La fisura palatina a través del grupo de investigación 920202

Teresa de la Jara Rodríguez. Sofía China Schiermeyer.

Licenciatura en Odontología. Facultad Odontología, Universidad Complutense de Madrid.
tjararo@gmail.com

María Concepción Martínez-Álvarez

Departamento de Embriología I. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid
cmartinez@med.ucm.es

Resumen: en este trabajo se analizan los mecanismos por los que se produce el desarrollo del paladar y aparece la fisura palatina de origen genético, así como el papel del factor de crecimiento transformador beta3 (TGF- β 3) a través de la investigación realizada por el grupo Complutense de Investigación 920202. La fisura palatina es una enfermedad con una incidencia de 1,7/1000 recién nacidos vivos. Mediante el análisis de los artículos publicados por el grupo (14), se estudian los mecanismos de fusión del paladar, el papel de TGF- β 3 en ellos y su alteración en la fisura palatina de los ratones mutantes negativos para Tgf- β 3. Además se investiga la importancia del ácido fólico en el desarrollo del paladar, demostrando que un déficit prolongado de esta vitamina causa fisura palatina, mientras que uno de corta duración altera los mecanismos por los que se fusiona el paladar. Finalmente, se caracteriza la fisura palatina congénita del perro Pachón navarro, comparándolo con perros de la misma raza de paladar normal, demostrando una alteración del crecimiento de los fisurados con respecto a los controles. Para poder realizar este estudio han tenido que poner a punto una técnica de alimentación para animales fisurados que permite su supervivencia. Últimamente, han presentado una técnica mínimamente invasiva para tratar quirúrgicamente esta patología de una forma mucho menos cruenta y más sencilla que la palatoplastia convencional, con potenciales beneficios en el crecimiento medio-facial.

Palabras clave: Fisura palatina. Tratamiento. Mecanismos. TGF- β 3. Apoptosis.

INTRODUCCIÓN

El paladar es una estructura del macizo facial que en su desarrollo depende de una fase crítica en la que todas las piezas, a modo de puzle, deben encajar. La porción principal del paladar definitivo está formada por dos evaginaciones laminares de los procesos maxilares, procedentes del primer arco branquial. Estas elevaciones, los procesos palatinos, aparecen en la sexta semana de desarrollo y crecen oblicuamente

a ambos lados de la lengua. En la séptima semana, rotan hasta alcanzar una posición horizontal fusionándose entre sí y formando el paladar secundario ⁽¹⁾.

El mecanismo fundamental de fusión de los procesos palatinos tiene lugar después de la adhesión de los epitelios del borde medial opuestos (EBM), epitelios que recubren las partes distales de los procesos palatinos. Una vez ambos EBM se adhieren, se forma una costura epitelial en la línea media (la costura epitelial medial - CEM-), que debe desaparecer para que el proceso de fusión se complete. Finalmente, el mesénquima que forma el espesor de los procesos palatinos se hace continuo en la línea media y la fusión queda finalizada.

La fisura del paladar es un defecto común que produce un aspecto facial anormal y dificultad en el habla. Estos defectos se deben a la falta de fusión parcial o completa del paladar primario con el paladar secundario, o por la falta de fusión de los procesos palatinos. Esta alteración puede originarse por múltiples causas, como pequeño tamaño de éstos, falta de rotación, inhibición del propio proceso de fusión o presencia de micrognatia, que hace que la lengua no descienda en el suelo de la boca, permitiendo su elevación.

La fisura palatina tiene una frecuencia de 1,7:1000 nacidos vivos ⁽²⁾. Es más frecuente en mujeres (67%), lo cual puede deberse a que en mujeres los procesos palatinos se fusionan una semana más tarde que en los varones. Es una patología con gran carga genética y hereditaria. Además, influyen una serie de agentes ambientales que pueden afectar al feto en su desarrollo, como el consumo de tabaco y drogas durante el embarazo, la falta de ácido fólico, diabetes gestacional y fármacos, como los anticonvulsivantes, entre otros, además de enfermedades infecciosas, como la toxoplasmosis.

El grupo de investigación Complutense 920202, que trabaja en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, formado por profesores del Departamento de Anatomía y Embriología Humana I, lleva desde el año 2000 investigando los mecanismos por los que se produce el desarrollo del paladar y aparece la fisura palatina, y en los últimos años ha desarrollado una terapia mínimamente invasiva para tratar dicho defecto.

Muchas investigaciones del grupo se han centrado en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar en el EBM de los procesos palatinos durante el desarrollo. Sin duda, uno de los mecanismos más importantes en la fusión del paladar es la desaparición de las células del EBM, al parecer por un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis ⁽³⁾, aunque la transformación epitelio-mesenquimatosa también juega un papel. Además, el grupo ha trabajado en el papel del factor de crecimiento Transforming Growth Factor β 3 (TGF- β 3) durante la fusión del paladar, que es clave. TGF- β 3 pertenece a una gran familia de polipéptidos, tiene un gran rango de actividades reguladoras, incluyendo el control de la proliferación celular, regulación de la matriz extracelular, migración celular,

diferenciación y transformación epitelio-mesenchimatosas^(4,5). El bloqueo de TGF- β 3 in vitro evita la fusión del paladar^(6,7) y los ratones mutantes negativos para TGF- β 3 presentan fisura palatina en el 100% de los casos. Analizaron igualmente el papel de moléculas de adhesión del EBM en la fusión palatina: E-cadherina, B-catenina, condroitin sulfato, vinculina, B-actina, etc. y cómo se alteran éstas en los mutantes negativos para TGF- β 3.

En esta línea, y con diferentes análisis sobre los elementos implicados en el mecanismo de fusión del paladar, han continuado profundizando en los últimos años. Recientemente han introducido una línea de investigación sobre el papel que el ácido fólico juega en el desarrollo del paladar y aparición de fisura palatina. Finalmente, en 2007, abrieron otra rama en la línea investigadora para dar respuestas a posibles alternativas de tratamiento de la fisura palatina frente a la palatoplastia convencional. En un modelo experimental de fisura palatina congénita en perro, han demostrado la posibilidad de hacer un tratamiento mínimamente invasivo mediante la inyección de un hidrogel ligado a BMP2 y cierre posterior de la fisura en la línea media.

La justificación de esta revisión bibliográfica es dar a conocer los avances logrados por el grupo de investigación 920202 desde sus inicios hasta la actualidad, con vistas a futuros avances en el estudio de los mecanismos productores de fisura palatina y su tratamiento.

OBJETIVOS

Analizar los mecanismos por los que se produce la fisura palatina a través de las investigaciones del grupo 920202.

Mostrar los resultados obtenidos y las propuestas terapéuticas alternativas a la palatoplastia convencional desarrolladas por el grupo para tratar la fisura palatina.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la realización de este artículo se han empleado las bases de datos biomédicas PubMed y MedLine. La búsqueda bibliográfica se realizó mediante palabras clave: fisura palatina, terapia, mecanismos, apoptosis, TGF- β 3. Los artículos revisados para elaborar el mismo comprenden los publicados por el grupo 920202 desde el año 2000 hasta la actualidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los primeros artículos del grupo trataban fundamentalmente los mecanismos básicos por los que ocurre la fusión del paladar. Así, en primer lugar, observaron que la desaparición de la CEM ocurre mediante la participación simultánea de muerte celular programada y transformación epitelio-mesenquimatosa -TEM-⁽⁸⁾, aclarando la controversia existente en la literatura, pues había autores que sólo consideraban la muerte celular^(9,10) o sólo la TEM^(11,12). Además, comprobaron que el EBM de los ratones mutantes negativos para Tgf-beta3 (Tgf- β 3-/-) presentan una gran disminución de la muerte celular⁽⁸⁾ con respecto al silvestre (S) y que en la superficie de este epitelio son muy escasas unas células que en éste son muy abundantes⁽¹³⁾: las células protuberantes, observadas con el microscopio electrónico ambiental de barrido. Este microscopio permite la visualización de tejidos con una mínima fijación, por lo que éstos se conservan muy naturalmente. Demostraron que estas células no son muertas y que, sin embargo, están muy involucradas en el proceso de adhesión de EBM opuestos, mecanismo fundamental en la fusión del paladar. Estas células contienen en su citoplasma filamentos de actina dispuestos en posición vertical y gran cantidad de vinculina en su superficie, molécula involucrada en la adhesión a través de integrinas⁽¹³⁾.

Analizaron seguidamente las características del EBM presentado por el ratón Tgf- β 3-/-, comprobando que la ausencia de TGF- β 3 causa una gran indiferenciación de este epitelio, con un patrón muy alterado de E-cadherina, α y β -catenina, vinculina, condroitin sulfato e integrina beta2 con respecto al ratón S⁽¹⁴⁾. En este momento, los autores sugirieron que podía existir un problema de polaridad en las células del EBM del mutante. El estudio no se continuó en esta línea, pero queda abierta para futuras investigaciones. En este trabajo, los autores también demostraron que las células de la CEM recién formada sufren un proceso de intercalación celular, que alarga la costura sin incrementar el número de células, y que este mecanismo es inexistente en el ratón mutante.

Dentro de este análisis de la adhesión de los procesos palatinos identificaron moléculas como el condroitin sulfato⁽¹⁵⁾, fibronectina e integrina alfa5⁽¹⁶⁾ como fundamentales para este proceso y observaron que en el mutante para Tgf- β 3 de dos razas distintas la presencia y disposición de estas moléculas está alterada, tanto más cuanto más severa es la fisura que presentan⁽¹⁶⁾.

Un capítulo importante de la investigación en estos mecanismos incluyó el análisis de las interacciones entre TGF- β 3 y otros factores de crecimiento durante el desarrollo del paladar. Y así demostraron que TGF- β 3 está en equilibrio con TGF-b1^(17,18) y con EGF y Msx-1⁽¹⁹⁾. Un incremento de TGF-b1 en el ratón Tgf- β 3-/- causa la disminución de la muerte celular de su EBM⁽¹⁷⁾, mientras que el exceso de EGF en el EBM motiva un aumento de proliferación de sus células⁽¹⁹⁾.

Recientemente plantearon la importancia del ácido fólico en la dieta de ratones gestantes, para explicar posibles fisuras palatinas, sus mecanismos de producción y alteraciones en la expresión de TGF- β 3. El ácido fólico es esencial para numerosas funciones del cuerpo humano. Se ha asociado su déficit en la dieta con numerosas malformaciones, entre ellas la fisura palatina. La deficiencia de ácido fólico en los ratones durante la gestación durante 8 semanas daba lugar a fisura palatina completa, pero una deficiencia de sólo 2 semanas alteraba todos los mecanismos básicos por los que se fusiona el paladar. Esto se relaciona con el TGF- β 3, puesto que el déficit de ácido fólico disminuía la expresión del mismo. Por lo tanto, se concluyó que una deficiencia de ácido fólico en la dieta durante la gestación podía ser un factor de riesgo en el desarrollo de fisura palatina en ratones, y la administración de TGF- β 3 in vitro compensaba ese déficit ⁽²⁰⁾.

En esta línea se analizó todo lo relacionado con los mecanismos básicos de la fisiopatología de la fisura palatina. Pero este grupo de investigación, de manera paralela, desde 2007 comienza a publicar resultados relacionados con una posible terapia mínimamente invasiva para el tratamiento de la fisura palatina. Se presentó una hipótesis por la cual la inyección de BMP2 en un carrier en los bordes de la fisura palatina produciría hueso en ellos y su acercamiento a la línea media, donde serían fácilmente suturados ⁽²¹⁾. Este estudio se realizó in vitro con procesos palatinos de ratón Tgf- β 3 -/- a término. Pero era imprescindible encontrar un modelo experimental de fisura palatina congénita in vivo.

En la búsqueda de este modelo experimental de fisura palatina en la que poder llevar a cabo estas investigaciones, trataron de generar fisuras mediante la utilización de un teratógeno: el butyl-benzyl-phtalato, que la literatura demostraba producir fisuras sin otras malformaciones congénitas en rata. Sin embargo, los resultados no fueron esos y, de 345 fetos que se trataron con el teratógeno, sólo ocho presentaron fisura palatina. Además, murieron en las siguientes horas al nacimiento, lo que los invalidaba para cualquier estudio terapéutico. El trabajo sólo resultó en una publicación acerca de malformaciones en el pulmón y caja torácica de las ratas tratadas ⁽²²⁾.

Existen antecedentes de estudios en animales a los que se ha tratado quirúrgicamente para producir artificialmente una fisura palatina. Este procedimiento ha sido criticado por razones éticas y también por no reproducir de forma real los procesos que conllevan a la fisura palatina en humanos. Los investigadores descubrieron la existencia de una raza de perros española que presenta una incidencia de 15-20% de fisura labio-palatina: la raza de perros Pachón Navarro. Sin embargo, conseguir su supervivencia era fundamental para poder realizar cualquier tratamiento terapéutico, lo que obligaba a desarrollar un método de alimentación adecuado. Aunque existen antecedentes de colocación de obturadores, los permanentes dificultan su limpieza y pueden conducir a infecciones. Lo más frecuente era la alimentación por sonda orogástrica, pero esto también podía llevar a neumonía por

aspiración de leche y también a infecciones. Además, esto no estimula el desarrollo neuromuscular de la zona orofacial al anular estímulos de succión y masticación.

En el artículo de Martínez-Sanz et al. (2011) "A new technique for feeding dogs with a congenital cleft palate for surgical research" ⁽²³⁾ se presenta una técnica para la alimentación en perros con fisura palatina congénita usando tetinas individualizadas y una prótesis palatina flexible removible. Comparando con un caso control, se valoraba el crecimiento del paladar en estos perros portadores de prótesis. No se observaron diferencias con respecto al caso control. El estudio demostró los grandes beneficios que podemos obtener mediante esta técnica para la correcta alimentación y desarrollo de animales con fisura palatina espontánea.

Recientemente, han caracterizado la fisura palatina del perro Pachón Navarro, mostrando la morfología de su paladar que adquiere una forma en reloj de arena por estrecharse más a nivel de los premolares que en los controles. En cuanto al crecimiento tanto longitudinal como transversal también se observó que era menor en los casos de fisura palatina, encontrándose nuevamente los resultados más significativos en el área de los premolares. Los resultados referentes al desarrollo cráneo-facial muestran una disminución de éste en la región maxilonasal de aquellos perros con fisura palatina, ocasionando en muchos de ellos la característica mordida cruzada, puesto que la mandíbula sigue un crecimiento totalmente normal ⁽²⁴⁾.

Han buscado un buen carrier para la BMP2 generadora de hueso. Se investigaron dos posibles carriers para BMP-2: cemento de brushita y colágeno, analizando si estos carriers eran adecuados para inducir osteogénesis en submucosa palatina de ratas de diez días de edad. Se observó que BMP-2 era capaz de inducir la diferenciación de células osteoblásticas en la submucosa palatina seis semanas después de la inyección. No obstante, no se observó formación o neoformación ósea en el sitio inyectado ⁽²⁵⁾. Esto pudo deberse a que los carriers no proporcionan el espacio suficiente en el que pueda producirse la formación ósea y quizás también sería necesaria más cantidad de BMP-2 inyectada.

El último artículo de esta línea acaba de ser aceptado para su publicación ⁽²⁶⁾. En este caso el modelo experimental ha sido el perro Pachón Navarro con fisura palatina congénita. Se utilizó un hidrogel de ácido hialurónico como carrier de la BMP-2, que también contenía hidroxiapatita, y se inyectó de forma subperióstica en cachorros de 6 semanas en los márgenes de la fisura palatina. Cuando cumplían 10 semanas se retiraba una fina tira mucosa del borde medial de cada lado de fisura y se procedía a la sutura de ambos bordes. Se observó que efectivamente se había producido la formación ósea y después de 4 semanas de la inyección los bordes de la fisura se habían acercado considerablemente, realizándose el cierre de la fisura de una manera mucho más sencilla y menos cruenta que en el caso de la palatoplastia convencional. Como consecuencia de la ausencia de cicatriz lateral que ocurre tras la palatoplastia convencional piensan que puede haber un beneficio potencial para el crecimiento medio-facial.

Finalmente es interesante resaltar que este grupo de investigación continúa investigando y publicando con nuevos horizontes, dirigiéndose hacia el estudio de la EGF, el ácido fólico y las mediciones craneofaciales en los perros, para continuar ahondando en la comprensión y tratamiento de esta malformación, que a tantos niños podría beneficiar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sadler TW. Embriología especial cabeza y cuello. En: Sadler TW, Langman Embriología médica. 7th ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 1996. p. 309-323.
2. Mossey P, Little J, Munger R, Dixon M, Shaw W. Cleft lip and palate. *Lancet* 2009;374:1773–1785.
3. Clarke PGH. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 1990;181:195–213.
4. Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor β s. In "Peptidyl Growth Factors and Their Receptors I" (MB Sporn and AB Roberts, Eds.), pp. 419–472. Springer-Verlag, Berlin 1990.
5. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: Involvement of type I receptors. *J Cell Biol.* 1994;127:2021–2036.
6. Brunet CL, Sharpe PM, Ferguson MWJ. Inhibition of TGF- β 3 (but not TGF- β 1 or TGF- β 2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int J Dev Biol.* 1995;39:345–355.
7. Kaartinen V, Cui XM, Heisterkamp N, Groffen J, and Shuler CF. Transforming growth factor- β 3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev. Dyn.* 1997;209:255–260.
8. Martínez-Álvarez C, Tudela C, Pérez-Miguelsanz J, O’Kane S, Puerta J, Ferguson MWJ. Medial Edge Epithelial Cell Fate during Palatal Fusion. *Developmental Biology* 2000;220:343–357.
9. Mori C, Nakamura N, Okamoto Y, Osawa M, Shiota K. Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labeling of DNA fragmentation. *Anat Embryol.* 1994;190:21–28.

10. Taniguchi K, Sato N, Uchiyama Y. Apoptosis and heterophagy of medial edge epithelial cells of the secondary palatine shelves during fusion. *Arch Histol Cytol.* 1995;58:191–203.
11. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* 1995;154: 8–20.
12. Shuler CF, Halpern DE, Guo Y, Sank C. Medial edge epithelium fate by cell lineage analysis during epithelial–mesenchymal transformation in vivo. *Dev Biol.* 1992;154:318–330.
13. Martínez-Álvarez C, Bonell R, Tudela C, Gato A, Mena J, O’Kane S et. al. Bulging medial edge epithelial cells and palatal fusion. *Int. J. Dev. Biol.* 2000;44:331-335.
14. Tudela C, Formoso MA, Martínez T, Pérez R, Aparicio M, Maestro C et al. TGF- β 3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. *Int. J. Dev. Biol.* 2002;46:333-336.
15. Gato A, Martínez ML, Tudela C, Alonso I, Moro JA, Formoso MA et al. TGF-3-Induced Chondroitin Sulphate Proteoglycan Mediates Palatal Shelf Adhesion. *Developmental Biology* 2002;250:393–405.
16. Martínez-Sanz E, del Río A, Barrio C, Murillo J, Maldonado E, Garcillán B et al. Alteration of medial-edge epithelium cell adhesion in two Tgf-b3 null mouse strains. *Differentiation* 2008;76:417–430.
17. Martínez-Álvarez C, Blanco MJ, Pérez R, Rabadán MA, Aparicio M, Resel E et al. Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Developmental Biology* 2004;265:207– 218.
18. (18)Murillo J, Maldonado E, Barrio MC, del Río A, López-Gordillo Y, Martínez-Sanz E et al. Interactions between TGF-b1 and TGF-b3 and their role in medial edge epithelium cell death and palatal fusion in vitro. *Differentiation* 2009;77:209–220.
19. del Río A, Barrio MC, Murillo J, Maldonado E, López-Gordillo Y, Martínez-Sanz E et al. Analysis of the Presence of Cell Proliferation-Related Molecules in the Tgf-3 Null Mutant Mouse Palate Reveals Misexpression of EGF and Msx-1. *Cells Tissues Organs* 2011;193(3):135-50.
20. Maldonado E, Murillo J, Barrio C, del Río A, Pérez-MiguelSanz J, López-Gordillo Y et al. Occurrence of Cleft-Palate and Alteration of Tgf- 3 Expression and the Mechanisms Leading to Palatal Fusion in Mice following Dietary Folic-Acid Deficiency. *Cells Tissues Organs.* 2011;194(5):406-20.

21. Resel E, Martínez-Sanz E, González I, Trinidad E, Garcillán B, Amorós M et al. In vitro manipulation of cleft palate connective tissue: setting the bases of a proposed new treatment. *J Surg Res.* 2007;138:111–120.
22. Martín C, Casado I, Pérez-Miguelsanz J, López-Gordillo Y, Maldonado E, Maestro C et al. Effect of Butyl Benzyl Phthalate on Early Postnatal Mortality in Rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2008;18:759–762.
23. Martínez-Sanz E, Casado-Gómez I, Martínez-Álvarez C, López-Gordillo Y, González P, Rodríguez-Bobada C et al. A new technique for feeding dogs with a congenital cleft palate for surgical research. *Laboratory Animals* 2011;45:70–80.
24. Paradas-Lara I, Casado-Gómez I, Martín C, Martínez-Sanz E, López-Gordillo Y, González P et al. Maxillary growth in a congenital cleft palate canine model for surgical research. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013;5182(13):48-6.
25. Martínez-Sanz E, Alkhraisat MH, Paradas I, López-Gordillo Y, Maldonado E, González-Meli B et al. Osteoinduction in the Palatal Submucosa by Injecting BMP-2 on 2 Different Carriers. *J Craniofac Surg.* 2012;23(2):594-8.
26. Martínez-Álvarez C, González-Meli B, Berenguer B, Paradas-Lara I, López-Gordillo Y, Rodríguez-Bobada C et al. Injection and Adhesion Palatoplasty: a preliminary study in a canine model. *J Surg Res.* 2013 (Aceptado para publicación).

Recibido: 7 noviembre 2013.
Aceptado: 24 febrero 2014.