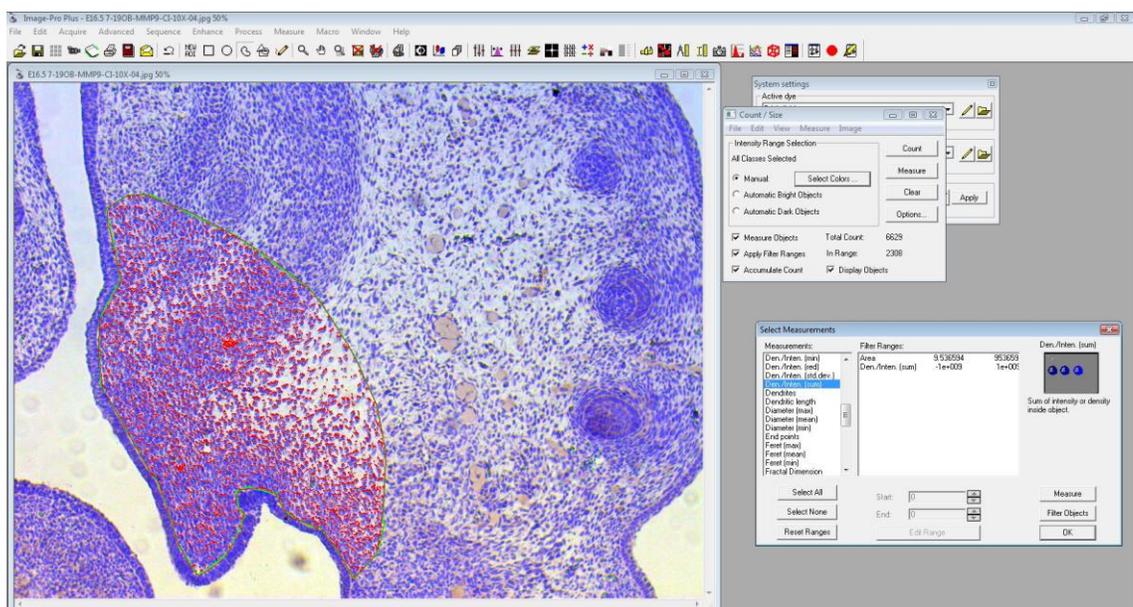


Figura 7.2 Selección de la opción sumatoria de densidades

15. Se da la opción de contar (en verde) y visualizar, estadísticas (en rojo)

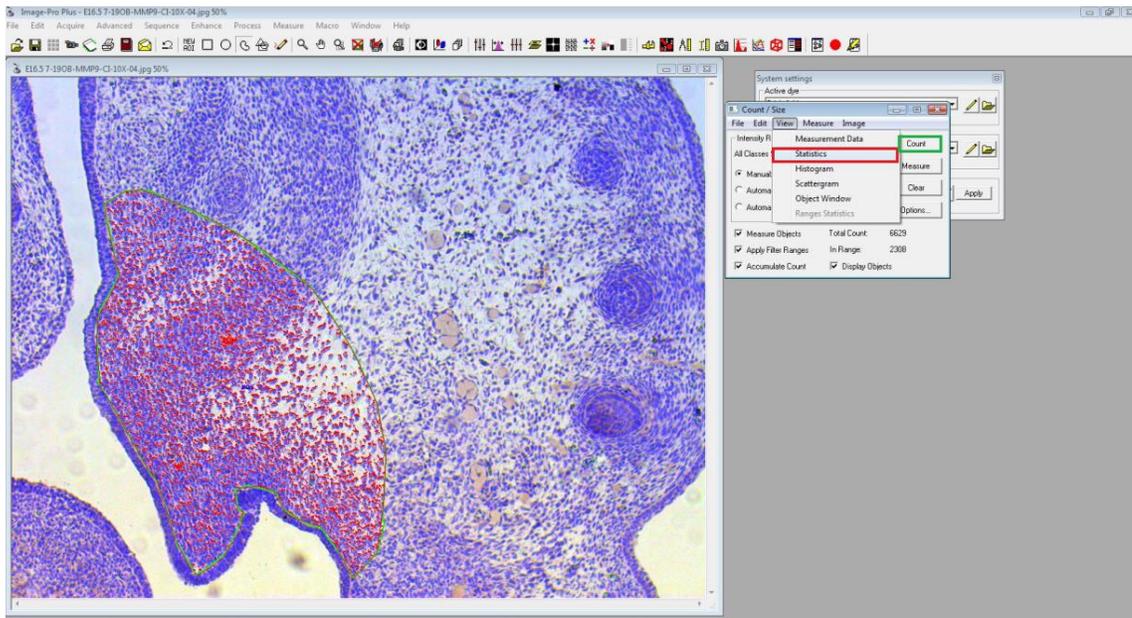


Figura 7.3 Selección de la opción estadísticas

16. Aparecerá un cuadro con la información requerida, solo se toma el dato de la sumatoria del recuadro de densidad intensidad, y se anota el dato en la tabla de Excel

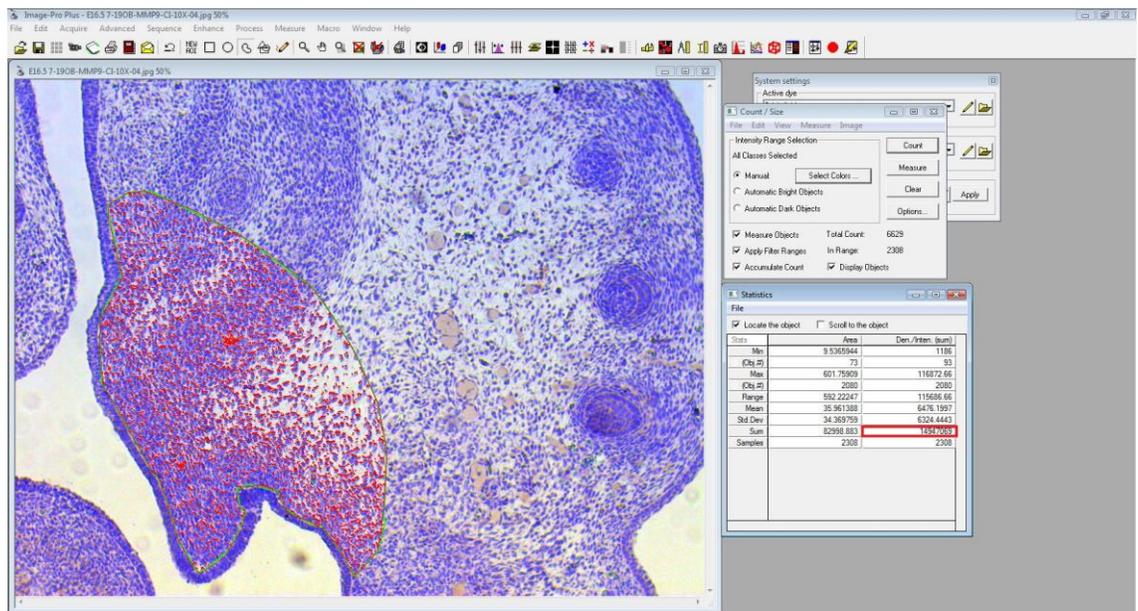


Figura 8. Toma del dato de la medición en la opción marcada en rojo

17.13 Aval de comité de ética animal de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle



Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales en Experimentación
Facultad de Salud

ACTA DE AVAL A PROYECTO DEL AREA BIOMEDICA N° 001-013

Proyecto: **ESTUDIO DE LA PALATOGÉNESIS EN UN BIOMODELO DE OBESIDAD MATERNA INDUCIDA POR DIETA DE CAFETERÍA**

Línea biomédica:

Sometido por: **Judy Villavicencio, Carolina Pustovrh, Estefanía Cuéllar, Liliana Salazar, Mario Alejandro Ortiz, Asesor: Veterinario Mauricio Villalobos**

Código Interno: Fecha en que fue sometido:

Fecha Certificación CEAS:

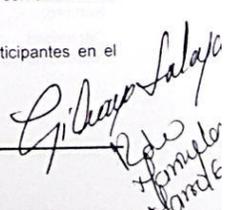
El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética con animales de experimentación biomédica (CEAS) mediante Resolución No. 27-A de Marzo 10 de 1997, el cual está regido por la Ley 84, de 1989 y la Resolución No. 8430 de 1993 del 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:

<input checked="" type="checkbox"/> Resumen del proyecto	<input type="checkbox"/> Result de eval otros comités (si aplica)
<input checked="" type="checkbox"/> Formato solicitud de evaluación CEAS	<input type="checkbox"/> Cartas de las instituciones participantes
<input type="checkbox"/> Certificación Medico Veterinario	<input type="checkbox"/> 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:

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:	
- Que los procedimientos que se proponen para proteger a los animales experimentales son adecuadas y humanizados.
- La forma de obtener las licencias o permisos (si aplican), presentados por los participantes en el estudio es adecuan a norma



17.14 Anexo

Estudios publicados en biomodelos murinos sobre la expresión de MMP-2,-9 y TIMP-2 en la palatogénesis y los métodos empleados para su detección.

Adaptada de: Cuéllar et al, Expresión de MMPs en el proceso de la palatogénesis, Revisión de la literatura, 2014

Autores y año de publicación	Especie	MMP y/o TIMP estudiada	Métodos
Iamaroon y colaboradores ²⁰⁸ 1996	Ratones CD1 estadios E10 y E11	MMP-2	Zimografía en gelatina e inmunofluorescencia indirecta y directa con microscopía convencional
Morris y colaboradores ¹⁴⁶ 1999	Ratones CD1 estadios E12, E13, E14	MMP-2, 3, 7, 9 y 13 TIMP1 y 2	Zimografía en gel, con o sin inhibidores, Western Blot
Morris y colaboradores ¹⁴⁷ 2000	Ratones CD1, estadios E12, E13 Y E14	MMP2, 3, 9 y 13 TIMP-1, 2, 3	Inmunofluorescencia
Mansell y colaboradores ¹⁴⁸ 2000	Rata Wistar en estadios E15, E16 y E17 y postnatales de 5 días	MMP-2, 3 TIMP-1 y 2	Cuantificación de colágeno por análisis de flujo continuo, cromatografía líquida de alta presión, cultivos <i>in vitro</i> de paladar, zimografía en gel, zimografía reversa y ensayo de sustrato fluorogénico
Blavier y colaboradores ³⁰ 2001	Ratones silvestres y mutantes para TGFβ3 en estadio E14.5	MMP-2, 13, MT1-MMP TIMP-2	Histología por H-E, hibridación <i>in situ</i> , cultivo de órganos, ensayos de Northern y Western Blot
Brown y colaboradores ²⁹ 2002	Ratones CD1 en estadios E13-15	MMP-2,-3	Cultivos de paladares con un inhibidor de la palatogénesis (BB3103), histología, zimografía en gel e inmunohistoquímica.
De Oliveira y colaboradores ¹⁴⁹ 2010	Ratones suizos (Mus musculus) en estadios E13, E14, E14.5 y E15.	MMP-2, 3, 9	Hibridación <i>in situ</i> , PCR en tiempo real, inmunohistoquímica, zimografía en gel.
Gkantidis y colaboradores ¹¹³ 2012	Ratones cepa C57BL/6 y embriones Bmp7 con alelo nulo en estadios E13.5, E14.5, E15.5	MMP-2,9,13 14	Zimografía <i>in situ</i> , inmunofluorescencia e hibridación <i>in situ</i>

17.15 Anexos Ponencias y publicaciones

1. Reconocimiento Primer puesto modalidad Póster y publicación del abstract.

✓ Estefanía Cuéllar Rivas, Maria Carolina Pustovrh, Liliana Salazar, *Estudio de la palatogénesis en un biomodelo animal de obesidad materna inducida por dieta de cafetería*, Revista Médica de Risaralda 2013; 19 (Suppl 2): i – XX

- ESTUDIO DE LA PALATOGÉNESIS EN UN BIOMODELO ANIMAL DE OBESIDAD MATERNA INDUCIDA POR DIETA DE CAFETERÍA

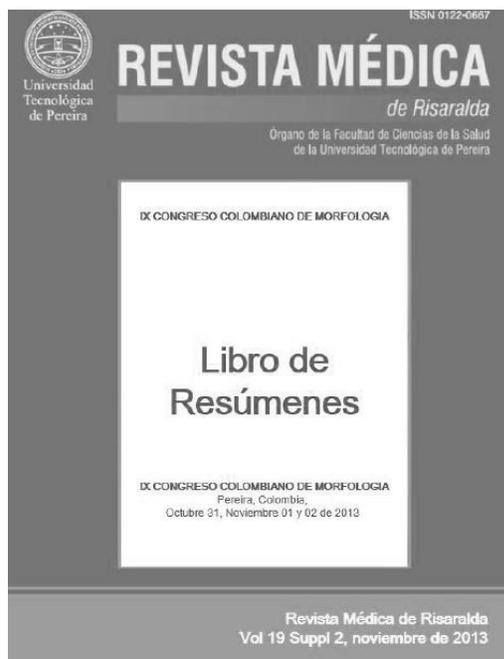
Autor(es): Estefanía Cuéllar Rivas¹, Liliana Salazar², Carolina Pustovrh³

¹Odentóloga, Universidad del Valle, Estudiante maestría en Ciencias Biomédicas, Universidad del Valle.

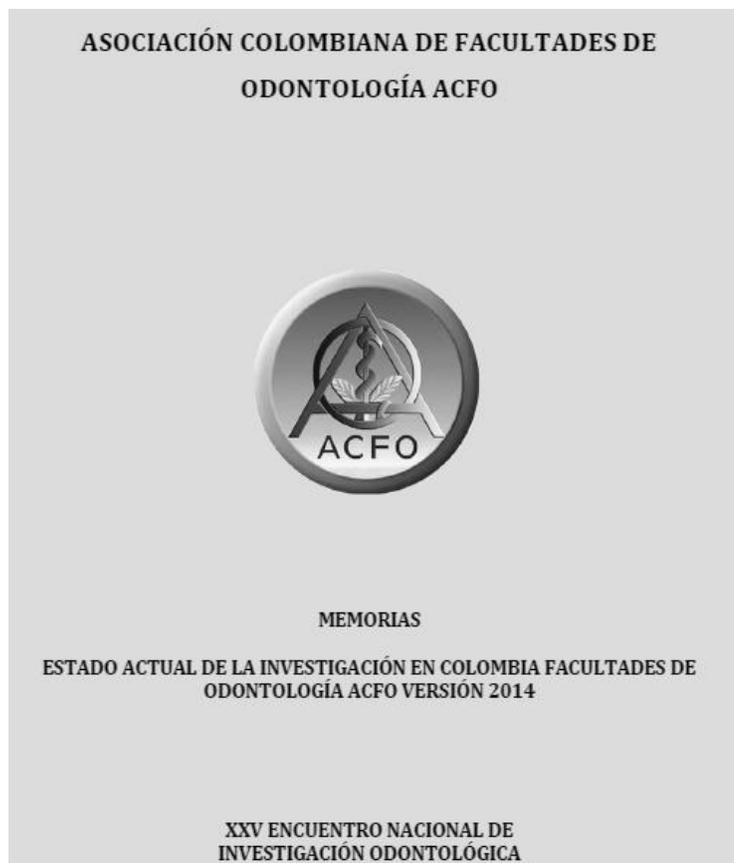
² Magister en Morfología, Universidad del Valle, Profesor asociado, Departamento de Morfología Universidad del Valle.

³PhD En Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires, Profesor asistente, Departamento de Morfología, Universidad del Valle.

Revista Médica de Risaralda 2013; 19 (Suppl 2): i - lxx



2. Presentación oral en el encuentro Nacional de Investigación Odontológica - ACFO. *Tipo de evento: Otro Ámbito: Nacional Realizado del 2-4 de octubre de 2014 y publicación en el libro de memorias del congreso*



CARACTERIZACIÓN DEL DESARROLLO CRANEOFACIAL EN EL ESTADIO E16.5 EN UN MODELO MURINO DE OBESIDAD (cód. CB08).

Cuellar Rivas Estefania, Pustovrh Ramos Maria C, Villavicencio Flórez Judy E, Ortiz Salazar Mario A, Salazar Monsalve Liliana. **Universidad del Valle.**
estefania.cuellar@correounivalle.edu.co

ANTECEDENTES. Los cambios en la conducta alimenticia y actividad física han incrementado la obesidad a nivel mundial, condición que afecta con mayor frecuencia

3. Publicación de artículos en revista especializadas

Expresión de metaloproteinasas en el proceso de palatogénesis: revisión sistemática de la literatura

Expression of Metalloproteinases in Palate Development: Systematic Literature Review

Estefanía Cuéllar Rivas
Odontóloga, estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Departamento de Morfología, Escuela de Ciencias Básicas, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Mario Alejandro Ortiz Salazar
Odontólogo, especialista en Ortodoncia, magíster en Ciencias Biomédicas, profesor, Departamento de Morfología, Escuela de Ciencias Básicas, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Judy Villavicencio Flórez
Odontóloga, especialista en Docencia Universitaria, profesora, Escuela de Odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia. Especialista en Odontopediatría, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Antecedentes: el desarrollo del paladar es un evento complejo que requiere la síntesis y la degradación de diferentes componentes de la matriz extracelular, como colágeno tipos I, II y III, fibronectina y ácido hialurónico. Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de proteasas encargadas de la remodelación tisular y su actividad está regulada por sus inhibidores endógenos (TIMP). Diferentes estudios demuestran la participación de MMP y TIMP en la palatogénesis y su relación con la presencia de fisuras oropalatinas. **Objetivo:** clasificar los diferentes estudios en modelos experimentales y en humanos que evidencien la participación de metaloproteinasas y sus inhibidores en el desarrollo palatino y su relación con patologías como el labio y paladar fisurado. **Métodos:** se realizó una revisión sistemática de la literatura en las bases bibliográficas PubMed, EMBASE, Web of Science y Cochrane con los términos booleanos *palate, development, palatogenesis, matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), extracellular matrix, y cleft and lip palate*, para clasificar los diferentes estudios relacionados con la presencia de MMP y TIMP en el paladar y los métodos utilizados para detectar su expresión en el paladar entre 1997 y 2014. **Resultados y conclusiones:** los estudios en modelos experimentales evidencian la participación de MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-25, ADAMTS9, y ADAMTS20 y TIMP en diferentes estadios del desarrollo palatino en murinos. Por el contrario, los reportados en humanos son escasos y se han relacionado con polimorfismos en MMP-3 y MMP-25 asociados a presencia de labio y paladar fisurado no sindrómico.

PALABRAS CLAVE

desarrollo; inhibidores de metaloproteinasas (TIMP); labio y paladar fisurado; matriz extracelular; metaloproteinasas (MMP); paladar; palatogénesis

ÁREAS TEMÁTICAS

Biología molecular; desarrollo craneofacial

ABSTRACT

Background: Palate development is a complex event that requires the synthesis and degradation of various components of the extracellular matrix, such as collagen type I, II and III, fibronectin, and hyaluronic acid. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of proteases responsible for tissue remodeling and its activity is regulated by their endogenous inhibitors (TIMPs). Several studies demonstrate the role of MMPs and TIMPs in palatogenesis and their relationship with cleft and lip palate. **Purpose:** To classify existing studies with experimental and human models that show the role of metalloproteinases and their inhibitors in palatal development and its relationship to diseases such as cleft lip and palate. **Methods:** This systematic literature was carried out in the PubMed, EMBASE, Web of Science, and Cochrane databases. The search included Boolean descriptors like *palate, development, palatogenesis, matrix metalloproteinases (MMPs), tissue of metalloproteinases (TIMPs), extracellular matrix, and cleft lip and palate*, in order to classify the studies related to the presence of MMPs and TIMPs in palate and the methods used to detect their expression between the years of 1997 and 2014. **Results and Conclusion:** Studies in animal models demonstrate the expression of MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-25, ADAMTS9, ADAMTS20, and TIMPs in different stages of development in murine palate. By contrast, studies reported in humans are scarce and have been associated with polymorphisms of MMP-3 and MMP-25 associated with the presence of non-syndromic lip and cleft palate.

KEYWORDS

cleft and lip palate; development; extracellular matrix; matrix metalloproteinases (MMPs); palate; palatogenesis; tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)

THEMATIC FIELDS

Craniofacial development; molecular biology

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Cuéllar E, Ortiz MA, Villavicencio J. Expresión de metaloproteinasas en el proceso de palatogénesis: revisión de la literatura. *Univ Odontol*. 2014 Jul-Dic; 33(71): __. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.empp>

doi:10.11144/Javeriana.uo33-71.empp

Recibido para publicación: 22/05/2014
Aceptado para publicación: 12/09/2014

Disponble en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

EL PAPEL DE LA ENAMELISINA (MMP-20) EN EL DESARROLLO DENTARIO: REVISIÓN SISTEMÁTICA

THE ROLE OF ENAMELYSIN (MMP-20) IN TOOTH DEVELOPMENT: SYSTEMATIC REVIEW

Estefanía Cuéllar Rivas¹, María Carolina Pustovrh Ramos²

RESUMEN. *Antecedentes:* el ameloblasto es la célula encargada de la producción y mineralización de la matriz orgánica del esmalte. Atraviesa varias etapas: la fase pre-secretora, secretora, de transición y maduración. En la fase secretora se producen los componentes de la matriz orgánica. En la fase de maduración se elimina el componente orgánico y se inicia el proceso de mineralización. Este proceso requiere de la participación de la metaloproteínasa de matriz 20 (MMP-20) o también llamada enamelisina. Diversos estudios demuestran la presencia de MMP-20 en el desarrollo dentario y su relación con alteraciones en la formación del esmalte. El objeto fue clasificar los diferentes estudios y técnicas de laboratorio empleadas que demuestren la participación de enamelisina en el desarrollo dentario y su relación con patologías en la formación del esmalte. *Método:* se realizó una revisión sistemática de la literatura con las siguientes bases bibliográficas: PubMed, Science-Direct, Hinari y SciELO, con el fin de clasificar los diferentes estudios relacionados con la participación de MMP-20 en el desarrollo dental y los métodos utilizados para detectar su expresión, entre los años de 2009 a 2014. *Resultados y conclusiones:* los modelos in vitro evidencian que MMP-20 tiene sitios específicos de escisión para las proteínas de matriz de esmalte. Este proceso se ve alterado por la composición química, iones, y la presencia de hidroxipatita. En los modelos knockout la morfología del esmalte está alterada. En los estudios en humanos, se ha relacionado la MMP-20 con una mayor susceptibilidad de caries dental, el grosor completo de esmalte y agenesias dentales.

Palabras clave: Desarrollo del esmalte, desarrollo dental, enamelisina, MMP-20, amelogenesis, amelogenesis imperfecta.

Abstract. *Background:* Ameloblasts are cells responsible for the production and mineralization of the organic matrix of enamel through several stages: pre-secretory, secretory, transition, and maturation. The organic matrix components are produced in the secretory phase. In the maturation phase, the organic component is removed and the mineralization process starts. This process requires the involvement of matrix metalloproteinase 20 (MMP-20), also called enamelysin. Several studies have shown the presence of MMP-20 in tooth development and its relationship to alterations in enamel formation. *Objective:* to classify the different studies and laboratory techniques used to demonstrate the involvement of enamelysin in tooth development and its relation to pathologies during enamel formation. *Method:* A systematic review was conducted with the following bibliographic databases: PubMed, Science-Direct, Hinari, and SciELO, in order to classify the different studies related to the involvement of MMP-20 in tooth development and the methods to detect its expression, between the years of 2009 and 2014. *Results and conclusions:* in vitro models show that MMP-20 has specific cleavage sites for enamel matrix proteins. This process is altered by chemical composition, ions, and the presence of hydroxyapatite. Enamel morphology is altered in the knockout models. In human studies, MMP-20 has been associated with increased susceptibility to dental caries, enamel thickness, and dental agenesis.

Key words: enamel development, tooth development, enamelysin, MMP-20, amelogenesis, amelogenesis imperfecta.

- 1 Maestría en Ciencias Biomédicas 2013 – 2015, especialización Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Ortodoncia y Ortopedia Maxilar 2015 – 2017.
- 2 Postdoctorado 2006 – 2007; Postdoctorado Universidad De Chile 2007 – 2009, Doctorado Universidad de Buenos Aires, Doctor en Ciencias 2002 – 2006.

RECIBIDO:

- 1 Master's Degree in Biomedical Sciences 2013-2015, specialization at Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Orthodontics and Maxillary Orthopedics 2015-2017.
- 2 Postdoctoral Fellow 2006-2007; Postdoctoral Fellow, Universidad de Chile 2007-2009, PhD Universidad de Buenos Aires, Doctor in Sciences 2002-2006.

SUBMITTIDO:

