

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía y Embriología Humana I



TESIS DOCTORAL

Papel del ácido fólico dietético en el desarrollo del paladar de ratón

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Estela Maldonado Bautista

Directores

M^a Concepción Martínez Álvarez

M^a Juliana Pérez de Miguelsanz

Jorge Alfonso Murillo González

Madrid, 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



**PAPEL DEL ÁCIDO FÓLICO
DIETÉTICO EN EL DESARROLLO
DEL PALADAR DE RATÓN**

Tesis presentada por

Estela Maldonado Bautista

2012

PAPEL DEL ÁCIDO FÓLICO DIETÉTICO EN EL DESARROLLO DEL PALADAR DE RATÓN

Trabajo de investigación realizado para optar al grado de Doctor por:

Estela Maldonado Bautista

Bajo la dirección de:

M^a Concepción Martínez Álvarez

M^a Juliana Pérez de Miguelsanz

Jorge Alfonso Murillo González

Esta Tesis ha sido llevada a cabo principalmente en el **Departamento de Anatomía y Embriología Humana I de la Facultad de Medicina de la U.C.M.** La financiación recibida para poder realizarla ha provenido del **Fondo de Investigación Sanitaria**, que financió los proyectos PI06/0184 y PS09/01762, y de la **Universidad Complutense de Madrid y del Banco Santander**, que han financiado al Grupo Complutense de Investigación 920202 los años 2006-2011.

Madrid, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

M^a CONCEPCIÓN MARTÍNEZ ÁLVAREZ, M^o JULIANA PÉREZ DE MIGUELSANZ y JORGE ALFONSO MURILLO GONZÁLEZ, Profesores Titulares del Departamento de Anatomía y Embriología Humana I de la Universidad Complutense de Madrid,

INFORMAN:

que D^a ESTELA MALDONADO BAUTISTA, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: “Papel del ácido fólico dietético en el desarrollo del paladar de ratón”. Este estudio, que presenta como Tesis Doctoral, ha sido realizado en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana I de la Facultad de Medicina y en la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid y reúne los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, firmamos el presente documento en Madrid, a 10 de Abril de 2012:

Fdo.: Concepción Martínez
Álvarez

Fdo.: M^a Juliana Pérez
de Miguelsanz

Fdo.: Jorge Alfonso Murillo
González

Para todos aquellos que me han animado, aguantado y ayudado.

AGRADECIMIENTOS

Mil gracias a mi maravillosa familia, que siempre ha respetado mi trabajo y me ha apoyado en todo lo posible.

Agradezco enormemente el trabajo realizado por los directores de esta tesis, los profesores Concepción Martínez Álvarez, Julia Pérez de Miguelsanz y Jorge Murillo González, pues sin su esfuerzo, conocimientos y experiencia no habría podido llevarla a cabo.

También he de agradecer el apoyo, la ayuda y la amistad recibida de los demás miembros del grupo de investigación al que pertenezco. Gracias a Aurora del Río, Carmen Barrio, Carmen Maestro, Elena Martínez, Irene Paradas y, muy especialmente, a Yamila López.

No olvido las veces que las técnicas del Departamento de Anatomía y Embriología Humana I de la Facultad de Medicina de la UCM, Dolores Arroyo y Alicia Cerro, me han ofrecido su inestimable experiencia; ni la ayuda recibida en la Facultad de Odontología de la UCM por los miembros de los laboratorios de Microbiología y Bioquímica.

Gracias también a Teresa Partearroyo y Gregorio Varela, del Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU-San Pablo, por el tiempo y los medios que me concedieron para realizar una parte importante de este trabajo.

Por último, agradezco la paciencia y comprensión de todos mis amigos, pues muchas de las horas que no he podido pasar con ellos se deben a que las invertí en este trabajo.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

ÍNDICES

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Desarrollo del paladar de los mamíferos	5
1.2. Papel de TGF- β en el desarrollo del paladar	9
1.3. La fisura palatina	15
1.4. La fisura palatina en los ratones mutantes negativos para el gen <i>Tgf-β_3</i>	19
1.5. El ácido fólico y su metabolismo	22
1.6. Importancia del ácido fólico en la gestación	30
1.7. El ácido fólico y las fisuras labiopalatinas	33
2. JUSTIFICACIÓN	37
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVOS	42
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1. Animales utilizados	44
5.2. Determinación de los niveles de folato en el hígado de hembras de ratón gestantes ...	46
5.3. Determinación del genotipo de los animales empleados	48
5.3.1. Digestión del tejido	48
5.3.2. Aislamiento del ADN	49
5.3.3. PCR	49
5.4. Análisis de fetos de 17 días de gestación	52
5.5. Análisis de la proliferación celular en paladares embrionarios	54
5.6. Hibridación <i>in situ</i> para la detección de la expresión de <i>Tgf-β_3</i> en el paladar	58
5.6.1. Elaboración de la sonda de hibridación	58
5.6.2. Preparación del tejido antes de la hibridación <i>in situ</i>	61
5.6.3. Hibridación de la sonda con el ARNm tisular	62
5.6.4. Revelado de la sonda hibridada	63
5.7. Cultivos organotípicos de procesos palatinos	65

5.7.1. Realización de los cultivos	65
5.7.2. Experimentos para los que se realizaron cultivos	68
5.7.3. Procesamiento de los cultivos	69
5.8. Análisis estadístico	73

6. RESULTADOS

6.1. Niveles de folato hepático en hembras gestantes	75
6.2. Efectos de la ausencia de ácido fólico en el desarrollo embrionario	77
6.2.1. Malformaciones registradas en fetos descendientes de hembras sometidas a dieta carente de ácido fólico	77
6.2.2. Malformaciones del paladar de fetos descendientes de hembras sometidas a dieta carente de ácido fólico	83
6.2.3. Alteración de los mecanismos básicos de la palatogénesis por la carencia de ácido fólico	88
6.2.3.1. Alteración de la proliferación celular en el paladar de embriones descendientes de hembras sometidas durante 2 semanas a dieta carente de ácido fólico	88
6.2.3.2. Alteración de la adhesión y fusión de los procesos palatinos de embriones descendientes de hembras sometidas 2 semanas a dieta carente de ácido fólico	91
6.2.3.3. Alteración de la muerte celular en la costura epitelial medial de embriones descendientes de hembras sometidas 2 semanas a dieta carente de ácido fólico	93
6.2.4. Expresión de TGF- β_3 en el paladar de embriones descendientes de hembras sometidas durante 2 y 8 semanas a dieta carente de ácido fólico	95
6.2.5. Papel de TGF- β_3 en el rescate de los mecanismos implicados en la palatogénesis alterados por el déficit de ácido fólico	97
6.3. Efecto del suplemento de ácido fólico en el desarrollo del paladar de ratones homocigotos negativos para el gen <i>Tgf-β_3</i>	101
6.3.1. Fisuras presentadas por los fetos mutantes negativos para <i>Tgf-β_3</i>	101
6.3.2. Análisis del estado de la proliferación de las células palatinas de los fetos mutantes negativos descendientes de hembras sometidas a dieta con suplemento de ácido fólico	104
6.3.3. Análisis de la adhesión y fusión de los procesos palatinos cultivados en presencia o ausencia de un suplemento de ácido fólico	107

7. DISCUSIÓN

7.1. Efectos de la dieta carente de ácido fólico en fetos de ratón C57	111
7.1.1. Efectos en la génesis de malformaciones congénitas	113
7.1.2. Efectos sobre el desarrollo morfológico del paladar	115
7.1.3. Efecto sobre los mecanismos implicados en la palatogénesis	118
7.1.4. Efecto sobre la expresión de <i>Tgf-β₃</i> en el paladar embrionario	123
7.1.5. Papel de TGF-β ₃ exógeno en la reversión de los efectos adversos del déficit de ácido fólico en el desarrollo del paladar	126
7.2. Efectos de la dieta con suplemento de ácido fólico sobre el paladar de los mutantes homocigotos negativos para <i>Tgf-β₃</i>	127
7.2.1. Análisis de las fisuras palatinas de fetos homocigotos negativos para <i>Tgf-β₃</i> sometidos a un suplemento de ácido fólico en la dieta materna	128
7.2.2. Efecto del suplemento dietético de ácido fólico sobre la proliferación celular del paladar de embriones <i>Tgf-β₃ -/-</i>	129
7.2.3. Efecto del suplemento de ácido fólico sobre la adhesión y fusión de los procesos palatinos de embriones <i>Tgf-β₃ -/-</i>	131

8. CONCLUSIONES

135

REFERENCIAS

138

PUBLICACIÓN

170

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 (TGF- β s)	11
Tabla 2 (Tipos de fisuras)	16
Tabla 3 (Grupos experimentales)	45
Tabla 4 (Experimentos)	46
Tabla 5 (Genotipos)	52
Tabla 6 (Cultivos realizados)	68
Tabla 7 (Medida de folato hepático)	75
Tabla 8 (Incidencia y tipos de malformaciones)	78
Tabla 9 (Número de malformados)	78
Tabla 10 (Porcentaje malformados)	81
Tabla 11 (Malformaciones palatinas)	85
Tabla 12 (Proliferación celular, dieta carente de ácido fólico)	89
Tabla 13 (Adhesión y fusión, dieta carente de ácido fólico)	92
Tabla 14 (Muerte celular, dieta carente de ácido fólico)	93
Tabla 15 (Proliferación celular cultivos, dieta carente de ácido fólico)	98
Tabla 16 (Embriones mutantes negativos)	101
Tabla 17 (Proliferación celular, dieta con suplemento de ácido fólico)	105
Tabla 18 (Adhesión y fusión, suplemento de ácido fólico)	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 (Tipos de fisuras)	17
Figura 2 (Recorrido del folato)	25
Figura 3 (Potocitosis)	26
Figura 4 (Ciclo de los folatos)	29
Figura 5 (Cebadores)	51
Figura 6 (Genotipos)	51
Figura 7 (Proliferación celular)	56
Figura 8 (Paladar embrionario)	58
Figura 9 (Sondas I)	60
Figura 10 (Sondas II)	60
Figura 11 (Digoxigenina)	64
Figura 12 (Paladar hibridado)	64
Figura 13 (Cultivos)	67
Figura 14 (Adhesión y fusión)	70
Figura 15 (Muerte celular)	71
Figura 16 (Niveles de folato hepático)	76
Figura 17 (Malformaciones I)	80
Figura 18 (Malformaciones II)	82
Figura 19 (Malformaciones del paladar I)	84
Figura 20 (Malformaciones del paladar II)	86
Figura 21 (Osificación del paladar)	87
Figura 22 (Proliferación celular, dieta carente de ácido fólico)	90
Figura 23 (Adhesión y fusión, dieta carente de ácido fólico)	92
Figura 24 (Muerte celular, dieta carente de ácido fólico)	94
Figura 25 (HIS Tgf- β_3 , dieta carente de ácido fólico)	96
Figura 26 (Proliferación celular en cultivos, dieta carente de ácido fólico)	99
Figura 27 (Fisuras Tgf- β_3 $-/-$, dieta con suplemento de ácido fólico)	103
Figura 28 (Proliferación celular, dieta con suplemento de ácido fólico)	106
Figura 29 (Adhesión y fusión, suplemento de ácido fólico)	108

ABREVIATURAS

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico clonado

AF: Ácido Fólico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3- Indolyl- Phosphate

BMP: Bone Morphogenetic Protein (proteína de morfogénesis ósea)

BrdU: 5-Bromo-2'-deoxy-Uridina

BSA: Bovine Serum Albumin (albúmina de suero bovino)

C: Citosina

CAF: Carente de Ácido Fólico

CCN: Células de Cresta Neural

CEM: Costura Epitelial Medial

CHAPS: 3-[(3-Cholaminodopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CpG: Citosina unida por enlace fosfato a Guanina

DAB: Diaminobencidina

DEPC: Diethyl pyrocarbonate

DG: Día de Gestación

DHF: Dihidrofolato

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

dNTP: deoxyNucleotide Triphosphate (deoxynucleótidos trifosfato)

DTN: Defectos del Tubo Neural

EBM: Epitelio del Borde Medial

ECEMC: Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic

EGF: Epithelial Growth Factor (factor de crecimiento epitelial)

FBP: Folate Binding Protein (proteína de unión a folato)

FBS: Foetal Bovine Serum (suero bovino fetal)

FGF: **Fibroblast Growth Factor** (factor de crecimiento fibroblástico)

FLP: Fisuras Labiopalatinas

FP: Fisura Palatina

FR: Folate Receptor (receptor de folato)

G: Guanina

GDF: Growth Differentiation Factor (factor diferenciador del crecimiento)

Hcy: Homocisteína

HIS: Hibridación *in situ*

IGF-BP3: Insuline-like Growth Factor Binding Protein 3 (factor de crecimiento insulínico - proteína de unión 3)

KTBT: KCINaCl Trizma Buffered Triton (tampón con cloruro potásico y sódico, trizma y tritón)

MEC: Matriz extracelular

Met: Metionina

MMP: Metaloproteinasas

MTHF: Metiltetrahidrofolato

NBT: 4-Nitro Blue Tetrazolium chloride

pb: Pares de bases

PBS: Phosphate Buffered Saline (tampón fosfato salino)

PBT: Phosphate Buffered Saline Triton (tampón fosfato salino con tritón)

PCR: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor (factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PFA: Paraformaldehído

RFC: Reduced Folate Carrier (transportador de folato reducido)

rpm: Revoluciones por minuto

SAF: Suplemento de Ácido Fólico

SAH: S-adenosilhomocisteína

SAM: S-adenosilmetionina

SDS: Sodio Dodecilo Sulfato

SSC: Standar Saline Citrato (citrato salino estándar)

TAE: Tris-Acetato

TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transferase (deoxinucleotidil terminal transferasa)

TEM: Transformación Epitelio-Mesenquimatosa

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta (factor de crecimiento transformante beta)

THF: Tetrahidrofolato

tRNA: Ribonucleic Acid from torula yeast (ARN de levadura *Torula*)

TUNEL: Tdt-mediated dUTP Nick End Labelling

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (factor de crecimiento del endotelio vascular)

UTP: Uracil Triphosphate (uracilo trifosfato)

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Desarrollo del paladar de los mamíferos.

El desarrollo del paladar consiste en la división en dos cavidades, la nasal y la oral, a partir de la primitiva cavidad bucal. Este desarrollo comienza al final de la quinta semana de gestación en el hombre y en el día 11 de gestación (11 DG) en el ratón (revisado en Abramovich, 1997).

En este momento se observan dos esbozos del paladar, uno anterior y otro posterior. El anterior forma parte del segmento intermaxilar y cuando se fusionen las dos prominencias nasales mediales darán lugar al paladar primario. El esbozo posterior es mayor y está constituido por los dos procesos palatinos, estructuras alargadas en sentido antero-posterior que proceden de la cara medial de cada proceso maxilar, derivadas del primer arco branquial y que constituyen el paladar secundario, de donde se originan la mayor parte del paladar duro y el paladar blando.

Para que el paladar primario y el secundario se desarrollen correctamente es imprescindible que previamente células de la cresta neural (CCN) emigren a los márgenes de la cavidad oral primitiva, poblándolos, constituyendo así el mesénquima de esta región (Kerrigan y cols., 2000). De las CCN derivan las células mesenquimáticas y gran parte del esqueleto craneofacial (revisado en Hall, 2008), por lo que parte del paladar y casi toda la estructura ósea de la cabeza tiene este origen común. En aves, la emigración de las CCN hacia su destino no comienza hasta que el tubo neural se ha cerrado, pero en los mamíferos la emigración ocurre antes de dicho cierre, es decir, en un período muy temprano del desarrollo embrionario (revisado en Trainor, 2005).

Los procesos palatinos crecen inicialmente en sentido ventral como prolongaciones de la cara interna de los procesos maxilares hasta llegar a formar dos láminas situadas en posición vertical a ambos lados de la lengua; esto ocurre en el día 45 de gestación en el hombre y en el día 13 en el ratón (revisado en Ferguson, 1988). En este momento del desarrollo, en cada proceso se pueden observar tres regiones (Schüpbach y cols., 1983): 1) una anterior, orientada verticalmente, 2) una porción media, orientada también

verticalmente en principio, que luego va a sufrir remodelación y 3) otra región posterior, muy pequeña, orientada horizontalmente desde el principio de su desarrollo.

Los procesos palatinos adoptan más tarde una posición horizontal en toda su longitud (56-57 DG en el hombre, 14-14,5 DG en el ratón), pero sus distintas porciones se comportan de manera diferente para alcanzarla. Estudios morfológicos detallados del paladar embrionario de los roedores confirman que, en este momento, solamente la porción anterior de los procesos se eleva hacia una posición horizontal, quedando el dorso de la lengua en contacto con ella (Schüpbach y cols., 1983). Sin embargo, en la zona inmediatamente posterior (porción media del paladar), la lengua está aún entre los procesos palatinos verticales. A medida que transcurre el desarrollo en el embrión se observa la remodelación del paladar medio, que tiene lugar mediante la formación de un pliegue que sobresale en la cara medial de cada proceso. Al mismo tiempo, la parte anterior de los procesos palatinos crece hacia la línea media hasta el punto en que ambos contactan en la región de máxima convexidad, aproximadamente a nivel de la segunda ruga (Ferguson, 1978; Schüpbach y cols., 1983).

Conforme los procesos palatinos se elevan, van aproximándose el uno al otro, de forma que a los 14,5 DG en el ratón, el epitelio del borde medial (EBM) de cada proceso palatino, que es el epitelio que recubre sus extremos, contacta en la línea media con el otro. Ambos epitelios se adhieren y se inicia la fusión del paladar con la formación de una “costura” epitelial: la costura epitelial medial -CEM- (Ferguson, 1988). El contacto entre los procesos palatinos se realiza inicialmente a nivel de la unión entre los dos tercios posteriores y el tercio anterior de los procesos, progresando la fusión anterior y posteriormente desde ese punto (Schüpbach y cols., 1983). Inmediatamente antes del contacto entre los procesos palatinos, el EBM sufre una serie de cambios que pretenden favorecer su adhesión con el opuesto: aumenta su número de capas (Brinkley, 1984; Tudela y cols., 2002), y sus células más apicales sobresalen de la superficie, desarrollando igualmente filopodia, en un intento de aumentar el área de contacto entre epitelios opuestos (Taya y cols., 1999; Martínez-Álvarez y cols., 2000a, b).

Durante el proceso de adhesión es esencial el papel de la matriz extracelular (MEC), la cual está compuesta por proteínas y polisacáridos que se segregan localmente formando un entramado de macromoléculas en el espacio extracelular con funciones de sostén,

relleno, defensa y nutrición (Junqueira y Carneiro, 1973). Su composición química y estructura varía de forma específica según el tejido y, dentro de un mismo tejido, puede variar dependiendo de los diferentes períodos del desarrollo tisular. Básicamente la MEC se compone de tres tipos de moléculas:

-Colágenos; de los que se han descrito 27 tipos diferentes. Inducen la adhesión celular, activan la señalización intercelular y regulan la actividad de diferentes factores de crecimiento (Vogel, 2001).

-Glicoproteínas; se diferencian en dos grupos. Uno es el de las matricelulares, como la tenascina, y el otro el de las adhesivas, al que corresponden fibronectina y laminina. Estas últimas forman conexiones a través de las integrinas (Raines, 2000).

-Proteoglicanos; hay diferentes tipos y, fundamentalmente, participan en el reconocimiento y adhesión célula-célula y célula-MEC (Letourneau, 1996).

Además de los componentes de la MEC, en la adhesión celular son muy importantes las moléculas de adhesión situadas en las membranas celulares, como las integrinas y las cadherinas. También es esencial que la composición de la MEC varíe a través del proceso conocido como remodelación, que consiste en el cambio de su composición debido a ciertas metaloproteinasas (MMP) y sus inhibidores (Gato y cols., en preparación). La actividad de las MMP es fundamental para la síntesis y degradación de diferentes moléculas de adhesión celular, como las que se encuentran en el EBM de ratón en la pre-adhesión: fibronectina, integrina- α 5, colágeno IV y IX (Martínez-Sanz y cols., 2008), versican y decorina (Gato y cols., en preparación) y el proteoglicano condroitín sulfato (Gato y cols., 2002). La adhesión de los procesos palatinos es crucial en el desarrollo del paladar, y algunas fisuras palatinas se deben a su fracaso (Proetzel y cols., 1995; Martínez-Sanz y cols., 2008).

Otro mecanismo esencial en la correcta palatogénesis es la proliferación de las células que constituyen los procesos palatinos, ya que el número de células mesenquimáticas está determinado por un balance entre proliferación y muerte celular y de este número dependerá el tamaño de los procesos palatinos (Hanumegowda y cols., 2002). De hecho, diversos estudios muestran que un descenso en la proliferación celular palatina desencadena fisura palatina –FP- (Yoshikawa y cols., 1987; Shah, 1990; He y cols., 2008; Takechi y cols., 2008; Del Río y cols., 2011). La proliferación celular es muy elevada tanto en mesénquima como en epitelio en el desarrollo embrionario temprano,

pero gradualmente va descendiendo, lo cual tiene lugar antes en el mesénquima que en el epitelio (Citterio y Gaillard, 1994).

Una vez la CEM se ha establecido por la adhesión de los epitelios del borde medial opuestos, sus células se intercalan (Tudela y cols., 2002) y la costura se elonga en sentido dorso-ventral. Para que la fusión entre los procesos palatinos tenga lugar, la CEM debe desaparecer. Los mecanismos causantes de tal desaparición se inician incluso antes del contacto entre los procesos palatinos con la aparición de células apoptóticas aisladas en todas las capas celulares del EBM (Taniguchi y cols., 1995; Martínez-Álvarez y cols., 2000a), que se incrementan una vez el contacto entre los procesos se establece. La muerte celular programada es uno de los tres mecanismos que causan la desaparición de células de la CEM (Mori y cols., 1994; Taniguchi y cols., 1995; Martínez-Álvarez y cols., 2000a; Cuervo y cols., 2002; Cuervo y Covarrubias, 2004; Takigawa y Shiota, 2004; Vaziri Sani y cols., 2005), y su alteración hace fracasar la fusión del paladar (Abbott y Birnbaum, 1989; Saito y cols., 2005; Cuervo y cols., 2002). Pero la muerte celular programada no es el único mecanismo, algunas células de la CEM desaparecen de ella emigrando dorsalmente a lo largo de la línea media para formar parte del epitelio nasal (Carette y Ferguson, 1992; Cuervo y Covarrubias, 2004; Jin y Ding, 2006) y posteriormente, lo que parece favorecer la adhesión final de las zonas posteriores del paladar (Jin y Ding, 2006).

Aunque a veces cuestionado (Carette y Ferguson, 1992; Xu y cols., 2003; Vaziri Sani y cols., 2005; Dudas y cols., 2007) hay suficiente evidencia científica que demuestra que algunas células de la CEM sufren transformación epitelio-mesenquimatosa –TEM– (Fitchett y Hay, 1989; Griffith y Hay, 1992; Shuler y cols., 1992; Sun y cols., 1998; Martínez-Álvarez y cols., 2000a; Jin y Ding, 2006, Nawshad y cols., 2004), constituyendo el tercer mecanismo por el que la CEM desaparece.

La fusión total de los esbozos del paladar secundario se puede observar entre la novena y duodécima semanas del desarrollo de humanos (revisado en Abramovich, 1997). En el ratón, en el día 15 DG la CEM ha desaparecido y en la línea media se observa confluencia total del mesénquima de ambos procesos, finalizando con ello la fusión del paladar. En este momento, hay fusión tanto de la región posterior de los procesos entre sí como de la porción anterior con el paladar primario y la parte más ventral del tabique

nasal (Ferguson, 1988). En el hombre queda, únicamente, una zona libre de fusión en la línea media: el denominado canal nasopalatino, palatino anterior o incisivo, que permite el paso de los vasos y nervio del mismo nombre. Este canal señala el límite entre el paladar primario y secundario. En cambio, en roedores como la rata y el ratón, se forman dos conductos que establecen una verdadera comunicación buconasal (Carlson, 1990). Otra diferencia en el desarrollo palatino entre los roedores y el hombre es que en éste pueden quedar restos de costura epitelial en la línea media, lo que recibe el nombre de perlas epiteliales de Epstein.

1.2. Papel de TGF- β en el desarrollo del paladar.

Los factores de crecimiento transformantes beta -TGF- β - (Transforming Growth Factor Beta) son los más estudiados en relación con la palatogénesis (revisado en Meng y cols., 2009). Están constituidos por una superfamilia de citoquinas que comprende unas 100 proteínas diferentes entre las que se encuentran: TGF- β s, activinas, inhibinas, nodal, miostatina, proteínas de morfogénesis ósea -BMPs- (Bone Morphogenetic Proteins) y factores de diferenciación -GDFs- (Growth Differentiation Factors) (revisado en Gomes y cols., 2005). En mamíferos, la superfamilia de los TGF- β se puede dividir en 3 familias principales: TGF- β s, activinas/inhibinas/nodal y BMPs (revisado en Lin y cols., 2006).

Dado que el correcto desarrollo de la palatogénesis precisa la actuación de varios factores de crecimiento pero son especialmente importantes la familia de los TGF- β (revisado en Massagué, 2000), es en ellos en los que centramos nuestro estudio.

Se han descrito cuatro TGF- β diferentes en aves, cinco en anfibios y tres en mamíferos. Son proteínas altamente conservadas en la escala evolutiva. Por ejemplo, las secuencias de TGF- β_3 de hombre y de ratón sólo difieren en un aminoácido, hecho que permite suponer que ejercen efectos similares en ambas especies (revisado en Maldonado y Jaramillo, 1996), y sólo hay uno o dos aminoácidos de diferencia al compararlas con las secuencias del TGF- β_3 de aves y cerdos (revisado en Cox, 1995).

Los TGF- β de los mamíferos son proteínas homodiméricas de 25kDa de tamaño con diferencias sutiles entre sí: las isoformas TGF- β_1 y TGF- β_2 son iguales en un 75%, TGF- β_1 y TGF- β_3 lo son en un 80% y TGF- β_2 y TGF- β_3 presentan un 80% de similitud. Aunque son isoformas homólogas, los aminoácidos que las conforman están codificados en tres genes diferentes (*Tgf- β_1* , *Tgf- β_2* y *Tgf- β_3*), lo que sugiere que realizan diferentes funciones (revisado en Tandon y cols., 2010).

En diferentes tejidos embrionarios de ratón se ha descrito la expresión de los tres TGF- β en forma de proteína y de ARN mensajero (ARNm) en una misma localización temporal y espacial. De ello se deduce que sufren una regulación autocrina. En otras ocasiones, los ARNm son expresados a la vez en un mismo órgano pero las proteínas aparecen en localizaciones adyacentes, lo cual indica que también existe una actuación paracrina (Pelton y cols., 1991). Los tejidos embrionarios en los que se ha localizado la expresión de las tres isoformas son muy diversos. Entre otros, aparecen en células mesenquimáticas, epiteliales, endoteliales, óseas, del sistema inmune y fibroblastos (tabla 1) (Heine y cols., 1987, 1990; Lehnert y Akhurst, 1988; Wilcox y Derynck, 1988; Flanders y cols., 1989; Thompson y cols., 1989; Pelton y cols., 1990a; Gehris y cols., 1991; Millan y cols., 1991; Schmid y cols., 1991; Silbertstein y cols., 1992).

Además del tipo celular donde aparecen, es muy importante la etapa de desarrollo embrionario en la que se expresen y las señales circundantes que reciben para que ejerzan una función u otra. De hecho, aunque el término “TGF” se usó originalmente para describir una clase de polipéptidos que estimulaban el crecimiento de fibroblastos *in vitro*, con el tiempo se ha detectado que presentan múltiples funciones (revisado en Sporn y Roberts, 1990).

Estos factores de crecimiento están implicados en la regulación del ciclo celular, en los procesos de migración y diferenciación celular, en la hematopoyesis, formación ósea, fibrosis y respuesta inmune e inflamación (revisado en Tandon y cols., 2010). También intervienen en el proceso de cicatrización (Pearson y cols., 1988), en la angiogénesis (Roberts y cols., 1986), en la formación de fibroblastos y en el proceso de implantación del embrión en el útero (revisado en Maldonado y Jaramillo, 1996). Además, están implicados en el mecanismo de TEM (revisado en Wu y Hill, 2009) y en la regulación de la síntesis y deposición de componentes de la MEC (revisado en Maldonado y

Jaramillo, 1996), como varios tipos de colágenos, fibronectina, tenascina, osteonectina, osteopontina, trombospondina y glicosaminoglicanos. También inducen la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de MEC, favoreciendo los procesos de adhesión celular (revisado en Massagué, 2000).

Tabla 1. Tejidos y tipos celulares donde ha sido localizada la expresión de TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 y autores que han registrado dicha expresión.

Isoforma	Tejido o tipo celular donde se expresan	Autores que lo han registrado
TGF- β_1	Endotelio, células T, timo, megacariocitos en la médula ósea, células de los bronquios de origen mesodérmico, osteocitos, fibroblastos.	Wilcox y Derynck, 1988; Lehnert y Akhurst, 1988; Millan y cols., 1991; Schmid y cols., 1991.
	Pericondrio del cartílago, osteocitos de hueso, epitelio del intestino y del estómago. Mesénquima y epitelio palatino.	
TGF- β_2	Epitelio de la glándula salivar, cristalino y retina, epitelio escamoso bronquial y queratinocitos suprabasales. En médula espinal y en la parte anterior del cerebro, así como en membranas basales de múltiples tejidos, como las del intestino y el riñón, de la dermis de la piel y de las meninges y en la glia del sistema nervioso central.	Flanders y cols., 1989; Heine y cols., 1987, 1990; Pelton y cols., 1990a; Thompson y cols., 1989; Gehris y cols., 1991; Silbertstein y cols., 1992.
TGF- β_3	En epitelios (palatino embrionario o el cuboidal de los bronquios), en la cápsula del hígado o en los derivados mesenquimatosos de tráquea y esófago, en músculo liso, cardíaco y esquelético, en la epidermis y osteocitos del hueso.	

Los TGF- β también son muy importantes en la emigración y diferenciación de las CCN. Dicha emigración es un mecanismo poco conocido en este tipo de células y existen diversas teorías (Noden y Trainor, 2005) para explicar lo que ocurre. Sí es ampliamente sabido el hecho de que su destino no está predeterminado sino que será el resultado de las señales que reciban durante la emigración lo que lo establezca finalmente (Dorsky y cols., 2000; Hagedorn y cols., 2000; Chai y Maxson, 2006; Crane y Trainor, 2006; Taneyhill y Bronner-Fraser, 2006). Esas señales provienen tanto de los tejidos circundantes como de ellas mismas (Hagedorn y cols., 1999; Dorsky y cols., 2000; Chai y Maxson, 2006), siendo muy importante la sincronización de tales señales. Es decir, han de ser las adecuadas en tiempo, concentración y disposición espacial (Hagedorn y cols., 2000; Carstens, 2004; Chai y Maxson, 2006). Se han observado tres familias implicadas en dicha señalización: los genes Wnt, los factores de crecimiento fibroblástico -FGF- (**Fibroblast Growth Factor**) y los TGF- β (Dorsky y cols., 2000; Chai y cols., 2003; Crane y Trainor, 2006; Taneyhill y Bronner-Fraser, 2006). Estos factores actuarán combinadamente para producir los efectos biológicos específicos requeridos en cada caso (Ishii y cols., 2003).

En el paladar embrionario de ratón, las tres isoformas de TGF- β se expresan en el mesénquima y en el EBM entre los días 12 y 16 de gestación, período que engloba la palatogénesis. Una vez finalizado este proceso, la expresión se reduce mucho y termina desapareciendo (Pelton y cols., 1990a). Los TGF- β intervienen en todos los mecanismos necesarios para el desarrollo del paladar: migración celular, TEM, proliferación, supervivencia celular y síntesis y deposición de MEC (Pelton y cols., 1990b; Ferguson, 1987, 1988). Aunque los tres TGF- β tienen una estructura y forma de actuar similar y coordinada presentan funciones y lugares de expresión diferentes.

Los ratones mutantes incapaces de expresar TGF- β_1 mueren a los tres días de vida aproximadamente a causa de enfermedades autoinmunes que resultan en una inflamación letal (Kulkarni y cols., 1993). Los estudios realizados con estos mutantes han llevado a la conclusión de que TGF- β_1 actúa principalmente en la preimplantación embrionaria, antes del estado de mórula, y en la hematopoyesis del saco vitelino. También es importante en el desarrollo del folículo capilar y óseo, en el mantenimiento de las superficies oclusales en dientes y en la producción de células de Langerhans en la piel. Estos ratones mutantes no presentan fisuras orofaciales de ningún tipo y

morfológicamente son como los individuos silvestres (revisado en Dünker y Krieglstein, 2000).

Aunque dichos mutantes no muestren alteraciones morfológicas en el paladar se detecta la expresión de TGF- β_1 en forma de ARNm en EBM y mesénquima (Fitzpatrick y cols., 1990; Martínez-Álvarez y cols., 2004) y se inmunolocaliza el péptido en el mesénquima (Gehris y cols., 1991). Este TGF β induce la síntesis de colágenos y de fibronectina, tenascina, y proteoglicanos condroitin/dermatan, todos ellos componentes de la MEC. La expresión de estas moléculas y la de TGF- β_1 coincide en el mesénquima adyacente al EBM justo antes y durante la adhesión de los epitelios del borde medial, lo que refleja el papel de este factor en el mecanismo de adhesión de los procesos palatinos (Fitzpatrick y cols., 1990). TGF- β_1 también estimula la síntesis de ácido hialurónico, que es necesario para que los procesos palatinos se eleven (Ferguson, 1988), y su localización justo antes y durante la elevación coincide con ese papel (Pelton y cols., 1990b). También se ha comprobado que cultivos de procesos palatinos de ratón silvestre a los que se ha añadido TGF- β_1 en el medio muestran un epitelio más fino, un EBM más degradado y un aumento de fibronectina en el mesénquima (Dixon y Ferguson, 1992).

Por todo ello queda establecido que TGF- β_1 actúa a nivel del EBM y del mesénquima y es importante en el desarrollo del paladar, aunque los ratones mutantes para el gen donde está codificado este factor no presenten fisuras palatinas. Este hecho puede explicarse porque los otros dos TGF- β ejerzan una actividad compensatoria, al menos en parte, ante la ausencia de TGF- β_1 . Por ejemplo, Yang y Kaartinen (2007) trabajaron con ratones mutantes *Tgf-b1-KI*, a los cuales se les había insertado el gen *Tgf- β_1* en el de *Tgf- β_3* , silenciando así la expresión de TGF- β_3 pero aumentando la de TGF- β_1 . Estos mutantes presentaban fisuras palatinas parciales, pero no completas como los mutantes *Tgf- β_3 -/-* generados por los equipos de Groffen y Doetschman en 1995 (Kaartinen y cols., 1995; Proetzel y cols., 1995), por lo que concluían que el aumento de TGF- β_1 podía compensar en parte la deficiencia de TGF- β_3 (Yang y Kaartinen, 2007). Más recientemente, en nuestro grupo de investigación hemos observado en procesos palatinos cultivados de ratón el posible papel compensatorio entre TGF- β_1 y TGF- β_3 . Detectamos un aumento en los niveles de expresión de TGF- β_1 cuando los procesos palatinos pertenecían a embriones mutantes *Tgf- β_3 -/-* y cuando pertenecían a individuos silvestres cultivados con un suplemento de TGF- β_3 . Sin embargo, cuando a los cultivos

de embriones mutantes negativos para TGF- β_3 se añadía TGF- β_1 ó TGF- β_3 ese aumento de expresión no era detectado. Es decir, parece que ante una alteración de los niveles de expresión de TGF- β_3 existe un aumento compensatorio de TGF- β_1 (Murillo y cols., 2009).

También existen ratones mutantes cuyo gen *Tgf- β_2* ha sido bloqueado. En este caso los individuos mueren poco antes de nacer o durante el nacimiento, presentan un tamaño menor que los ratones silvestres de su misma especie y múltiples malformaciones: cardíacas, pulmonares, de las extremidades, columna vertebral, ojos, oído interno, defectos urogenitales y craneofaciales. Los defectos detectados indican alteraciones en las interacciones epitelio-mesenquimáticas, en palatogénesis, crecimiento celular, producción de MEC y remodelación tisular. Muchos de los tejidos afectados comprenden derivados de CCN y simulan alteraciones en la cresta neural. Sólo el 20% de dichos mutantes presentan una FP completa (revisado en Dünker y Krieglstein, 2000).

En el paladar embrionario de ratón, la expresión de TGF- β_2 se localiza principalmente en el mesénquima pero se cree que debe ejercer influencia sobre los procesos que ocurren en el EBM de forma directa, ya que se detecta en estas células en forma proteica (Gehris y cols., 1991), o actuando sobre otros factores de crecimiento como el TGF- α (revisado en Fitzpatrick y cols., 1990).

Sin embargo, la expresión de TGF- β_3 se localiza en el EBM tanto en forma de ARNm como de proteína, por lo que se le atribuye el papel principal en la regulación de propiedades específicas de las células epiteliales del paladar embrionario (Pelton y cols., 1990a). De hecho, se ha comprobado su gran importancia en el correcto desarrollo del paladar tanto *in vitro* como *in vivo*. Brunet y colaboradores (1995) demostraron que la inhibición de TGF- β_3 en cultivos de procesos palatinos de ratón de 13 DG impedía la fusión de los procesos y que ésta se recuperaba al añadir TGF- β_3 exógeno al medio de cultivo. Es más, existen trabajos en los que se ha obtenido la fusión de los procesos palatinos de pollo al añadir TGF- β_3 al medio de cultivo, cuando los procesos de esta especie no expresan TGF- β_3 ni llegan a fusionarse ni *in vitro* ni *in vivo* (Sun y cols., 1998; Gato y cols., 2002). Además, los ratones cuya mutación les impide expresar un TGF- β_3 funcional presentan FP completa y fallo en desarrollo pulmonar en el 100% de

los casos, muriendo en las 24 h siguientes al nacimiento y sin presentar ninguna otra malformación (revisado en Dünker y Krieglstein, 2000). Esto lleva a la conclusión de la gran importancia de TGF- β_3 en el desarrollo del paladar.

1.3. La fisura palatina.

Cuando alguno de los procesos referidos anteriormente (apartado 1.1.) se altera y el desarrollo del paladar no ocurre correctamente, su cierre se puede ver afectado, dando lugar a la malformación congénita conocida como fisura palatina (FP).

Existen diversas clasificaciones de los diferentes tipos de fisuras orofaciales, entre las que se encuentra la propuesta por Spina y colaboradores (1972) para clasificar las fisuras labiopalatinas (FLP). Esta clasificación se basa en el desarrollo embrionario del paladar, al igual que otras anteriores (Fogh-Andersen, 1942; Kernahan y Stark, 1958), pero con la particularidad de que se añadieron prefijos latinos (“pre-”, “trans-“, “post-“) al término “foramen” con la finalidad de especificar la localización de la fisura y, a su vez, evocar su origen embriológico (tabla 2, fig. 1).

El foramen incisivo es una abertura en el hueso del paladar duro cercana a los incisivos por la que atraviesan los nervios y vasos sanguíneos nasopalatinos que inervan e irrigan, respectivamente, la mucosa que cubre los derivados del paladar primario esencialmente. El paladar primario se sitúa desde el foramen incisivo hasta el labio y el paladar secundario, desde este foramen hasta la úvula. Spina y colaboradores (1972) utilizaron los prefijos “pre-“, “trans-“ y “post-“ para hacer referencia, respectivamente, a las fisuras aisladas del paladar primario, las fisuras conjuntas del paladar primario y secundario y, finalmente, a las fisuras aisladas del paladar secundario (tabla 2, fig. 1). En esta clasificación, las fisuras desvinculadas del foramen incisivo merecen un grupo aparte, denominado “Fisuras faciales raras”, debido a la baja incidencia con la que se manifiestan.

Tabla 2. Clasificación de Spina y cols., 1972, modificada por Silva Filho y colaboradores y aprobada en el Hospital de Rehabilitación de Anomalías Craneofaciales de la Universidad de São Paulo (Brasil). Adaptada del libro “Fisuras Labiopalatinas: Uma Abordagem Interdisciplinar” (2007).

Grupo I - Fisuras Preforamen Incisivo	Unilateral	Derecha	Completa Incompleta
		Izquierda	Completa Incompleta
	Bilateral	Completa Incompleta	
	Medial	Completa Incompleta	
Grupo II - Fisuras Transforamen Incisivo	Unilateral	Derecha	
		Izquierda	
	Bilateral		
	Medial		
Grupo III - Fisuras Postforamen Incisivo	Completa Incompleta		
Grupo IV - Fisuras faciales raras			

Como se observa en la clasificación de Spina y colaboradores, la FP puede ocurrir como un problema aislado (FP aislada) o en conjunción con fisura del labio (fisura labiopalatina) (revisado en Sadove y cols., 2004). Ambas entidades parecen ser problemas genéticamente distintos. Así, por ejemplo, la fisura de labio con o sin FP sucede con una distribución racial predecible, ocurriendo en sólo 0,3/1000 de los nacidos vivos afroamericanos, 1,0/1000 de los caucásicos, 1,7/1000 de los asiáticos y 3,6/1000 de los indios americanos. Por el contrario, la FP aislada aparece en 0,5 de cada 1000 nacidos vivos sin distribución racial preferente (Strong y Buckmiller, 2001; González y cols., 2004).

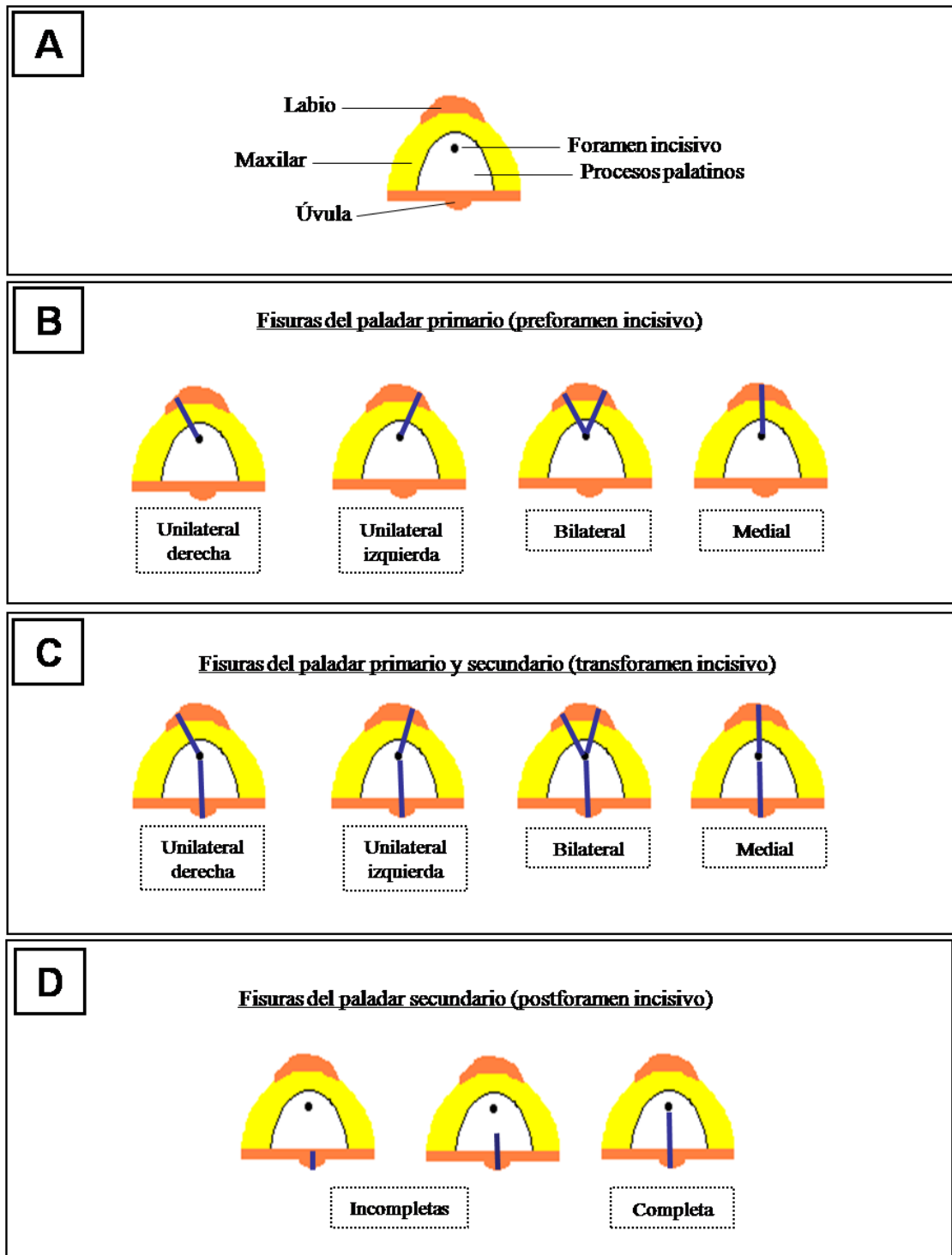


Figura 1. Tipos de fisuras. Representación esquemática del paladar (A) y posibles tipos de fisuras labiopalatinas (B, C, D) según la clasificación de Spina y colaboradores (1972). Adaptado del libro “Fisuras Labiopalatinas: Uma Abordagem Interdisciplinar” (2007). Las líneas azules indican dónde tiene que aparecer la fisura para que se englobe en la clasificación dada. (B) Tipos de fisuras que sólo afectan al paladar primario. (C) Fisuras que afectan al paladar primario y al secundario al mismo tiempo. (D) Fisuras que únicamente afectan al paladar secundario.

Dentro de Europa, países como España e Inglaterra presentan una prevalencia de FLP leve (0,01-0,44 por cada 1000 nacidos vivos) mientras que en países como Dinamarca la prevalencia es de las más altas (superior a 0,70 por cada 1000 nacidos vivos); existiendo casos, como el de Francia, en los que la prevalencia es leve en el caso de las fisuras de labio con o sin FP y de prevalencia elevada en el caso de la FP aislada (Mossey y cols., 2009).

En España, según datos del boletín del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC) publicados en 2009, la frecuencia en el año 2008 de labio leporino asociado o no a FP fue de 4,05 por cada 10.000 recién nacidos vivos, mientras que la de la FP aislada apareció en 3,58 de cada 10.000 recién nacidos vivos (Bermejo y cols., 2009). Según este mismo estudio, que fue realizado con datos recogidos desde 1980 hasta 2008 en diferentes hospitales de toda España, la frecuencia del labio leporino asociado o no a FP y la de la FP aislada presenta una tendencia lineal decreciente estadísticamente significativa. Sin embargo, en ciertas comunidades como la de Madrid, no observan esa tendencia decreciente, sino que no existen diferencias significativas entre los datos recopilados en esos 28 años (Bermejo y cols., 2009). De todos modos, es importante tener en cuenta que es muy posible que la incidencia de las FLP en España pudiera ir en aumento, debido a la gran cantidad de inmigrantes que se han instalado en el país en esta última década procedentes de regiones asiáticas y latinoamericanas, donde la incidencia de esta malformación es más elevada que en los individuos europeos.

Otro factor que dificulta el cálculo de una incidencia general para esta enfermedad es el hecho de que la epidemiología de la FP se complica con la presencia de alrededor de 300 síndromes que incluyen diferentes formas de FP en su presentación. Las fisuras palatinas asociadas a síndromes suelen ser aisladas, sin fisura del labio, es decir, involucrando sólo al paladar secundario. En general, un síndrome se diagnostica en un 33 a un 50% de los pacientes con FP aislada (Van der Kolk, 2000).

En resumen, es complicado concretar unas cifras para la incidencia y la prevalencia de la FP, ya que esta puede darse aislada o asociada a fisura labial y, a su vez, como parte de un síndrome o asociada a otras anomalías. Además existe una relación con el sexo, el grupo étnico y la región a la que pertenecen los individuos estudiados.

1.4. La fisura palatina en los ratones mutantes negativos para el gen *Tgf-β₃*.

En 1995, los equipos de investigación de T. Doeckman en Cincinnati (Proetzel y cols., 1995) y J. Groffen en California (Kaartinen y cols., 1995) lograron generar de forma simultánea ratones mutantes negativos para el gen *Tgf-β₃* (*Tgf-β₃ -/-*). El estudio de estos individuos mutantes confirmó la importancia de TGF-β₃ en la palatogénesis, dado que la única malformación craneofacial que presentan es la FP aislada.

La mutación se obtuvo inicialmente en células madre del clon I98 al reemplazar el exón 6, cuya secuencia codifica de forma completa el dominio activo de la proteína TGF-β₃, por el gen pMC1neo, que confiere resistencia a la neomicina (Thomas y Capecchi, 1987; Capecchi, 1994). A partir de estas células madre, Kaartinen y colaboradores (1995) obtuvieron ratones *Tgf-β₃ -/-* en dos razas distintas: C57 BL/6 y Black Swiss. De los 67 especímenes homocigotos negativos que generaron, todos presentaban el paladar secundario fisurado y sólo el 50% de los casos implicaba además al paladar primario, siendo los fenotipos de las dos razas muy similares entre sí. Además, todos los mutantes negativos morían en las primeras horas de vida, aunque al nacimiento, la talla y el peso eran normales comparados con los silvestres. El estudio de pulmones y vías aéreas mostraba una clara anomalía histológica, con hipoplasia alveolar, defecto en la formación del septo alveolar, engrosamiento mesenquimático e hiper celularidad, siendo la displasia broncopulmonar la causa de la muerte en estos ratones. Ningún otro tipo de malformación o defecto relevante fue observado cuando se estudiaron otro tipo de órganos o estructuras en estos especímenes.

Al mismo tiempo, Proetzel y colaboradores (1995) generaron ratones *Tgf-β₃ -/-* en tres razas distintas: C57 BL/6, CF-1 y 129/Sv. Al igual que los obtenidos por el otro equipo de investigación, el 100% presentaban FP y morían al nacer, deshidratados y cianóticos. Pero al contrario que el otro grupo, los mutantes generados por Proetzel y colaboradores presentaron diferencias en la severidad de la FP sufrida. El fenotipo más severo correspondía a los ratones C57 que mostraban una FP completa en 7 de los 15 mutantes negativos que obtuvieron. Los 8 restantes presentaron FP posterior. De la raza CF-1 se generaron 103 individuos *-/-* y sólo 2 de ellos presentaban FP completa. El fenotipo más frecuente en éstos fue la FP posterior en 92 casos y otros 9 mostraban FP anterior. De la

raza 129/Sv sólo se obtuvieron 2 mutantes negativos para *Tgf-β₃* que presentaron FP posterior. Ninguno de los individuos llevaba asociada una fisura labial.

Estos resultados demostraban que la raza C57 presenta una mayor susceptibilidad a padecer FP, algo constatado por Ferguson en 1988 en estudios de inducción de FP con teratógenos. Para Proetzel y colaboradores (1995), el aumento de la incidencia de fisuras palatinas en los C57 sugiere que en esta raza el gen *Tgf-β₃* interactúa con otros genes involucrados en esta patología, lo cual acontece también en las fisuras palatinas humanas, donde diferentes estudios han constatado la afectación de distintos genes en pacientes fisurados (revisado en Murray y Schutte, 2004).

En este trabajo, hemos empleado la raza C57BL/6J [TM1DOE], procedente de los laboratorios Jackson, en Maryland (EE.UU.) y mantenida por nuestro grupo de investigación en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid desde 1999. En estos individuos, los procesos palatinos de los mutantes crecen, se elevan, se aproximan y contactan en la línea media. Una vez han entrado en contacto, los epitelios del borde medial de los procesos palatinos no se adhieren en ningún punto de su longitud en prácticamente la totalidad de los casos (observaciones de nuestro laboratorio) de manera que el crecimiento posterior en el tiempo de todas las estructuras craneofaciales hace que los procesos palatinos se separen, formándose así una FP completa. Paralelamente, el EBM se diferencia a epitelio escamoso estratificado, similar al epitelio oral (Martínez-Álvarez y cols., 2004).

Todo ello es a consecuencia de las alteraciones moleculares que sufren los procesos palatinos de los ratones mutantes C57 *Tgf-β₃* *-/-* y que generan un desajuste en los mecanismos básicos de la palatogénesis. Para empezar, uno de los mecanismos esenciales en la palatogénesis y que se ve alterado en los mutantes *Tgf-β₃* *-/-* es la proliferación celular. El número de células mesenquimáticas está determinado por un balance entre proliferación y muerte celular y de dicho número dependerá el tamaño de los procesos palatinos (Hanumegowda y cols., 2002): si tienen el tamaño adecuado ambos procesos contactarán y se mantendrán en contacto durante la fusión palatina. En nuestro laboratorio se ha observado que los procesos palatinos de los mutantes presentan una proliferación reducida en las células mesenquimáticas y, dado que el comportamiento de la proliferación está ligado al factor de crecimiento epidérmico -

EGF- (Epidermal Growth Factor) y, en la parte anterior del paladar, a Msx1, ambas moléculas aparecen alteradas en el paladar de los ratones *Tgf-β₃ -/-* (Del Río y cols., 2011).

Aunque los procesos palatinos de los ratones *Tgf-β₃ -/-* lleguen a contactar, existe un fallo en la adhesión consecuencia de, entre otras causas, una escasa presencia de células epiteliales protuberantes, las cuales son esenciales porque aumentan la superficie de adhesión (Martínez-Álvarez y cols., 2000a), y de una carencia de expresión de proteoglicano condroitín sulfato, el cual aparece en las células de los individuos silvestres en la superficie de los epitelios del borde medial justo antes de que entren en contacto y permanece hasta la formación de la CEM (Gato y cols., 2002).

También se han observado en el EBM de los *Tgf-β₃ -/-* múltiples alteraciones en la localización de la expresión de diferentes moléculas implicadas en la adhesión celular como E-cadherina, α-catenina, β-catenina, vinculina o integrina-β2 (Tudela y cols., 2002). Incluso se ha registrado la diferencia existente entre las fisuras palatinas presentadas por las razas de ratón C57 y MF1: los C57 *Tgf-β₃ -/-* presentan una FP completa y los MF1 con la misma mutación una FP parcial. Los primeros muestran una alteración grave del patrón de expresión de múltiples moléculas presentes en el EBM (colágeno IV, laminina, integrina-β1, nectin-1) y llegan a carecer de la expresión de algunas de ellas (integrina-α5 y fibronectina), mientras que los MF1 mutantes no presentan grandes diferencias con los MF1 silvestres en cuanto a la presencia de esas moléculas (Martínez-Sanz y cols., 2008).

Otra diferencia importante entre el paladar de los ratones C57 *Tgf-β₃ -/-* y el de los individuos silvestres es la alteración de las MMP, enzimas proteolíticas que se encargan de un proceso esencial durante la organogénesis, que es el remodelado de la MEC (apartado 1.1). Parece que la principal alteración la sufre la MMP-13, la cual aparece muy disminuida en el paladar de los ratones *Tgf-β₃ -/-* y es recuperada al añadir TGF-β3 en el medio de cultivo (Blavier y cols., 2001).

Aparte de en la adhesión de los procesos palatinos, los ratones *Tgf-β₃ -/-* también presentan fallos en el movimiento de las células del EBM. En experimentos realizados con cultivos de procesos palatinos de mutantes se puede llegar a obtener cierto grado de

adhesión, aunque siempre muy inferior al presentado por los paladares cultivados de individuos silvestres, generando la aparición de la CEM. Las células de los epitelios del borde medial de ambos procesos palatinos aparecen intercaladas una vez formada la CEM pero esa intercalación no llega a ocurrir en los mutantes (Tudela y cols., 2002). Además, tras formarse la CEM, algunas de las células epiteliales que la forman desaparecen de ella emigrando hasta llegar al epitelio nasal (Carette y Ferguson, 1992; Cuervo y Covarrubias, 2004; Jin y Ding, 2006), pero en el caso de los paladares *Tgf-β₃* -/- no realizan dicho desplazamiento (Kartinen y cols., 1997).

Otro de los mecanismos por los que desaparece la CEM es la muerte celular programada o apoptosis de algunas de las células que la constituyen (Mori y cols., 1994; Taniguchi y cols., 1995; Martínez-Álvarez y cols., 2000a; Cuervo y cols., 2002; Cuervo y Covarrubias, 2004; Takigawa y Shiota, 2004; Vaziri Sani y cols., 2005). El análisis de presencia de las células apoptóticas en la CEM de los individuos *Tgf-β₃* -/- revela que la muerte celular de su CEM está muy disminuida (Martínez-Álvarez y cols., 2000b; Murillo y cols., 2009).

Por todo esto, aunque se logre una CEM entre dos procesos palatinos provenientes de mutantes negativos para *Tgf-β₃*, los mecanismos implicados en su desaparición se ven alterados y ésta no tiene lugar. Es más, las células epiteliales que la forman muestran una elevada expresión de queratina y de laminina, al contrario que las células de la CEM de los embriones silvestres, que no expresan dichas moléculas (Kartinen y cols., 1997; Martínez-Álvarez y cols., 2004), lo que les confiere características que las asemejan más a las células del epitelio oral.

1.5. El ácido fólico y su metabolismo.

El ácido fólico (AF) fue descubierto en las hojas de las espinacas primero, y de otros vegetales después (Mitchell y cols., 1941; Thomson, 1947; Santini y cols., 1964); de hecho, la palabra fólico deriva etimológicamente del término latino *folium* que significa “hoja”. Se observó que este ácido era un compuesto muy similar al ácido pteroilglutámico que estimulaba el crecimiento del microorganismo *Lactobacillus casei* y era extraído del hígado y de levaduras (Thomson, 1947). Actualmente se acepta que

son la misma vitamina hidrosoluble, en concreto la B9 (Olivares y cols, 2005), y también son sinónimos del término folato. Para muchos autores, folato se debe emplear para describir las formas naturales de la vitamina y AF para hablar de la forma sintética (Hartridge y cols., 1999; Brouwer y cols., 2001; Tamura y Picciano, 2006).

La principal diferencia entre el AF y el folato es la biodisponibilidad de cada uno, es decir, la proporción de la cantidad ingerida que es absorbida en el intestino y que puede ser empleada para los procesos metabólicos. Ciertos autores hablan de un 50% para el folato frente al 85% del AF (McNulty y Pentieva, 2004; Tamura y Picciano, 2006; Pitkin, 2007), pero otros autores establecen que esta diferencia es discutible (Brouwer y cols., 2001; Winkels y cols., 2007), pues existen diversos factores que se han de tener muy en cuenta a la hora de calcular la biodisponibilidad, como la estructura de los alimentos o los niveles del pH en el estómago durante la digestión (Gregory, 2001; Winkels y cols., 2007). Un importante factor que no se ha de olvidar es que la forma sintética es tomada en píldoras o pastillas mientras que la natural es a través de los alimentos, los cuales pierden parte del folato que contienen si son conservados a temperatura ambiente (Winkels y cols., 2007; www.nestle.es) y cuando son cocinados, en este caso se han descrito pérdidas de entre el 50 y el 80% del contenido de folato en los vegetales y las legumbres cuando éstos son cocidos (revisado en McNulty y Pentieva, 2004).

Debido a que el ser humano es incapaz de sintetizar folato lo ha de ingerir en la dieta (Lucock, 2000), pero el caso de los roedores es diferente, pues ellos pueden sintetizar una pequeña parte del folato necesario debido a determinados microorganismos intestinales que poseen y los cuales son sensibles a la acción microbiciada de las sulfonamidas (Klipstein y Lipton, 1970; Stokstad y Jukes, 1987). Los alimentos donde podemos encontrar la vitamina B9 son: hortalizas de hojas verdes, cítricos, legumbres, huevos, hígado, cereales, levaduras, mariscos y carne de cerdo y de ave de corral (www.nestle.es; www.nlm.nih.gov/medlineplus; Varela-Moreiras y Alonso-Aperte; 1999; Olivares y cols., 2005).

El folato puede aparecer en diversas formas pero es como dihidrofolato (DHF) como es ingerido principalmente (Mathews y Huennekeks, 1963; Lucock y cols., 1995; Finnell y cols., 1998). El DHF llega al intestino en forma de poliglutamatos y allí, gracias a la

acción del enzima folato hidrolasa que es activa a un pH de 7.5 (Horne y cols., 1981), es hidrolizado en la superficie del borde ciliado de las células de la mucosa intestinal y transformado en monoglutamatos (Butterworth y cols., 1969; Finnell y cols., 1998; Pita, 1998; Lucock, 2000; Gregory, 2001), siendo la región proximal del intestino delgado donde tiene lugar principalmente su absorción (Hepner y cols., 1968; Lucock, 2000). Tras la absorción en el yeyuno, el DHF es reducido por el enzima DHF reductasa transformándose así en tetrahidrofolato (THF) monoglutamado (revisado por Finnell y cols., 1998), que es capaz de atravesar la membrana plasmática celular y alcanzar la circulación sanguínea, a través de la cual llegará a las células de los diferentes tejidos – fig. 2- (Strum y cols., 1971; Tamura y Picciano, 2006).

En la cara externa de la membrana plasmática de las células aparecen unos receptores para el folato llamados FR (Folate Receptor), de los que se han descrito dos tipos: FR α y FR β . En el caso de los roedores se denominan FBP -Folate Binding Proteins- (Rothberg y cols., 1990; Antony, 1992; Spiegelstein y cols., 2004) y también existen 2 tipos, el FBP-1 y FBP-2, codificados en los genes *Folbp1* y *Folbp2* (Piedrahita y cols., 1999) y equivalentes, respectivamente, al FR α y FR β humanos (Antony, 1992; Finnell y cols., 1998; Piedrahita y cols., 1999). El folato monoglutamado es el sustrato para estos receptores. Una vez unido el folato a su receptor se desencadena el fenómeno de la potocitosis (Said y Rheda, 1987; Finnell y cols., 1998). La potocitosis consiste en la formación de caveolas (fig. 3), invaginaciones de la membrana plasmática en cuya membrana, además del folato unido al receptor, se localiza el RFC (Reduced Folate Carrier), que es una proteína integral de membrana capaz de generar canales por los que los folatos llegan al citosol (Rothberg y cols., 1990; Finnell y cols., 1998). Una vez allí, los folatos son poliglutamados por el enzima folilpoliglutamato sintasa (Finnell y cols., 1998; Luckock, 2000) y en esta forma no pueden atravesar la membrana plasmática (McGuire y cols., 1980; Pita, 1998; Tamura y Picciano, 2006), por lo que quedan retenidos en el citoplasma donde son almacenados (Foo y cols., 1982; Green y cols., 1988), siendo los hepatocitos las células que más folato almacenan (Horne y cols., 1978; Varela-Moreiras y Alonso-Aperte; 1999). Las caveolas, una vez vacías de folato, vuelven a integrarse en la membrana plasmática – fig. 3- (Rothberg y cols., 1990). El folato intracelular, en el caso del hígado, puede volver a ser monoglutamado para

regresar a la circulación sanguínea a través del conducto biliar y el intestino delgado –
 fig. 2- (Pita, 1998; Varela-Moreiras y Alonso-Apperte; 1999; Ros y cols., 2008).

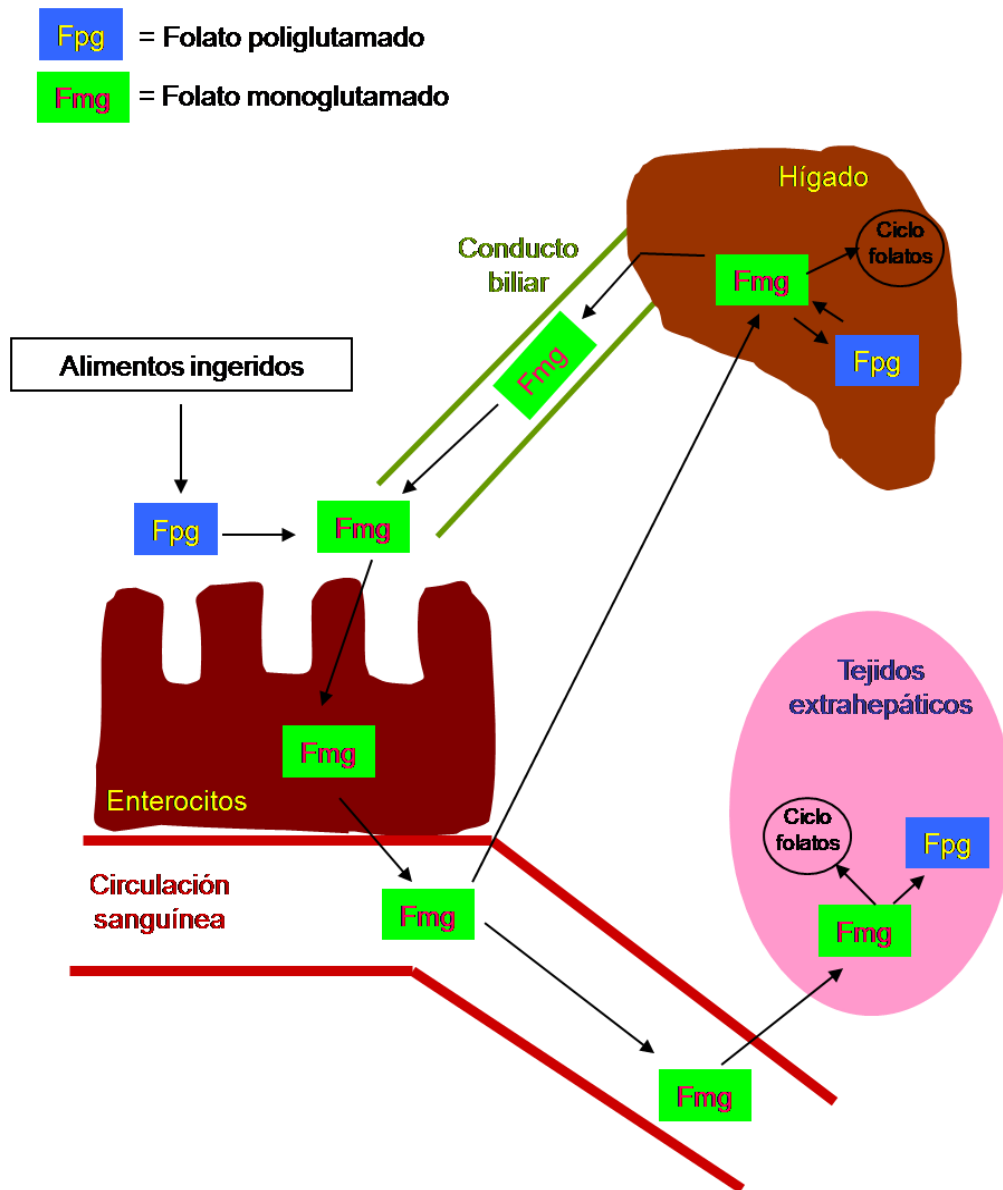


Figura 2. Circulación del folato. El folato ingerido en los alimentos es poliglutamado (representado en azul), pero en esta forma es incapaz de atravesar las membranas plasmáticas celulares. En el lumen intestinal es transformado en monoglutamatos (representado en verde), los cuales pueden atravesar las membranas. En forma de monoglutamatos y a través de los enterocitos del intestino, el folato llega a la circulación sanguínea. La circulación sanguínea los hace llegar a los distintos tejidos del organismo. Una vez en las células de los tejidos el folato será activo metabólicamente, es decir, entrará en el ciclo de los folatos o será poliglutamado para su almacenaje. En el hígado la cantidad de folato poliglutamado almacenado en los hepatocitos es mucho mayor que en otros tipos celulares y puede volver a ser monoglutamado y regresar así a la circulación sanguínea a través del conducto biliar que desemboca en el lumen intestinal.

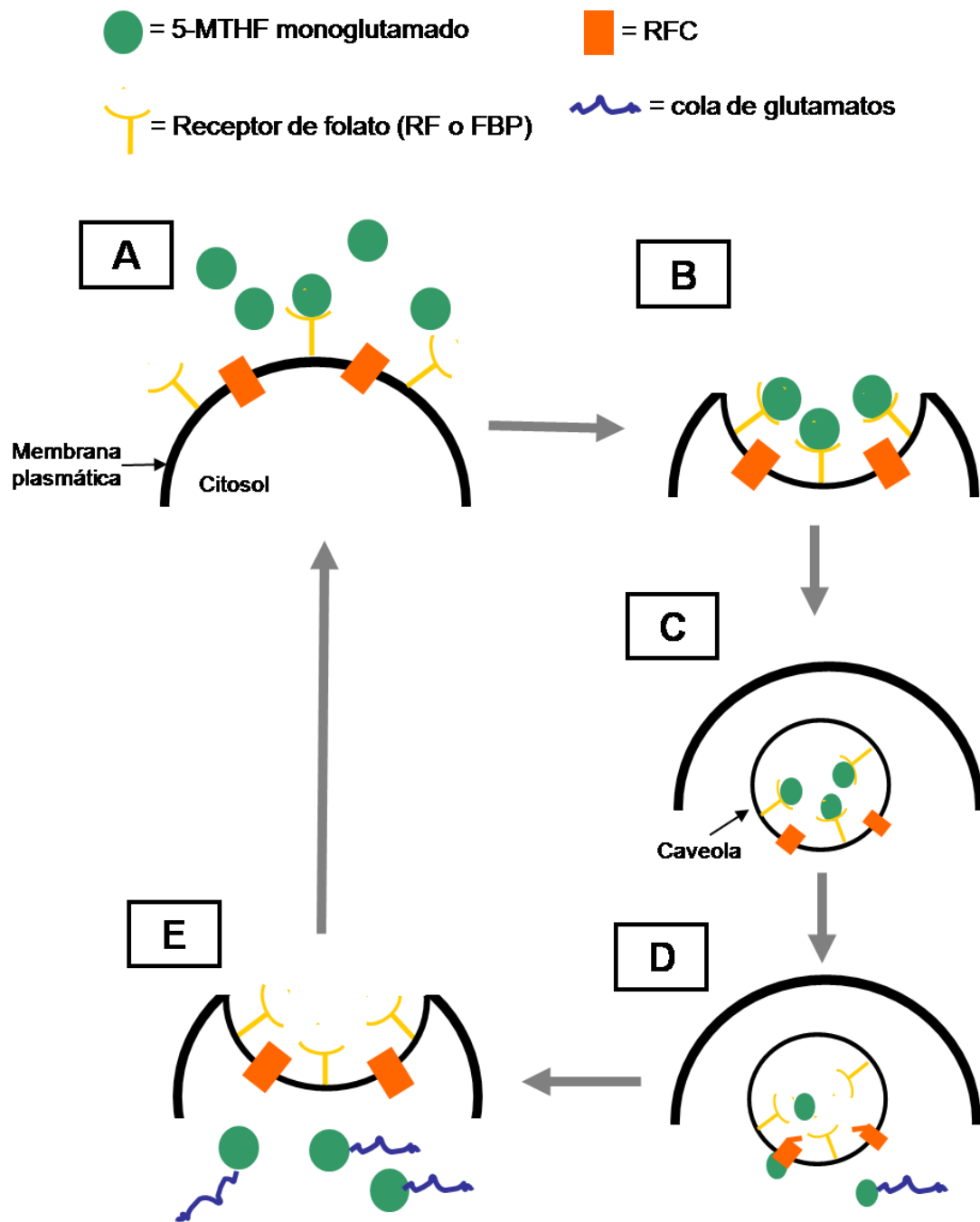


Figura 3. Proceso de potocitosis. A) Los receptores del folato (en amarillo), RF en humanos y FBP en roedores, se sitúan en la membrana plasmática de las células junto con el RFC (en naranja). Los receptores son afines al THF en forma de monoglutamato (en verde). B) Cuando los receptores están unidos a sus sustratos, la membrana plasmática sufre invaginaciones. C) Las invaginaciones de la membrana plasmática dan lugar a las caveolas (vesículas citoplasmáticas). D) Una vez formada la caveola, el folato se desprende de su receptor y es transportado hasta el citosol por el RFC. En el citosol el folato es poliglutamado (en azul). E) Al estar en forma de poliglutamado, el folato queda retenido en el citoplasma y la caveola vuelve a formar parte de la membrana plasmática.

Debido a que parte de los folatos secretados en la bilis regresan a la circulación sanguínea al ser reabsorbidos nuevamente, la pérdida fecal de folato es escasa (Pita, 1998; Varela-Moreiras y Alonso-Aperte; 1999) llegando a perder como máximo un 3,5% del folato ingerido en 24 horas (Yoshino, 1968). También existe una pérdida por vía urinaria, pero la absorción que tiene lugar en el túbulo renal proximal es suficientemente eficiente como para que la pérdida no sea muy elevada (Weingärtner y cols., 2007); dicha pérdida se calcula dentro de un rango de 1-10 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Varela-Moreiras y Alonso-Aperte; 1999).

El folato no excretado que permanece en el interior celular va a tener un papel metabólico como donante y receptor de unidades de carbono, unidades que son sintetizadas en la célula durante el metabolismo y serán transportadas de una reacción a otra en forma de derivados del folato (Ros y cols., 2008). Cuando el THF llega al interior celular es transformado en 5-metiltetrahidrofolato -5-MTHF- (fig. 4) gracias al enzima 5-MTHF reductasa (Zarkrewski y Sansone, 1967; Varela-Moreiras y Alonso-Aperte; 1999; Ros y cols., 2008). Durante el ciclo de los folatos, el THF será poliglutamado por el enzima folilpoliglutamato sintasa y, una vez en forma de poliglutamatos, sufrirá diferentes reacciones que darán lugar a distintas estructuras químicas del folato (como el 10-formilTHF y el 5,10-metilenTHF, entre otros) que intervienen en la síntesis de las bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas (fig. 4), las cuales forman las unidades básicas que conforman el ADN, es decir, los nucleótidos (Canellos y cols., 1967; Ross, 2010).

El 5-MTHF se transforma nuevamente en THF y durante este proceso el aminoácido homocisteína (Hcy) emplea el protón expulsado en esta reducción enzimática para generar metionina (Met). En esta reacción están implicados el enzima metionina sintasa junto con la vitamina B12 como coenzima (Elmore y cols., 2007; Zeisel, 2009; Ross, 2010) en la denominada vía de la remetilación, que es parte del ciclo de la metionina (Burjel y cols., 2007; Varela-Moreiras y cols., 2007) y está conectada con el ciclo de los folatos (fig. 4). La remetilación también puede generarse por otra vía independiente de folato y que sólo tiene lugar en los hepatocitos, la remetilación hepática; en este caso está implicada la betaína, la cual actúa como cofactor (Stekol y cols., 1957; Skiba y cols., 1982; Finkelstein y cols., 1988; Burjel y cols., 2007; Purohit y cols., 2007). Existe una tercera forma de obtener Met y es a partir de la dieta: la carne roja es especialmente

rica en Met, y al metabolizar las proteínas de dicha carne tras ser ingerida se obtiene parte de la Met que necesita el organismo (Hajjar, 2001; Sharma y cols., 2006).

La importancia de la Met en parte se debe a que aparece involucrada en el proceso de la metilación, que consiste en la unión de grupos metilo (-CH₃) a determinadas moléculas como el ADN. En las células eucariotas, los patrones de metilación son específicos de cada tejido y están simétricamente distribuidos en las islas CpG, que son regiones del ADN donde se concentra un gran número de citosinas (C) unidas por un enlace fosfato (p) a guaninas -G- (Jones, 1986; Fatemi y cols., 2005). En el genoma de los mamíferos, aproximadamente el 70% de las islas CpG están metiladas (Chiang y cols., 1996; Robertson y Jones, 2000). Las zonas metiladas no son reconocidas por los factores de transcripción y no son expresadas (Jones, 1986; Ulrey y cols., 2005), por tanto, la metilación puede activar unos genes, desactivar otros o modificarlos mediante el control de la metilación. Esa metilación de las islas CpG se determina en los estadios más tempranos de la embriogénesis; el patrón de metilación se borra y restablece posteriormente tras la implantación. Después del nacimiento, el patrón de metilación se establece definitivamente y permanecerá así el resto de la vida del individuo (Finnell y cols., 2004; Zeisel, 2009). Se ha de tener en cuenta que la C es la base más inestable del ADN y por ello las regiones CpG son muy propensas a la mutación (Chiang y cols., 1996). La metilación es un proceso esencial en el desarrollo, la inactivación del cromosoma X y la proliferación celular (Robertson y Jones, 2000); por todo ello, su alteración puede generar graves trastornos.

La Met también es importante porque es la única fuente de Hcy en el organismo (Burjel y cols., 2007; Varela-Moreiras y cols., 2007). El mecanismo por el que se produce la Hcy es la vía de la transmetilación. En esta tercera vía situada dentro del ciclo de la Met, la S-adenosilmetionina (SAM) dona diferentes sustratos convirtiéndose en S-adenosilhomocisteína (SAH), la cual dará lugar a la Hcy en una reacción reversible (fig. 4). La Hcy es esencial porque, junto con la serina, en la llamada ruta de la cisteína o vía de la transulfuración, generan el aminoácido cisteína –fig. 4- (Forges y cols., 2007; Zeisel, 2009; Ross, 2010).

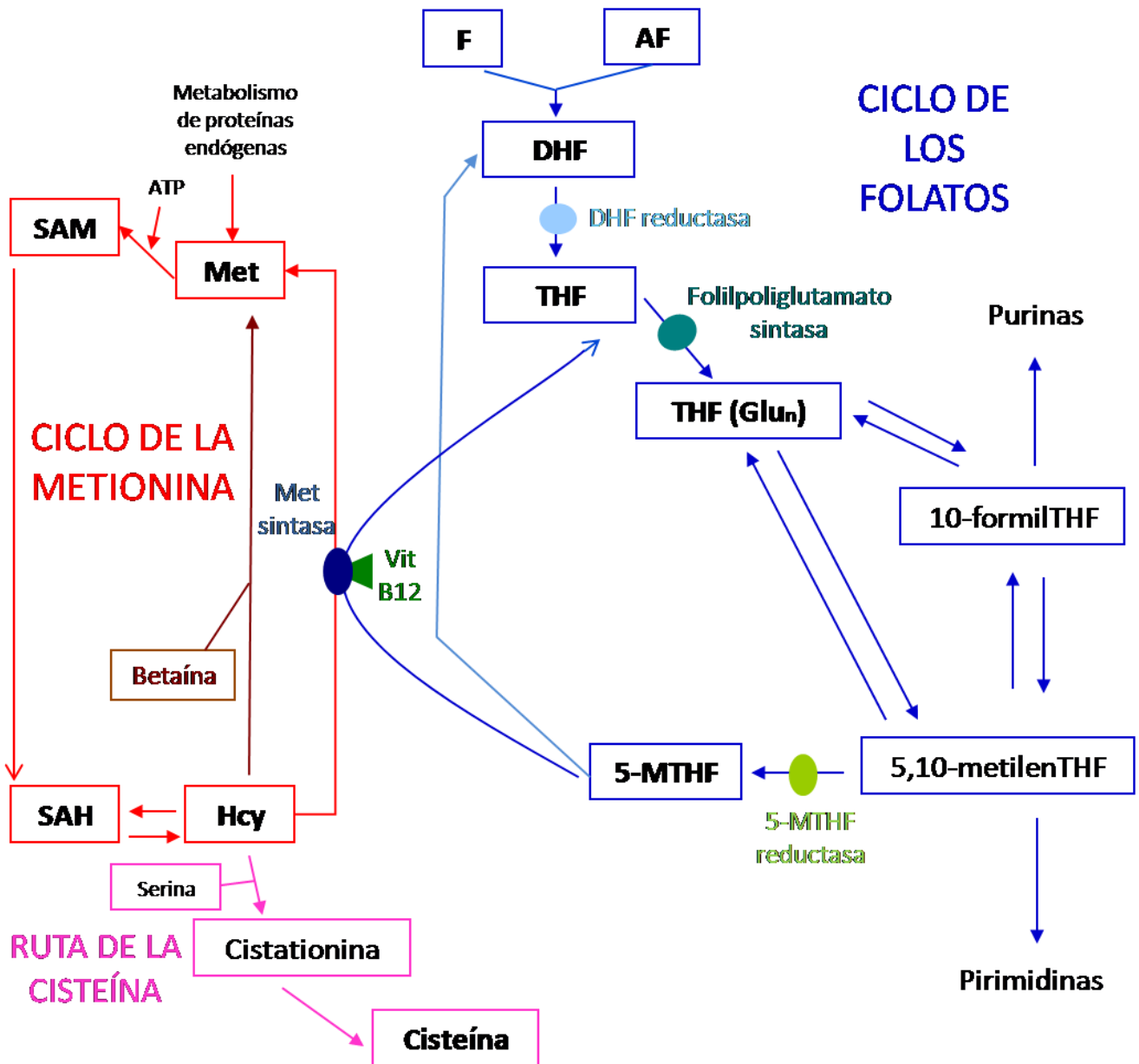


Figura 4. Rutas metabólicas en las que están involucrados los folatos. Ciclo de los folatos (representado en azul): los productos de este ciclo, son indispensables para la síntesis de purinas y pirimidinas. Ciclo de la metionina (representado en rojo): se observa que el enzima metionina sintasa requiere 5-MTHF y vitamina B12 como cofactores para ser funcional y dar lugar a la producción de Met y Hcy. La remetilación también puede tener lugar gracias a la betaína y no al 5-MTHF. Ruta de la cisteína (representada en rosa): la Hcy generada en el ciclo de la Met es fundamental para la formación del aminoácido cisteína. AF: ácido fólico; DHF: dihidrofolato; F: folato; Hcy: Homocisteína; Met: metionina; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; THF: tetrahidrofolato; THF (Glu_n): THF poliglutamado; Vit B12: vitamina B12; 5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato.

1.6. Importancia del ácido fólico en la gestación.

Entre los años 50 y 60 quedó establecida la importancia del AF durante el embarazo para un correcto desarrollo embrionario, pero no fue hasta la década de los 70 cuando en EE.UU. se comenzó a recomendar a las mujeres embarazadas un suplemento de AF de unos 200-400 µg al día. En los años 90 quedó confirmada la existencia de una relación entre déficits de esta vitamina y ciertas malformaciones como los defectos de tubo neural (DTN). Fue en esta misma década cuando también comenzó el interés hacia la Hcy al descubrir su estrecha relación con los folatos.

Son bien conocidas las causas por las que se puede sufrir un déficit de folato. Las dos más evidentes serían una ingesta insuficiente de la vitamina o una mala absorción de ésta. Una tercera causa es la alteración o alteraciones que pueden sufrir los genes que codifican para ciertas enzimas implicadas en el ciclo de los folatos que equivalen a un déficit de folato. Las variantes génicas más estudiadas en relación con la aparición de DTN y de FLP son las del gen que expresa el enzima MTHF reductasa (Finnell y cols., 2004; Tamura y Picciano, 2006), la cual es esencial para obtener 5-MTHF desde el THF en el ciclo de los folatos (apartado 1.5, fig. 4).

Otras alteraciones genéticas equiparables al déficit de folato, son las que afectan a la expresión de los genes que codifican las proteínas que actúan de receptores del folato. Los FR en humano y los FBP en ratón son esenciales para que el folato llegue al interior celular y pueda cumplir su función (apartado 1.5) y para que el embrión en desarrollo, y posteriormente el feto, obtenga los niveles adecuados de vitaminas B. Existen diversos estudios que relacionan una alteración en estos receptores con la aparición de defectos como los DTN y las FLP (Finnell y cols., 1998; Antony y Hansen, 2000; Blik y cols., 2006; Antony, 2007).

De los dos FBP existentes parece que el más importante de los dos, en cuanto al desarrollo embrionario de ratón se refiere, es FBP1. Esto aparece reflejado en el estudio realizado por Piedrahita y colaboradores (1999) en el que generaron dos cepas de ratones mutantes, silenciando en cada una de ellas uno de los alelos de los dos genes *Folbp*: *Folbp1* +/- y *Folbp2* +/- . Los individuos homocigotos negativos para *Folbp2*, resultantes de cruces entre heterocigotos *Folbp2* +/-, no presentan diferencias

morfológicas con los individuos silvestres y, al igual que ellos, alcanzan la edad adulta y son capaces de reproducirse. Sin embargo, los *Folbp1* $-/-$, que surgían del cruce de individuos *Folbp1* $+/-$, rara vez sobrepasaban el día 10 de gestación. Cuando a las hembras *Folbp1* $+/-$ se les administraba un suplemento de AF antes de la concepción y durante el desarrollo embrionario se obtenían fetos homocigotos negativos de más de 10 DG incluso algunos llegaban a nacer y crecer llegando a convertirse en adultos, aunque un tamaño menor que los silvestres y presentaban alteraciones oculares y/o en la forma de la cabeza.

Trabajos como el mencionado de Piedrahita y colaboradores (1999) apoyan la existencia de una relación entre el déficit de AF y un aumento del riesgo de padecer DTN y, por tanto, avalan el beneficio que supone un aporte adicional de esta vitamina frente a la prevención de dichos defectos (revisado en Finnell y cols., 1998). Sin embargo, no se conocen los mecanismos concretos por los que se establece dicha relación entre el AF y los DTN.

Asimismo, hay que considerar el papel que podía tener el AF o las vitaminas B en general administrados como suplementos dietéticos a la hora de revertir o evitar diferentes malformaciones. Para ello se han realizado múltiples estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones (Tolarova y Harris, 1995; Czeizel y cols., 1999 y 2004; Munger y cols., 2004; Van Rooij y cols., 2004; Wilcox y cols., 2007; Yazdy y cols., 2007; Badovinac y cols., 2007) y, tras varios estudios de este tipo en los que únicamente se analizaba la cantidad de folatos ingerida por las mujeres y la frecuencia con la que aparecían los defectos en sus hijos, se llegó a la conclusión de que debía existir un componente genético que, asociado al déficit vitamínico, aumentara el riesgo de padecer determinadas malformaciones, ya que existen diversas investigaciones en las que se observa cómo un déficit de folato afecta de forma diferente según la población o especie afectada (Shaw y cols., 1995; Czeizel y cols., 1999; Ray y cols., 2003; Yazdy y cols., 2007).

También existen estudios que exponen que un suplemento de AF por sí solo no es suficiente para la prevención de los defectos que comúnmente se asocian a un déficit de folato (Hartridge y cols., 1999; Ernest y cols., 2006; Shaw y cols., 2006). Por ello, muchos investigadores se plantean la incógnita de si es más beneficiosa una

administración de AF sólo o si se debería combinar con otros elementos (Werler y cols. 1999; Itikala y cols., 2001; Weingärtner y cols., 2004) y especialmente con otras vitaminas (Shaw y cols., 1995; Johnson y Little, 2008; Stopper y cols., 2008).

A pesar de esta duda, distintos autores han encontrado evidencias de los beneficios de un suplemento de AF frente a diversas afecciones como las alteraciones embrionarias provocadas por el citoestático procarbazona (Bienengräber y cols., 2001), por el ácido retinoico (Reynolds y cols., 2003), por el etanol (Xu y cols., 2006) o la alteración de la proliferación en la mucosa rectal de los pacientes que sufren cáncer colorectal (Khosraviani y cols., 2002).

En los últimos años también se plantea si un suplemento de AF es adecuado para todo el mundo o si sólo lo es para mujeres embarazadas, y si sólo para aquellas mujeres con antecedentes de DTN y/o de FLP o para todas. En determinados países como EE.UU. el enriquecimiento con AF de alimentos básicos como los cereales se realiza desde 1996 (Feinleib y cols., 2001) pero en otros, como en España, sólo se recomienda a las mujeres que pretenden quedarse embarazadas o que ya lo están, un suplemento de 0'4 mg/día si no tienen antecedentes de DTN y de 4 mg/día si los tienen (Martínez-Frías y cols., 2003). Esta diferente forma de actuar seguramente venga dada porque la dieta mediterránea española es más rica en folato que la dieta estadounidense.

Determinar la dosis correcta y a quién suministrarla también es complicado debido a que elevados niveles de AF pueden enmascarar la detección de la anemia perniciosa (Sheehy, 1961; Shojania, 1980; Reynolds, 2002) o alterar el efecto de los antiepilépticos (Butterworth y Tamura, 1989; O'Brien y Gilmour-White, 1993) e incluso agravar patologías como la fibrosis hepática (Marsillach y cols., 2008), aunque ciertos autores creen que esto podría regularse con un seguimiento adecuado de los pacientes con las patologías nombradas (Wald y cols., 2001). Así, mientras unos autores abogan por una fortificación dietética generalizada en todos los países como un método sencillo y barato (Oakley, 2009), otros se oponen alegando que no se conocen los posibles efectos de una exposición prolongada a un suplemento de AF sin que éste sea necesario (Lucock y Yates, 2005).

Lo que es aceptado sin reparos es la importancia de las vitaminas B en el desarrollo embrionario y que la mejor manera para beneficiarse del suplemento de AF sería si éste se toma unos meses antes de la concepción y durante el embarazo, especialmente en el primer trimestre, que es cuando tiene lugar el cierre del tubo neural y la emigración de las CCN (Martínez-Frías y cols., 2003; Weingaertner y cols., 2005), procesos cuyas alteraciones desembocan en DTN y FLP (Antony y Hansen, 2000; González-Otero y cols., 2003; Padmanabhan, 2006; Sant'Anna y Tosello, 2006; Rosenquist y cols., 2007).

1.7. El ácido fólico y las fisuras labiopalatinas.

Debido a que se conoce la existencia de una relación entre las CCN y los niveles de folato y que esto, a su vez, se conecta con la aparición de DTN como se explica en el apartado anterior, se plantea también la posibilidad de que el déficit de folato esté implicado en la aparición de FLP y el aporte extraordinario de dicha vitamina pueda generar un efecto protector. Aunque la relación con las FLP no ha sido tan ampliamente estudiada como la de los DTN, debido posiblemente a que los DTN a menudo son incompatibles con la vida y las FLP no, no existen estudios concluyentes respecto a la relación directa entre ambos factores.

Múltiples estudios epidemiológicos no han hallado datos que confirmen que el aporte dietético de AF sea capaz de generar un descenso en la incidencia de las FLP (Fraser y Warburton, 1964; Hayes y cols., 1996; Czeizel y cols., 1999). Sin embargo, en otros trabajos se han obtenido datos que apoyan la existencia de un efecto beneficioso de este tipo de aporte vitamínico en la dieta materna (Shaw y cols., 1995; Czeizel y cols., 1996; Elwood y Colquhoun, 1997; Czeizel y cols., 1999; Natsume y cols., 1999; Prescott y Malcom, 2002; Chevrier y cols., 2007; Boyles y cols., 2008). En cualquier caso, existe una opinión generalizada de que se requieren más estudios al respecto, dado que el componente genético de las FLP es muy importante y puede variar según la población estudiada. Un estudio en el que se demuestra la importancia del componente genético es el de Schubert y colaboradores (2002), en él se usaron dos razas diferentes de ratón y se anularon las vitaminas B de su dieta observándose cómo en una de las razas aumentaba la incidencia de FP pero en la otra no.

La importancia de la población estudiada y de los polimorfismos genéticos analizados queda reflejada en diversos trabajos en los que se analizan determinados polimorfismos del gen del enzima MTHF reductasa. Según la población y el polimorfismo estudiados, los datos indican la existencia de una relación de este enzima y la aparición de las FLP (Han y cols., 2011) o no (Verkleij-Hagoort y cols., 2007; Boyles y cols., 2008; Vieira y cols. 2008), aunque muchos de los trabajos en los que no se encuentra dicha relación mantienen que debe existir alguna, si bien no sea con ese enzima concretamente (Hartridge y cols., 1999; Itikala y cols., 2001; Jugessur y cols., 2003). De hecho, existen estudios que analizan variantes alélicas de otros genes implicados en el ciclo de los folatos y que sí han hallado una posible conexión entre la presencia de esas variantes alélicas y la aparición de FLP como es el caso de la transcobalamina-2, implicada en transporte de vitamina B (Martinelli y cols, 2006), o el RFC1, proteína implicada en el transporte del folato al interior celular (Vieira y cols., 2008).

Además de los estudios epidemiológicos, existen otros en los que se emplean modelos animales con dietas controladas para intentar desentrañar la posible conexión entre los niveles de folato y la alteración del desarrollo palatino. Es el caso de Burgoon y colaboradores (2002), que emplearon hembras de ratón de la raza ICR a las que alimentaron durante 4 semanas con una dieta carente de AF. Pudieron concluir que existía un gran retraso en el desarrollo embrionario, y por tanto en el desarrollo del paladar, además de un aumento en el número de reabsorciones uterinas, posiblemente debido a un aumento de embriones con graves malformaciones incompatibles con la vida. También existen trabajos en los que se administran teratógenos causantes de FP y se observa el papel profiláctico del AF frente a sus efectos nocivos. Es el caso del trabajo de Bienengraber y colaboradores (2001), en el que determinaron que el aporte de AF era beneficioso frente a la FP generada por la procarbazona, y el trabajo de Reynolds y colaboradores (2003), en el que observaron el papel beneficioso del AF y de la Met frente a las FP y las malformaciones esqueléticas ocasionadas por el ácido retinoico.

Existen otra serie de trabajos realizados con los ratones mutantes generados por Piedrahita y colaboradores (1999), que poseen silenciado el gen *Folbp1*, por lo que son incapaces de sintetizar el receptor de folato FOLBP1 (apartado 1.5). Los embriones *Folbp1* *-/-*, al carecer de ese receptor, no son capaces de utilizar el folato materno, siendo esta situación equiparable a una dieta materna carente de AF. Estos ratones

Folbp1 $-/-$ en ocasiones presentan FLP, además de otras malformaciones (Piedrahita y cols., 1999; Tang y Finnell, 2003; Spiegelstein y cols., 2004; Tang y cols., 2005), y las teorías para explicar la posible asociación entre la ausencia de expresión de FOLBP1 y la aparición de FLP son múltiples. Dicha asociación puede residir en la importancia que el folato tiene en el proceso de metilación del ADN (apartado 1.5.) y de cómo fallos en el patrón de metilación pueden desencadenar malformaciones como las FLP (Finnell y cols., 2002). Otras teorías plantean que, en estos mutantes, la no expresión de Folbp1 puede provocar la alteración de genes implicados en el desarrollo craneofacial (Tang y Finnell, 2003) y/o alteraciones en la migración de las CCN (Spiegelstein y cols., 2004), fundamentales durante la formación del paladar (apartado 1.1). También ha sido planteado que los Folbp1 $-/-$ presenten una muerte celular elevada y una proliferación celular disminuida en las células del tubo neural y en las CCN (Tang y cols., 2005), por lo que se explicarían los casos de DTN y de FLP.

A pesar de todo lo mencionado, a día de hoy son muchas las incógnitas que siguen estando presentes respecto al papel del AF en el desarrollo del paladar y, por tanto, si su déficit provoca alguna alteración concreta, de qué manera puede provocarla y si su aporte constituye algún efecto profiláctico frente a todas las FLP o sólo frente algunas concretas, como la FP aislada. Por todo ello y por el escaso número de trabajos a nivel experimental que existen, creemos que el presente estudio, en el que hemos empleado un modelo experimental animal, puede aportar datos relevantes en este campo.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Las FLP son la malformación congénita más habitual en los países desarrollados después de las cardíacas y su prevalencia es similar a la del Síndrome de Down y a la de los DTN (Bianchi y cols., 2000). Los niños fisurados sufren múltiples problemas a lo largo de su vida, entre los cuales están las diversas operaciones quirúrgicas a las que se han de someter y las implicaciones sociales por su aspecto físico anómalo y por la dificultad para vocalizar correctamente. Todo esto desemboca en un elevado coste económico destinado al tratamiento. Por ejemplo, los tratamientos requeridos durante un año por los niños fisurados de California suponen 86 millones de dólares (Finnell y cols., 2004) y en el caso de Italia, como ejemplo europeo, existen unos 800 casos al año que suponen 80 millones de euros anuales (Bianchi y cols., 2000). Este elevado coste deriva de lo mucho que se alarga el tratamiento en el tiempo y de la cantidad de profesionales multidisciplinares que se requieren en él (cirujanos, odontólogos, logopedas, pediatras, psicólogos...).

Dentro de las FLP, la FP es la malformación más frecuente, teniendo una etiología multifactorial: ambiental y congénita, soliendo aparecer en los estratos sociales en los que la alimentación y los cuidados periconcepcionales son escasos (revisado en Antony, 2007). De entre las alteraciones genéticas causantes de la FP, una importante es la del gen *Tgf-β₃* (Lidral y cols., 1997; Mitchell y cols., 2001). Durante los últimos años, el equipo de investigación del que forma parte la autora de este trabajo ha investigado las causas por las que la fusión de los procesos palatinos no se produce de forma satisfactoria en ratones mutantes negativos para este gen (*Tgf-β₃ -/-*), que presentan FP al nacimiento.

Una de las causas que puede desencadenar la aparición de FLP es la alteración del desarrollo embrionario por un agente externo como puede ser la dieta materna. Desde la década de los años 50 es conocida la importancia del folato, dado que su déficit dietético provoca la aparición DTN en embriones en desarrollo. Lo que actualmente no ha quedado establecido es sobre qué mecanismos ejerce su efecto y si dicho déficit vitamínico también afecta al desarrollo craneofacial y, por tanto, si puede generar FLP. Por ello, determinar si un déficit de AF dietético perigestacional condiciona o no la

aparición de FP o la alteración de los mecanismos implicados en el desarrollo del paladar resulta crucial para recomendar la ingesta materna de esta vitamina, especialmente en los casos en los que concurren factores de riesgo de aparición de esta patología.

De igual manera que se ha asociado el consumo de tabaco durante la gestación con un incremento del riesgo de padecer FP cuando se relaciona con determinadas variantes alélicas del gen *Tgf-β₃* (Romitti y cols., 1999), se podría plantear que un déficit de ácido AF fuera desencadenante de FP en relación con una alteración en la expresión de TGF-β₃. El conocimiento adquirido por nuestro grupo de investigación en relación con el papel fundamental que desempeña el TGF-β₃ durante el desarrollo del paladar del ratón permite analizar experimentalmente las implicaciones del déficit de ácido fólico en la expresión de este gen y, muy especialmente, determinar si una aportación exógena de TGF-β₃ durante el periodo preciso de formación del paladar es capaz de paliar los efectos producidos en el mismo por la carencia de AF. Por otra parte, la posibilidad de enriquecer con ácido fólico la dieta de las madres de ratones mutantes negativos para el gen *Tgf-β₃*, que presentan FP congénita, es de alto interés en la investigación experimental del posible beneficio del aporte de ácido fólico dietético en la prevención de fisuras palatinas de origen genético.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

Basándonos en los datos presentados anteriormente, las hipótesis planteadas para este trabajo fueron:

1. La carencia de ácido fólico en la dieta materna produce malformaciones en los fetos y altera los mecanismos de desarrollo del paladar de ratón y produce fisura palatina.
2. El déficit de ácido fólico dietético altera la expresión de TGF- β_3 en el paladar en desarrollo.
3. Las modificaciones producidas en los mecanismos de formación del paladar por la carencia de ácido fólico dietético son revertidas *in vitro* por la administración exógena de TGF- β_3 .
4. El suplemento de ácido fólico en la dieta materna previene la aparición de la fisura palatina que presenta el ratón homocigoto negativo para el gen *Tgf- β_3* .

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Basándonos en las hipótesis planteadas, proponemos los siguientes objetivos:

1. Analizar las malformaciones macroscópicas que se producen en los fetos de ratón hijos de hembras silvestres alimentadas entre 2 y 16 semanas con una dieta carente de ácido fólico.
2. Determinar si la falta de ácido fólico en la dieta materna de hembras de ratón silvestre altera los mecanismos de desarrollo del paladar embrionario y produce fisura palatina.
3. Si es así, investigar si el déficit dietético de ácido fólico en el ratón silvestre altera la expresión de TGF- β_3 en el paladar en desarrollo y, si éste es el caso, conocer si la adición de cantidades fisiológicas de TGF- β_3 a cultivos de procesos palatinos deficitarios de ácido fólico normaliza los mecanismos de desarrollo del paladar dañados por tal déficit.
4. Determinar si un aporte de ácido fólico en la dieta de hembras de ratón heterocigotas para el gen *Tgf- β_3* mejora el desarrollo del paladar de los ratones de su progenie homocigotos negativos para este gen, tanto *in vivo* como *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales utilizados.

Todos los experimentos realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid.

En este estudio se han utilizado dos tipos de ratones de la cepa C57/BL/6J:

-Los silvestres (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN, EEUU), que son homocigotos para el gen *Tgf-β₃*.

-Los heterocigotos para el gen *Tgf-β₃* (Jackson Laboratories, Maryland, EEUU); son utilizados exclusivamente para el objetivo 4.

Todos ellos fueron alojados en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid a temperatura constante de 22±2°C y en ciclos de 12/12 horas de luz/oscuridad. La edad de las hembras cuando comenzaron los experimentos fue de 8 semanas. Durante todo el experimento, los animales tuvieron acceso libre al alimento y al agua. Según la dieta administrada diferenciamos cuatro grupos (tabla 3):

- ⊕ Grupo 1 → Compuesto por 17 hembras silvestres alimentadas con dieta estándar para roedores (SAFE A04/A03, Harlan), la cuál contiene 2 mg AF por cada kg de dieta.

- ⊕ Grupo 2 → Compuesto por 78 hembras silvestres alimentadas con una dieta carente de AF (CAF): 0 mg AF/kg dieta + 1% de succinil sulfatiazol (antibiótico que asegura la ausencia de producción endógena de AF; TD02490, Harlan). La dieta fue administrada de 2 a 16 semanas.

- ⊕ Grupo 3 → Compuesto por 34 hembras heterocigotas para el gen *Tgf-β₃* alimentadas con dieta estándar para roedores (SAFE A04/A03, Harlan), la cual contiene 2 mg AF/kg dieta.

- ⊕ **Grupo 4** → Compuesto por 35 hembras heterocigotas para el gen *Tgf-β₃* alimentadas con una dieta con suplemento de AF (SAF): 40mg AF/kg dieta (lo que supone un contenido de AF 20 veces superior a los niveles de la dieta control y que se puede considerar como dosis farmacológica; TD06692, Harlan). La dieta fue administrada entre 2 y 16 semanas.

Los requerimientos dietarios de los grupos controles se establecieron según el Consejo Nacional de Investigación (National Research Council, 1995) y la dieta con SAF se planificó a partir de los estudios previos realizados por diversos autores (Alonso-Aperte y Varela-Moreiras, 1996; Achón y cols., 1999, 2000, 2002; Roncalés y cols., 2004; Achón y cols., 2007).

Tabla 3. Resumen de los grupos experimentales empleados en este trabajo.

Genotipo	Contenido AF en dieta	Nº de hembras	Grupo
<i>Tgf-β₃</i> +/+	2 mg/kg	17	1
	0 mg/kg	78	2
<i>Tgf-β₃</i> +/-	2 mg/kg	34	3
	40 mg/kg	35	4

Los cruces se realizaron durante una noche cada dos semanas; para ello se introdujeron de 2 a 4 hembras en la jaula de un macho entre las 19:00 y las 20:00 de la tarde y a la mañana siguiente, tras 12 horas de cruce, eran separados. La mañana siguiente a la noche del cruce se considera día 0 de gestación. Pasados 13 días, se observaba si las hembras presentaban abultamientos abdominales laterales. En caso afirmativo, se consideraron preñadas y en día 13 de gestación. Las que fueron consideradas preñadas se sacrificaron por luxación cervical tras anestesia con cloroformo en el DG requerido por el experimento correspondiente (tabla 4).

Tabla 4. Análisis realizados, edad de los individuos empleados, región empleada para el estudio y grupo experimental al que pertenecen las hembras progenitoras utilizadas.

Análisis	Edad	Porción del feto empleada	Grupo experimental
Macroscópico	17 DG	Cabeza y cuerpo	Todos
Secciones histológicas	17 DG	Cabeza	Todos
Proliferación celular	14,5 DG	Cabeza	Todos
Expresión de TGF- β_3	14,5 DG	Cabeza	Grupos 1 y 2
Cultivos	13,5 DG	Procesos palatinos	Todos

5.2. Determinación de los niveles de folato en el hígado de hembras de ratón gestantes.

Para la determinación de los niveles de folato se han seguido las indicaciones de Horne y colaboradores (1981) y de Hyun y Tamura (2005).

Los hígados fueron rápidamente extraídos tras el sacrificio de la hembra, lavados en tampón fosfato salino (PBS) frío y guardados inmediatamente a -80°C . Esta determinación se compone de tres pasos fundamentales:

- A) Liofilización del tejido
- B) Procesado trienzimático
- C) Análisis microbiológico

A) Liofilización → Un fragmento de cada hígado, aproximadamente de 0,5 g, fue reducido a polvo con ayuda de un mortero. El tejido fue continuamente mantenido en nitrógeno líquido para conservar la consistencia adecuada y para evitar la degradación del folato. Este polvo de hígado fue introducido en un liofilizador Telstar (Telstar S.A., Barcelona, España), donde fue sometido al vacío a una temperatura de 45°C bajo cero durante toda la noche.

B) Procesado trienzimático → La mayoría del folato en un organismo aparece en forma de poliglutamatos y para su análisis cromatográfico es necesario que éstos sean hidrolizados a formas de mono- o diglutamatos. Esta hidrólisis es la que llevan a cabo las tres enzimas con las que fue tratado el tejido liofilizado: amilasa (α -amilase (EC3.2.1.1.) from *Bacillus sp.*, A6814; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU), proteasa (protease, type IV, from *Streptomyces griseus*, P5147; Sigma-Aldrich) y conjugasa (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, EEUU).

Para este procesado se mezcló 0,1 g de tejido liofilizado con Trizma hidrociorhídrico (T3253, Sigma-Aldrich) 0,026M a pH 7,4 y 1% de ascorbato sódico (A4034, Sigma-Aldrich). Todo ello, tras pasar por el vórtex, fue autoclavado durante 15 minutos a 120°C. La mezcla obtenida fue homogeneizada y mezclada con proteasa (2 mg/ml). Tras unos segundos en el vórtex, las muestras fueron introducidas en un baño a 37°C donde permanecieron 2 horas en agitación. Posteriormente fueron sometidas a un baño de 5 minutos a 100°C. Después fueron atemperadas y se añadió amilasa (20 mg/ml) y conjugasa (0,17%).

Para finalizar, tras un baño de 2 horas a 37°C con agitación, se ultracentrifugaron a 18×10^8 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante fue filtrado usando filtros con poros de 0,8 μm (Millipore Corp., Bedford, MA, UK) y este filtrado fue sometido a un análisis microbiológico.

C) Análisis microbiológico → Esta parte de la técnica se basa en la necesidad de folato en el medio para el crecimiento de la bacteria *Lactobacillus casei*; de hecho, a esta vitamina también se la denomina factor de fermentación de *L. casei*. Es decir, cuanto más folato aparezca en el medio de cultivo de esta bacteria mayor será el número de microorganismos.

Se mezcló un tampón fosfato potásico 0,1M, con un pH de 6,3, con el filtrado obtenido del procesado trienzimático. Además, a esta mezcla se añadió *L. casei* y se realizaron diluciones seriadas que fueron incubadas a 37°C toda la noche. Después fueron introducidas en un lector de placas multipocillo de 96 pocillos, el cual proporcionó una medida de la concentración de folato. Lo que realmente se mide es la turbidez del medio, que se traduce en crecimiento microbiano y que puede transformarse en

concentración de folato tomando como referencia la medida de unas muestras en las que la concentración de folato es conocida.

Este último paso fue repetido de 3 a 4 veces por cada hígado para asegurar la fiabilidad del valor obtenido, el cual es representado en microgramos de folato por gramo de tejido hepático ($\mu\text{g/g}$).

5.3. Determinación del genotipo de los animales empleados.

Los descendientes de los individuos heterocigotos para el gen $Tgf-\beta_3$ pueden ser homocigotos negativos (-/-), homocigotos positivos (+/+) o heterocigotos (+/-). Los experimentos realizados implican conocer el genotipo de los individuos, puesto que, en el caso de los embriones sólo usaremos homocigotos y en el caso de los adultos serán usados los heterocigotos.

Dichos genotipos fueron determinados mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa –PCR- (Saiki y cols., 1985; Mullis y Faloona, 1987). La PCR es un método de obtención *in vitro* de un número elevado de copias de un fragmento de ADN de interés, empleando una enzima ADN polimerasa termoestable. En nuestro caso, el tejido a partir del cual se extrae el ADN para el análisis del genotipo es un fragmento de la cola de los ratones adultos o bien cualquier fragmento de tejido del embrión, según el caso. El fragmento de cola de ratón adulto ha de tener como máximo 0,25 cm. de longitud para su correcta digestión.

Esta técnica consta de 3 pasos principales:

- Digestión del tejido
- Aislamiento del ADN
- PCR propiamente dicha

5.3.1. Digestión del tejido.

En este paso se requiere un tampón de digestión, compuesto por NaCl 3 M (3,3%), Trizma base (1%; T1503, Sigma-Aldrich) con pH 7,5, SDS (10%; 132363.1207, Panreac Química S.A.U., Barcelona, España) y EDTA (0,2%; E7889, Sigma-Aldrich), y un enzima para degradar el tejido y poder así separar posteriormente el ADN del resto

de componentes. El enzima empleado es la proteinasa K (P6556, Sigma-Aldrich) al 2,5% y a una concentración de 20 mg/ml. Las muestras a digerir pasaron entre 5 y 7 horas con esta mezcla digestiva a 55°C.

5.3.2. Aislamiento del ADN.

Una vez digerido el tejido:

1° Se añadieron 100 µl de NaCl 6M a cada muestra, se agitaron unos segundos y se centrifugaron 10 minutos a 13000 rpm.

2° Se tomaron 300 µl del sobrenadante tras la centrifugación y se depositaron en otro microtubo. Se añadieron 300 µl de isopropanol absoluto, se agitó unos segundos y se centrifugó 11 minutos a 13000 rpm.

3° Se retiró el sobrenadante y se lavó el *pellet* con etanol al 70%. Añadiendo 1 ml de etanol, se agitó unos segundos y se centrifugó 8 minutos a 13000 rpm.

4° Para finalizar, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el ADN aislado. Una vez seco, se añadieron 400 µl de agua destilada y se resuspendió, obteniendo así el ADN *stock*.

5.3.3. PCR.

Para amplificar el ADN aislado se realizó una mezcla con todos los componentes necesarios, que son: nucleótidos (dNTP), cebadores, un enzima ADN polimerasa y un tampón de reacción para el enzima.

En nuestro caso, fueron utilizados tres cebadores, 1 µM cada uno (Invitrogen Corporation, Life Technologies, California, EEUU), denominados *sense*, *antisense1* y *antisense2*, y la “DreamTaq Green” (*DreamTaq™ Green PCR Master Mix*, K1082; Fermentas International Inc., Canadá), mezcla comercial que contiene la polimerasa, el tampón y los dNTP necesarios.

La mezcla necesaria para la amplificación de cada muestra contenía un 42% de agua destilada, un 10% de cebador *sense*, un 10% de cebador *antisense1* o *antisense2*, un 28% de “DreamTaq Green” y un 10% de ADN *stock*.

Las mezclas de ADN *stock* junto con los productos de la amplificación fueron introducidas en un termociclador *LKB-Gene ATAC Controller* (Amersham Pharmacia

Biotech, GE Healthcare, **Connecticut, EE.UU.**) donde fueron ampliadas al ser sometidas al siguiente proceso:

- 1 ciclo de 3 min. a 95°C, para activar la polimerasa.
- 35 ciclos de 30 seg. a 95°C, para desnaturalizar el ADN.
 - 1 min. a 55°C, para la hibridación del cebador.
 - 3 min. a 72°C, para la generación de las copias.
- 1 ciclo de 5 min. a 72°C, para la renaturalización.

Tras finalizar los distintos ciclos en el termociclador, las muestras permanecieron como mínimo 30 min. a 4°C y después fueron sometidas a la electroforesis en un gel de agarosa.

Para la electroforesis no se requiere mezclar las muestras amplificadas con tampón de carga ya que la “DreamTaq Green” contiene un producto que concede a las muestras una densidad adecuada para poder prescindir de dicho tampón. La mezcla amplificada se deposita en un gel de agarosa compuesto por agarosa al 0,08% (20012; Biotools, Madrid, España), tampón tris-acetato (TAE) 1% y bromuro de etidio al 0,1% (E1510, Sigma-Aldrich). El gel fue sometido a una corriente de 90V durante 20 minutos y, posteriormente, las bandas obtenidas fueron visualizadas con luz ultravioleta en un transiluminador *ETX Vilber Loumart* (Vilber Loumart, Marne-la-Vallée Cedex, Francia).

Las bandas que pueden ser visualizadas se deben a los cebadores utilizados. El primer conjunto utilizado, *sense* y *antisense-1*, reconocen el inicio del gen de *Tgf-β₃* en el intrón 5 (5' TGGGA GTCAT GGCTG TAACT 3') y el final, en el intrón 6 (5' CACTC AACT GGCAA GTAGT 3'), respectivamente (fig. 5). Si el alelo que amplifican es silvestre, las bandas resultantes en la electroforesis presentan un tamaño de 400 pares de bases (pb). Si el alelo amplificado es mutante presentan un tamaño de 1300 pb porque posee un gen insertado, denominado *neo*, que concede resistencia a la neomicina (fig. 5, tabla 5). Por lo tanto, si una muestra sólo genera una banda de 400 pb ha de ser un individuo sin la mutación (*Tgf-β₃ +/+*). Por el contrario, la presencia de una única banda de 1300 pb significa que la muestra pertenece a un individuo homocigoto negativo (*Tgf-β₃ -/-*). Si se obtienen las dos bandas, la muestra pertenece a un individuo heterocigoto para la mutación (fig. 6, tabla 5).

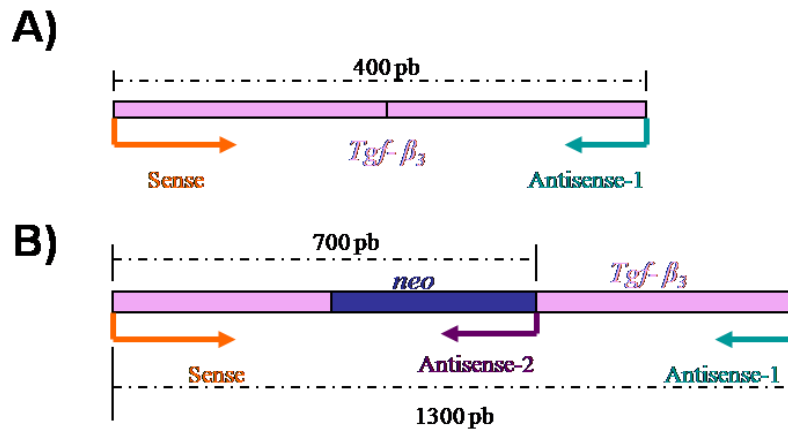


Figura 5. Representación de los genes amplificados. A) alelo del gen de *Tgf-β₃* silvestre, el cual tiene un tamaño de 400 pb; en naranja y verde aparecen representados los cebadores, *sense* y *antisense-1* respectivamente, utilizados en la amplificación. B) alelo del gen de *Tgf-β₃* con el inserto (en azul) del gen de resistencia a la neomicina (*neo*), que bloquea su expresión; tiene un tamaño de 1300 pb. En este caso, al emplear los cebadores *sense* (naranja) y *antisense-1* (verde) se obtienen fragmentos de 1300 pb y, al usar, *sense* y *antisense-2* (morados) los fragmentos son de 700 pb.

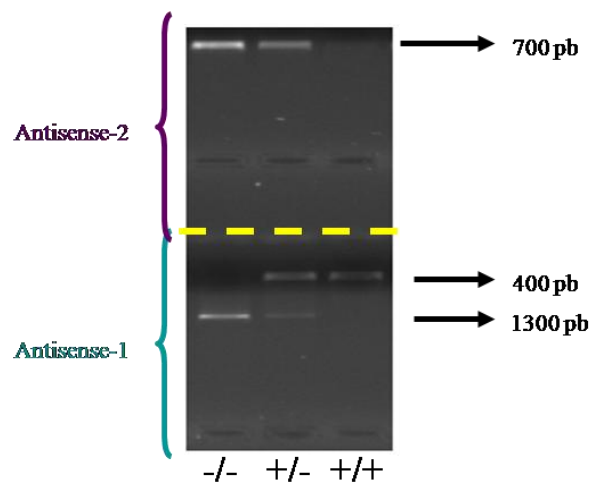


Figura 6. Gel de electroforesis donde se muestran las bandas correspondientes a cada genotipo. La línea fragmentada (---) divide el gel en 2 zonas, la zona superior es donde se ha revelado el producto de la amplificación obtenida tras utilizar el conjunto de cebadores *sense* y *antisense2* y la inferior donde se ha revelado el producto resultante de utilizar el otro conjunto de cebadores (*sense* y *antisense-1*). Las bandas que aparecen en la zona superior son las correspondientes a individuos homocigotos negativos (-/-) o heterocigotos (+/-), cuyo tamaño es de 700 pb. Las bandas de la zona inferior corresponden a un individuo -/- si únicamente aparece una banda de 1300 pb, a uno +/- si aparecen la banda de 400 pb y la de 1300 pb o a uno silvestre (+/+) si aparece sólo una de 400 pb.

El segundo conjunto de cebadores (*sense* y *antisense-2*) reconocen del gen de *Tgf-β₃* en el intrón 5 (5' TGGGA GTCAT GGCTG TAACT 3') y el final del gen insertado *neo* en pMC1neo (5' GATGC GATGT TTCGC TTGGT 3'). Este segundo conjunto fue utilizado para confirmar la presencia del gen *neo* (fig. 5). Si el inserto está presente en el alelo se amplificará el fragmento que comprende desde el inicio del gen de *Tgf-β₃* hasta el final del inserto *neo*, cuyo tamaño es de 700 pb. Se utiliza por si la banda de 1300 pb no se sintetiza eficazmente con el primer conjunto de cebadores debido a su gran tamaño (fig. 6).

Como no se pueden obtener adultos homocigotos negativos para el gen *Tgf-β₃*, al tratarse de una mutación letal en homocigosis, los únicos resultados posibles al genotipar un animal adulto son: heterocigotos para la mutación (+/-) o animales homocigotos para el gen (silvestres o +/+). En el embrión, además de los dos casos anteriores, pueden aparecer homocigotos para la mutación (-/-), (tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los posibles resultados y genotipos después de realizar la PCR.

Cebadores usados	Genotipos		
	+/+	+/-	-/-
Conjunto sense-antisense1	Banda de 400 pb	Bandas de 400 pb y 1300 pb	Banda de 1300 pb
Conjunto sense-antisense2	Ninguna banda	Banda de 700 pb	Banda de 700 pb
EMBRIONES			
ADULTOS			

5.4. Análisis de fetos de 17 días de gestación.

Los ratones C57 nacen tras 19 DG y, dado que en día 15 finaliza la palatogénesis, en día 17 de gestación ya presentan el paladar totalmente desarrollado y fusionado. Por tanto, es de suponer que las malformaciones que muestren en esta etapa permanecerían tras el nacimiento si éste llegara a ocurrir.

El análisis se llevó a cabo en individuos descendientes de hembras de los 4 grupos experimentales establecidos para esta investigación (tabla 3).

Dentro de cada grupo dietario se establecieron subgrupos según el número de semanas que las hembras permanecieron alimentándose con dichas dietas: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 semanas.

Tras el sacrificio de la hembra, se extrajeron los cuernos uterinos, la placenta fue retirada y los fetos lavados en PBS al 1%. Posteriormente, se decalcificaron en ácido nítrico al 5% diluido en formol tamponado al 10%, en el que permanecieron entre 24 horas, fijándose luego en formol tamponado durante unas 48 horas.

Tras la fijación, se analizaron y registraron todas las malformaciones macroscópicas visualizadas. Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital *Nikon Coolpix 995* (Nikon Corp., Tokio, Japón) acoplada a una lupa *Nikon SMZ800* (Nikon corp.).

Terminado el análisis macroscópico, las cabezas de los fetos se deshidrataron e incluyeron en parafina tras sucesivos baños en:

- Etanol al 70% durante 1 hora
- Etanol al 80% durante 1 hora
- Etanol al 90% durante 1 hora
- Etanol absoluto, 2 pases, durante 4 horas
- Butanol, 2 pases, durante 15 horas en total
- Parafina, 2 pases, durante 10 horas

Los bloques de parafina fueron seccionados coronalmente en un microtomo *Leica RM2265* (Leica Geosystems AG., St. Gallen, Suiza), obteniéndose secciones de 7 μ m de grosor, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Para ello, primero se desparafinaron y rehidrataron:

- Xilol durante 15 min. x 2 veces
- Etanol al 96% durante 5 min. x 2 veces
- Etanol al 70% durante 5 min. x 2 veces
- Agua destilada durante 5 min.

Después se realizó la tinción y el montaje:

Hematoxilina durante 7 min.

Lavado en agua durante 10 min.

Eosina durante 30 seg.

Lavado en agua durante 10 min.

Etanol al 96% durante 5 min. x 2 veces

Etanol al 100% durante 5 min. x 2 veces

Xilol durante 5 min. X 2 veces

Montaje con medio *Eukitt* (*Eukitt mounting médium*; Electro Microscopy Sciences, Hatfield, Reino Unido).

Tras el montaje de las secciones teñidas, éstas fueron analizadas microscópicamente tras ser fotografiadas con una cámara *Leica DFC320* (Leica Geosystems AG) acoplada a un microscopio *Leica DMR*.

5.5. Análisis de la proliferación celular en paladares embrionarios.

Los embriones empleados, pertenecientes a los 4 grupos experimentales planteados (tabla 3), se extrajeron en 14,5 DG. Para el análisis de la proliferación celular utilizamos la 5-Bromo-2'-deoxy-uridina (BrdU), un nucleótido análogo de la timidina capaz de insertarse en el ADN que se está duplicando en la fase S del ciclo celular. Este nucleótido puede ser marcado con un anticuerpo primario y éste, a su vez, detectarse con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina. Ésta puede ser revelada con 4-Nitro blue tetrazolium chloride (NBT) y 5-Bromo-4-clloro-3-indolyl-phosphate (BCIP).

Una hora antes del sacrificio se inyectaron intraperitonealmente en las hembras preñadas 2 ml de BrdU por cada 100 g de peso, presente en el kit comercial “*5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II*” (11.299.964.001; Roche, F. Hoffmann-La Roche, Ltd., Basel, Suiza).

Una vez sacrificadas las hembras gestantes, se extrajeron los embriones, como se ha descrito en el apartado 5.4. Los embriones fueron decapitados y sus cabezas fueron

fijadas en fijador de Carnoy, fijador compuesto por ácido acético glacial, cloroformo y etanol absoluto (en una proporción 1:3:6), durante 2 horas y media. Luego se realizaron diversos lavados y la inclusión en parafina, siguiendo la siguiente secuencia:

Etanol al 100% durante 30 min. x 2 veces

Butanol durante 45 min. x 2 veces

Parafina, 2 pases, durante 10 horas

Las muestras en parafina fueron cortadas coronalmente en secciones de 5 μm de grosor, desparafinadas y procesadas inmunohistoquímicamente según el protocolo incluido en el kit comercial, el cual incluye los anticuerpos, el NBT y el BCIP necesarios. Tras el revelado de las secciones podemos observar las células en fase S teñidas de morado (fig. 7 A).

Las secciones fueron fotografiadas y examinadas con el analizador de imágenes *Metamorph* (version 7.01, Universal Imaging Corp., Sunnyvale, CA, EE.UU.), cuyo programa realiza un recuento de las células teñidas presentes en cada área previamente delimitada (fig. 7 B). Para realizar la delimitación se trazó manualmente en la imagen captada por el analizador *Metamorph* una línea correspondiente a 300 μm de longitud en el eje coronal del proceso palatino, comenzando en la lámina basal del EBM (línea a-b, fig.7 C), y después se situó otra línea perpendicular (línea c-d, fig. 7 C) a la anterior desde la región nasal del proceso palatino hasta la región oral. El área del mesénquima que quedaba delimitada lateralmente por esta línea (c-d) era la utilizada para la medida. Para determinar el área del EBM, se obtuvo la bisectriz de los 2 ángulos entre las líneas a-b y c-d (líneas b-e y b-f). El área del EBM entre las dos bisectrices fue la única considerada para la medición (fig.7 C). Una vez determinadas las áreas, el observador fijaba el umbral de intensidad de color de las células BrdU positivas y el analizador de imágenes contabilizaba el número de puntos que presentaban el rango de color seleccionado.

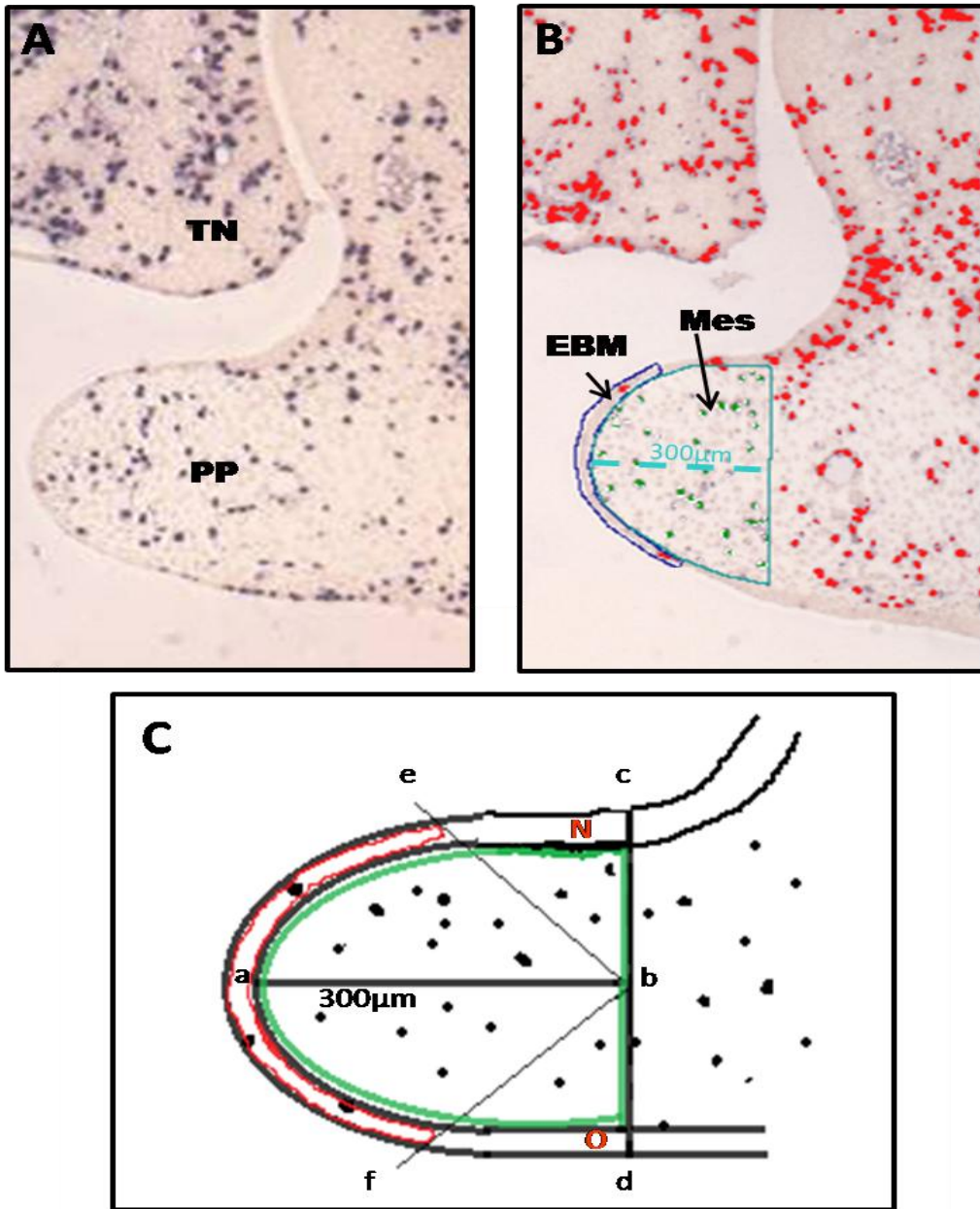


Figura 7. Medida de la proliferación celular en el paladar. Sección coronal de la región anterior del paladar de un embrión de 14,5 DG procesada mediante la técnica inmunohistoquímica en la que se emplea BrdU. A) Células proliferantes en fase S teñidas de morado. B) Imagen captada por el analizador de imágenes “Metamorph” y con las áreas que corresponden al EBM y al mesénquima que se medirán delimitadas en azul. C) Representación de la determinación de las áreas que se miden en un proceso palatino. Primero se traza una línea de 300µm desde la lámina basal del EBM en el eje coronal (a-b) y otra, perpendicular a ésta, desde la región nasal (N) del proceso palatino (c-d) hasta la región oral (O). Esta línea perpendicular (c-d) limita lateralmente el área de mesénquima que será medido (en verde). Para determinar el área del EBM, se obtuvo la bisectriz de los 2 ángulos que se forman entre las líneas a-b y c-d (líneas b-e y b-f). El área del EBM entre las 2 bisectrices (en rojo) fue la considerada para la medición. EBM: epitelio del borde medial; Mes: mesénquima; PP: proceso palatino; TN: tabique nasal.

Las medidas para cada grupo fueron los valores medios del número de células BrdU positivas contabilizadas en todas las secciones del grupo. Se realizó distinción entre la zona anterior del paladar, la zona media y la posterior (fig. 8), analizando por separado la media de las células BrdU positivas contabilizadas en cada región. Las secciones control y las de cada condición experimental fueron medidas en la misma sesión para evitar diferencias en los parámetros basales.

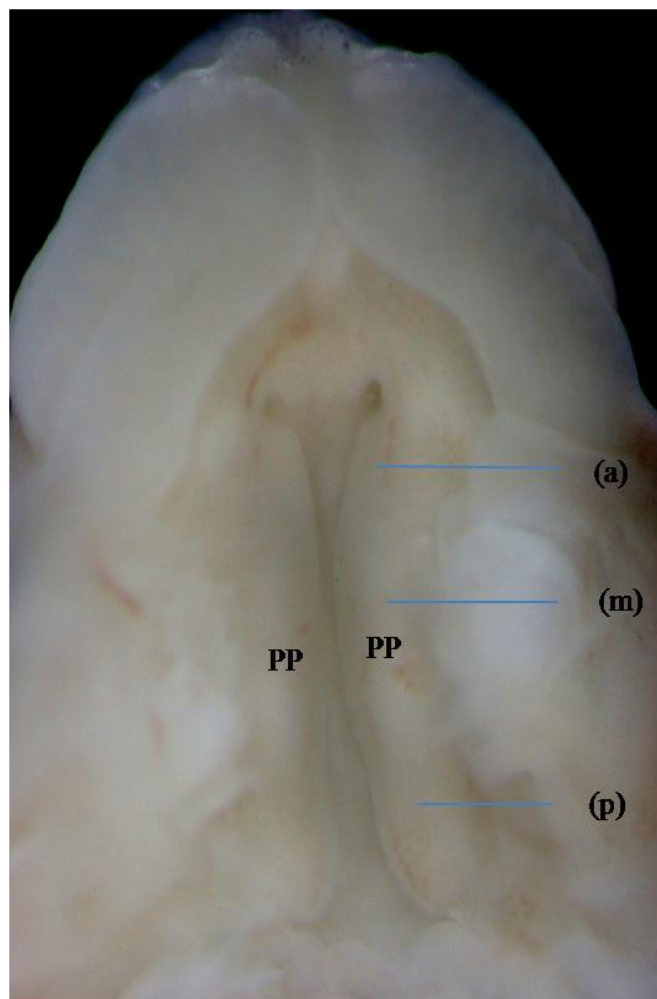


Figura 8. Visión intraoral de un embrión de 14,5 DG. Al haber retirado la mandíbula se observan ambos procesos palatinos (PP) cerca del momento de contacto de sus epitelios del borde medial. Las líneas indican la altura anterior (a), media (m) y posterior (p) que fueron consideradas para determinar a qué zona del paladar correspondían las secciones analizadas.

5.6. Hibridación *in situ* para la detección de la expresión de *Tgf-β₃* en el paladar.

El objetivo de esta técnica es detectar si en un determinado tejido se expresa un gen concreto. Todo gen que se expresa lo hace en forma de ARNm y este ácido nucleico monocatenario será el que, tras sufrir el proceso de traducción, genere la proteína correspondiente. Si provocamos el contacto del tejido a estudiar con un ARN complementario al ARNm que nos interesa, ambos pueden unirse, es decir, pueden hibridar y formar una doble cadena de ARN. Éste ARN creado contiene digoxigenina unida a ciertos nucleótidos que lo forman. Al añadir un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con un marcador enzimático y llevar a cabo un revelado adecuado se obtiene una coloración del tejido marcado, lo que revela la presencia del ARNm que buscamos. El ARN que utilizamos en la técnica de hibridación *in situ* (HIS) se denomina “sonda”.

5.6.1. Elaboración de la sonda de hibridación.

Un plásmido es material genético no cromosómico que aparece en procariotas y algunos eucariotas como las levaduras. El plásmido que usamos fue “BlueScript”, el cual presenta un *polilinker* en el que se puede introducir un fragmento de ADN denominado ADN clonado (ADNc) obtenido a partir de ARN con una retrotranscriptasa (fig. 9).

Este plásmido con el fragmento de ADNc insertado fue introducido en bacterias competentes, es decir, con la membrana alterada para que el plásmido pueda pasar. Para ello se sometió a las bacterias a cambios drásticos de temperatura (fig. 10).

Una vez dentro, aunque el ADN plasmídico no se inserta en el ADN cromosómico de la bacteria, se replicará a la vez que ella. Así se obtienen múltiples copias del mismo plásmido y, por tanto, del ADNc a emplear.

Por último, se han de extraer o aislar los plásmidos de las bacterias, cortar el ADN circular y transformarlo en un fragmento lineal que se convertirá en ARNm.

Pasos necesarios para obtener la sonda:

1º Transformación → Se sometieron las bacterias a ciclos de frío y calor: 4°C durante 30 minutos, 42°C durante 1 minuto y medio, a 4°C durante 1 minuto y 1 hora a 37°C. Esto sirve para desnaturalizar la membrana bacteriana lo suficiente como para que los

plásmidos penetren en el citoplasma pero sin destruir la bacteria. Las bacterias empleadas fueron *Escherichia coli* de la cepa DH5 α (*MAX Efficiency DH5 α Competent Cells*, 18258-012; Invitrogen).

2° Crecimiento → Las bacterias transformadas fueron sembradas en medio Luria-Bertoni: 0,5% de NaCl, 1% de extracto de levadura (212750; B&D, New Jersey, EE.UU.) y 1% de medio de cultivo “Bacto Tryptone” (211705; B&D). Después fueron sometidas a condiciones idóneas para su multiplicación (37°C en agitación toda la noche). El plásmido empleado en estos experimentos fue creado por Yang Chai (Center for Craniofacial Molecular Biology, School of Dentistry, University of Southern California, Los Angeles, California, USA) y nos fue cedido por Barbara D. Abbott (Reproductive Toxicology Division, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, North Carolina, USA.). El plásmido se compone de un fragmento de 110 pb del gen *Tgf- β ₃* subclonado en el plásmido “BlueScript”, además posee un inserto que le confiere resistencia a la ampicilina.

3° Aislamiento → Se lisaron las bacterias para extraer los plásmidos replicados de ellas y aislarlos, es decir, separar el ADN cromosómico de la bacteria del plasmídico. Para ello se empleó el *kit* comercial “*High Pure Plasmid Isolation Kit*” (1.754.777; Roche).

4° Linealización → El ADN plasmídico aislado es circular y se requiere que sea lineal, para ello se utilizó un enzima de restricción capaz de cortar el plásmido en los puntos de inserción del fragmento del gen de *Tgf- β ₃* (fig. 9). El enzima usado fue “EcoRI” (R0101S; Biolabs Inc., New England, EE.UU.).

5° Transcripción → Del ADN plasmídico linealizado se obtuvo un ARN complementario al ARNm expresado por el gen de *Tgf- β ₃* (sonda). Para la transcripción se empleó la ARN polimerasa “T7” (10.881.767.001; Roche), nucleótidos para generar la sonda (*Ribonucleoside triphosphate set*, 11.277.057.001; Roche) y digoxigenina (*Digoxigenin-11-UTP*, 11.209.256.910; Roche), que se une a los nucleótidos uracilo trifosfato (UTP), (fig. 11).

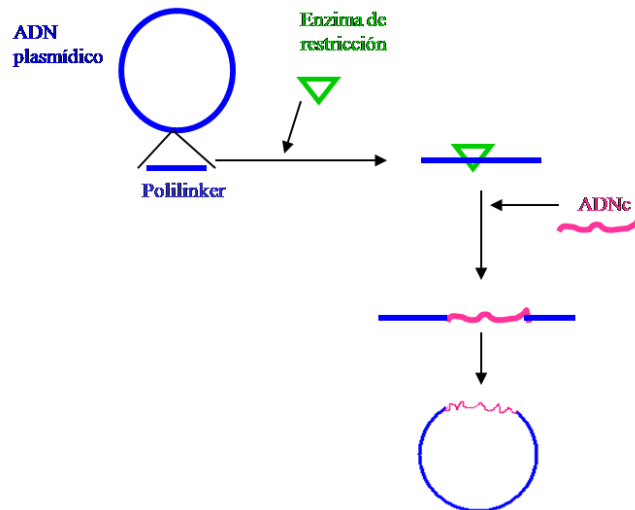


Figura 9. Inserción de ADN en el plásmido. Representación de la introducción de un fragmento de ADN, el ADN clonado (rosa), del gen del cual se obtendrá una sonda de ARN, en un ADN plasmídico (azul), para lo cual se requiere una enzima de restricción (verde) que permita la incorporación del ADNc empleado.

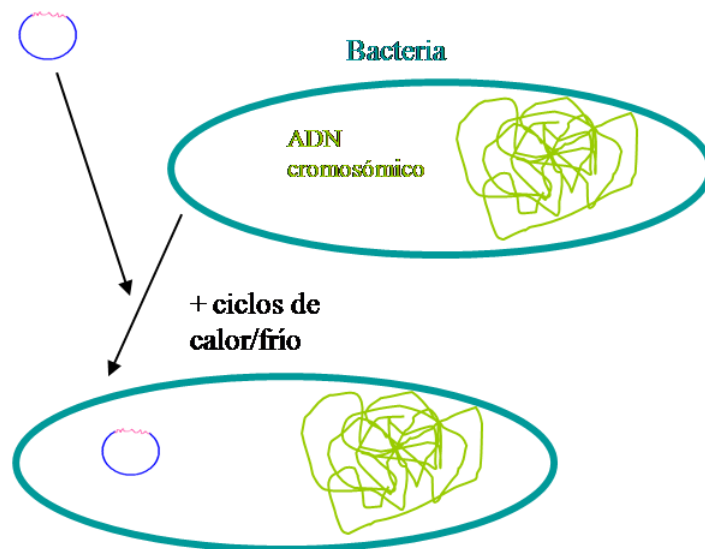


Figura 10. Transformación bacteriana. El ADN plasmídico con el inserto de ADNc (azul y rosa) se introduce a través de la membrana bacteriana (turquesa) cuando ésta es permeabilizada mediante cambios de temperatura. Una vez en el interior de la bacteria, el ADN plasmídico no se inserta en el ADN bacteriano (verde) pero se replican al mismo tiempo.

5.6.2. Preparación del tejido antes de la hibridación *in situ*.

La HIS se llevó a cabo con sonda de $Tgf-\beta_3$ en cabezas de embriones de ratón de 14,5 DG, hijos de hembras del grupo 1 y del grupo 2 (tabla 3). Para este experimento, las hembras del grupo 2 habían permanecido 2 u 8 semanas sometidas a la dieta CAF. Elegimos esas semanas porque fue cuando encontramos la primera FP anterior y la primera fisura completa, respectivamente.

Los embriones fueron extraídos, como ha sido descrito en el apartado 5.4., y lavados en PBS frío con dietilpirocarbonato -DEPC- (D5758; Sigma-Aldrich) al 0,03%. Las cabezas se separaron de los cuerpos y fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS-DEPC frío toda la noche. La extracción y toda la manipulación se realizó en recipientes situados sobre hielo para evitar la acción de las ARNasas, enzimas capaces de degradar el ARN presente en el tejido manipulado, además, todo el material empleado fue tratado para liberarlo de ARNasas. Para ello, el instrumental de disección es lavado, aclarado con agua milliQ con DEPC al 0,03%, rociado con etanol al 70%, envuelto en papel de aluminio y sometido a 220°C durante 120 minutos.

Tras la fijación de las cabezas, la mandíbula y la calota se retiraron para facilitar la penetración de la sonda en el tejido diana, el paladar. Después se inició la prehibridación, proceso que prepara el tejido para la recepción del ARNm que hemos generado (ver apartado 5.6.1):

PBT (PBS-DEPC con tritón al 0'1%), 2 lavados de 5 minutos

Metanol al 25% en PBT durante 15 minutos

Metanol al 50% en PBT durante 15 minutos

Metanol al 75% en PBT durante 15 minutos

Metanol absoluto, 2 lavados de 15 minutos

Metanol al 75% en PBT durante 15 minutos

Metanol al 50% en PBT durante 15 minutos

Metanol al 25% en PBT durante 15 minutos

PBT, 2 lavados de 5 minutos

Peróxido de hidrógeno diluido al 3,33% en PBT durante 15 minutos

PBT, 3 lavados de 5 minutos

Proteinasa K (10 mg/ml) diluida en PBT al 0,1% durante 15 minutos

PBT, 2 lavados de 5 minutos

PFA al 4% en PBS-DEPC, mínimo 20 minutos

PBT, 2 lavados de 5 minutos

Todos estos lavados se realizaron a 4°C y en un agitador orbital. Las soluciones empleadas permanecieron continuamente a 4°C.

Por último, se realizaron dos lavados a 58°C con solución de hibridación, el primero de 7 minutos y el segundo toda la noche. Estos dos últimos lavados se realizaron en horno de hibridación (*Shake`n` Stack*; Hybaid, Middlesex, UK) con agitación bascular. La solución de hibridación está compuesta por:

-50% de formamida (47671; Fluka, Sigma-Aldrich Inc.)

-25% de SSC 20x (17,53% de cloruro sódico y 8,82% de citrato sódico)

-0,1% de tritón (T8787; Sigma-Aldrich)

-0,1% de heparina (H3149; Sigma-Aldrich)

-10% de tRNA (*Ribonucleic acid from torula yeast, type VI*, R6625; Sigma-Aldrich)

-1% de EDTA (E7889; Sigma-Aldrich)

-1% de CHAPS (C3023; Sigma-Aldrich)

-0,5% de agente bloqueador (1.096.176; Roche)

Tras este procesado, el material queda prehibridado y es conservado a -20°C hasta el momento de la hibridación.

5.6.3. Hibridación de la sonda con el ARNm tisular.

Tras la prehibridación, al tejido le fue añadida la sonda junto con solución de hibridación y fue incubado a 58°C en agitación bascular durante 24 horas.

Tras la incubación, se eliminó la sonda sobrante. Los lavados se realizaron a 58°C con el tampón SSC diluido y mezclado con un 0,1% de CHAPS:

SSC 2x, 2 lavados de 5 minutos

SSC 2x, 6 lavados de 20 minutos

SSC 0'2x, 3 lavados de 30 minutos

Después se practicaron 3 lavados a temperatura ambiente con tampón KTBT: Trizma hidroclorehídrico (T3253; Sigma-Aldrich) 1M y pH 7,5 al 5%, Cloruro sódico al 5%, Cloruro potásico al 1% y tritón al 0,1%.

Tras esos lavados se mantuvieron las muestras 2 horas con solución de bloqueo: KTBT y FBS (*Foetal Bovine Serum*, 10106-151; Invitrogen) en una proporción 8:2 y un 0,7% de agente bloqueador (1.096.176; Roche). Por último, se añadió un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con el marcador enzimático fosfatasa alcalina (*Anti-Digoxigenin-AP*, 11.093.274.910; Roche) mezclado con la solución de bloqueo en una proporción 1:1000 (fig. 11). El tejido permaneció toda la noche a 4°C y en agitación orbital para la incubación.

5.6.4. Revelado de la sonda hibridada.

Se realizó el revelado de las muestras hibridadas con NBT (*4-Nitro blue tetrazolium chloride*, 11 087.479.001; Roche) y BCIP (*5-Bromo-4-clhoro-3-indolyl-phosphate*, 10.760.994.001; Roche), compuestos que reaccionan con la fosfatasa alcalina dando lugar a una señal cromática morada que indica la presencia del ARNm buscado (fig. 12).

Tras lavar el exceso de NBT/BCIP, las muestras fueron fotografiadas con una cámara digital *Nikon Coolpix 995* incorporada a una lupa *Nikon SMZ800*; estas fotografías reflejaron de forma macroscópica la señal cromática obtenida en la hibridación.

Las cabezas hibridadas fueron incluidas en gelatina: Gelatina (142060; Panreac) al 0,49% en PBS con BSA (*Bovine Serum Albumin*, A8022; Sigma-Aldrich) al 30%, Sucrosa al 20% y glutaraldehído al 6,98%. Los bloques de gelatina fueron cortados coronalmente en un vibratomo *Leica VT1000M* en secciones de 50 µm de grosor y almacenados en PBS y glicerol al 50% junto con 0,02% de azida sódica.

Las secciones obtenidas fueron fotografiadas con una cámara *Leica DFC320* acoplada a un microscopio *Leica DMR*, que posee un prisma Nomarski.

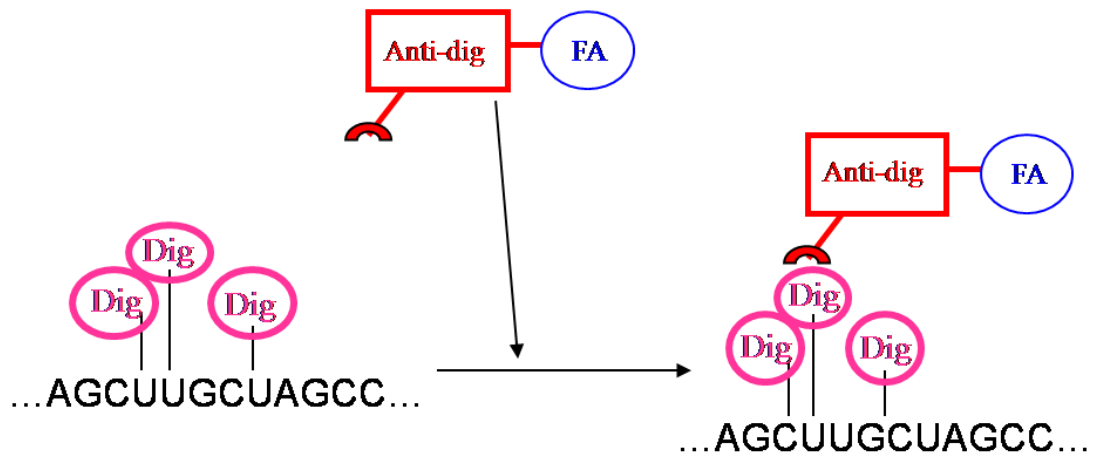


Figura 11. Anti-digoxigenina. Sonda representada por una serie de nucleótidos cuyos nucleótidos uracilo (U) presentan digoxigenina ligada (dig), y el anticuerpo anti-digoxigenina (anti-dig) unido a la fosfatasa alcalina (FA) que ante la presencia de NBT y BCIP expresará una señal cromática.



Figura 12. HIS. Visión intraoral del paladar de un embrión de 14,5 DG de un ratón C57 en la que se observa que los procesos palatinos se han adherido en casi toda su longitud. La coloración oscura señalada por la flecha es la expresión de TGF- β_3 en la zona del EBM tras la HIS.

5.7. Cultivos organotípicos de procesos palatinos.

5.7.1. Realización de los cultivos.

Las ratonas preñadas fueron sacrificadas en 13,5 DG. El instrumental con el que se realizó la laparotomía y posterior extracción de los procesos palatinos fue rociado con etanol al 70%, envuelto en papel de aluminio y mantenido a 120°C durante dos horas.

El sacrificio del animal tuvo lugar siempre lejos de la cabina de flujo laminar. Esta cabina (*NU-425-300*; Nuair Inc., Plymouth, MN, EE.UU.), así como el resto de los instrumentos que introdujimos en ella (lupa microscópica, epiiluminador, guantes, etc.) se limpiaron con etanol de 70°. Todo aquel material, desechable o no, que permita el autoclave se sometió a este método de esterilización; el resto es esterilizado por la casa comercial que lo distribuye.

Para realizar este tipo de cultivos, los embriones tras ser extraídos del útero y separados de la placenta, fueron lavados en medio de cultivo. Se separó la cabeza del cuerpo (fig. 13 A) y se retiraron la mandíbula y lengua, quedando los procesos palatinos a la vista (fig. 13 B). En este momento del desarrollo se encuentran aún separados entre sí en el techo de la cavidad bucal. Colocada la cabeza bien sujeta, se realizaron dos incisiones oblicuas con tijeras microquirúrgicas en la parte anterior de la cara que permitían liberar el extremo anterior de los procesos palatinos. Inmediatamente, se efectuaron dos incisiones longitudinales en sentido anteroposterior que eliminaban los restos de región geniana que persistían después de la extracción de la mandíbula y la lengua. De esta manera, los procesos palatinos quedan en primer plano. A continuación, se efectúa una incisión que rodea cada proceso palatino tendente a su separación del resto de la cabeza (fig. 13 B). Una vez aislados los procesos palatinos, izquierdo y derecho (fig. 13 C), se mantuvieron durante el periodo de extracción del resto de los procesos en pocillos que contenían medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, D2429; Sigma-Aldrich) + 1% de ácido ascórbico (A4034; Sigma-Aldrich) + 2% de antibiótico (*Penicillin-Streptomycin solution stabilised*, P4333; Sigma-Aldrich). El medio de cultivo empleado carece de AF.

Una vez extraídos todos los procesos, se situaron sobre papel de filtro (AABP02500; Millipore), previamente esterilizado, de 2x2 mm. En cada papel se colocó un proceso palatino (fig. 13 D), si posteriormente iban a utilizarse para medir la proliferación celular. Si eran destinados a la medida de la muerte celular o la adhesión y fusión de los procesos palatinos, se colocó el proceso derecho y el izquierdo de cada embrión enfrentados, de manera que sus epitelios del borde medial entren en contacto (fig. 13 E). Se trata de un proceso minucioso ya que los paladares han de quedar justamente uno enfrentado a otro, sin superponerse y con la orientación adecuada; para ello, se colocó la pareja de procesos palatinos dentro de una placa con medio estéril y se situaban sobre el filtro inclinados, de manera que estuvieran apoyados sobre el EBM del contrario y por otra parte, sobre el epitelio nasal periférico. Esto permite que, al sacarlos del medio líquido, debido al cambio en la tensión superficial (pasan de medio líquido a medio gaseoso), queden perfectamente enfrentados, tal y como quedarían para formar la costura epitelial tras el contacto de los procesos *in vivo*.

Una vez que todos los procesos habían sido situados sobre los papeles de filtro se colocaron sobre una rejilla triangular de metal. Ésta fue colocada en una placa de cultivo de 60x15mm (353037; Falcon, BD Biosciences, California, EE.UU.), con medio de cultivo en su cavidad interna y un disco de papel de filtro esterilizado y humedecido con agua destilada esterilizada situado en la cavidad externa (fig. 13 F).

En el caso de los cultivos destinados a observar la posible reversión con TGF- β_3 (243-B3, R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU), se añadió al medio de cultivo esta proteína en una concentración fisiológica (10 ng/ml). Y en el caso de los cultivos destinados a observar los efectos del aporte de AF, se añadió AF (*Folinic acid calcium*, F8259; Sigma-Aldrich) al medio en una concentración fisiológica (0,004 g/l).

La placa con los cultivos y el medio correspondiente eran introducidos en el incubador, permaneciendo a 37°C y con un 5% de CO₂ en el ambiente durante 12, 18 ó 36 horas, según la finalidad del experimento correspondiente (tabla 6).

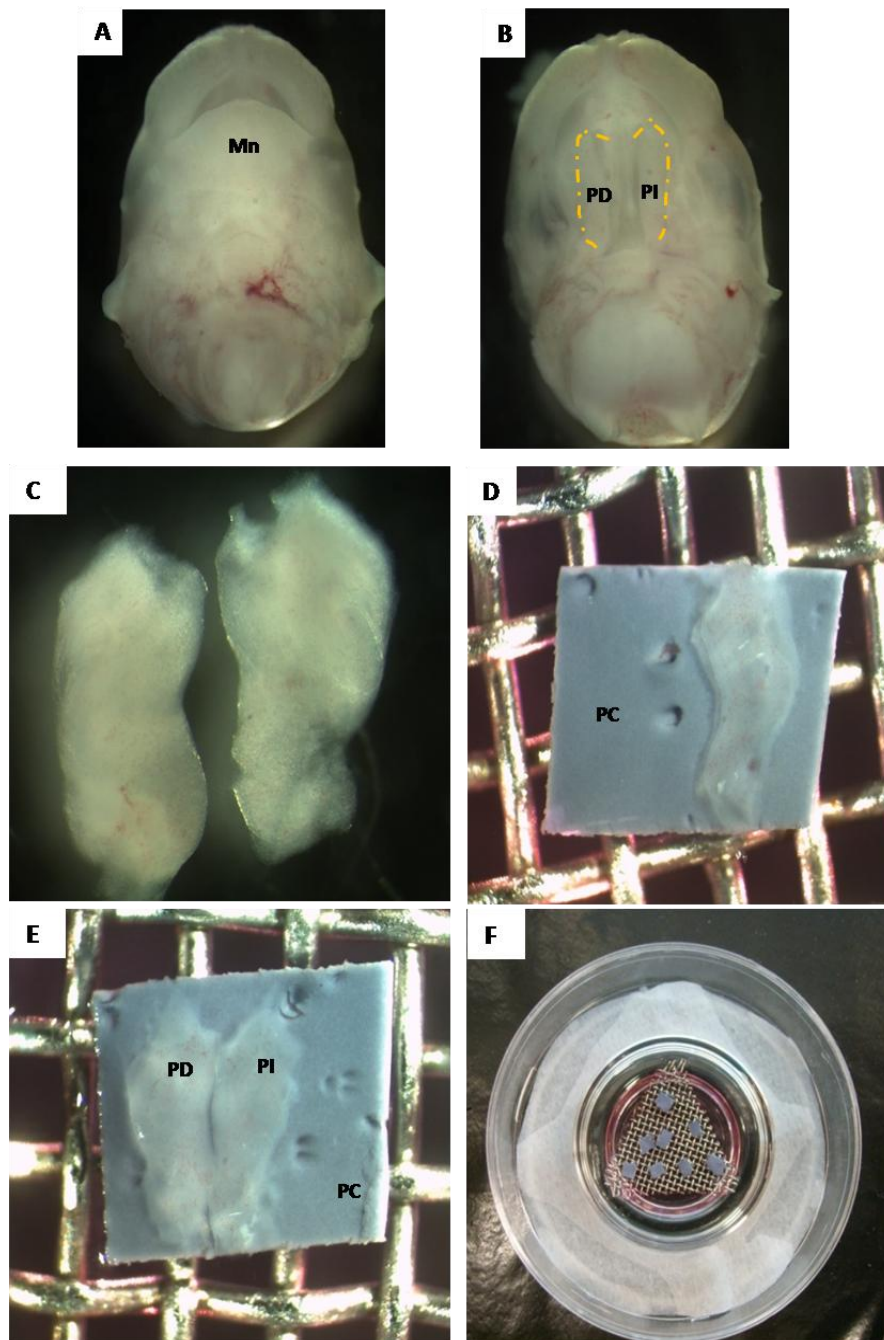


Figura 13. Elaboración de los cultivos. Visión intraoral de la cabeza de un embrión de 13,5 DG con la mandíbula (A) y una vez ha sido retirada ésta (B). En (B) líneas naranjas indican las incisiones que se efectúan alrededor de cada proceso palatino para realizar su extracción. C) Procesos palatinos extraídos. Los procesos se cultivan de forma individual para la medida de la proliferación celular (D) y de forma enfrentada (E), recreando el estado *in vivo*, para la medida de la adhesión, fusión y muerte celular. F) Placa de cultivo con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril y rejilla central con los cultivos situados sobre ella y medio de cultivo debajo. Mn: mandíbula; PC: papel de cultivo; PD: proceso palatino derecho; PI: proceso palatino izquierdo.

Tabla 6. Resumen de los diferentes cultivos realizados.

HEMBRAS (dieta y genotipo)	GENOTIPO EMBRIONES	MEDIO DE CULTIVO	HORAS DE CULTIVO	MEDIDA
Dieta control +/+	+/+	DMEM	36 h	Adhesión/Fusión
			18h	Muerte celular
			12h	Proliferación
Dieta CAF durante 2 semanas +/+	+/+	DMEM	36 h	Adhesión/Fusión
			18h	Muerte celular
			12h	Proliferación
		DMEM + TGF-β3	36 h	Adhesión/Fusión
			18h	Muerte celular
			12h	Proliferación
Dieta control +/-	-/-	DMEM + AF 1x	36 h	Adhesión/Fusión
		DMEM + AF 20x	36 h	Adhesión/Fusión
Dieta con SAF +/-	-/-	DMEM + AF1x	36 h	Adhesión/Fusión

5.7.2. Experimentos para los que se realizaron cultivos.

A) Con procesos palatinos de embriones cuyas madres pertenecían al **grupo 1** y al **grupo 2** que habían sido sometidas 2 semanas a la dieta CAF, se realizaron cultivos para analizar la adhesión, la fusión, la muerte y la proliferación celular. El medio de cultivo empleado fue DMEM. Estos cultivos sirvieron para observar si la dieta CAF había afectado a la palatogénesis (tabla 6).

En otros cultivos de procesos palatinos de embriones del **grupo 2**, cuyas hembras permanecieron 2 semanas con la dieta CAF, se añadió TGF-β₃ al medio de cultivo, a fin de ver si esta proteína lograba revertir los efectos causados por el déficit de AF (tabla 6).

B) Con procesos de embriones homocigotos negativos hijos de las hembras del **grupo 3** y del **grupo 4** (tabla 3) se realizaron cultivos en medio de cultivo al que se añadió una cantidad fisiológica de AF (0,004 g/l) para medir la adhesión y la fusión (tabla 6).

Además se usaron embriones homocigotos negativos del **grupo 3** (tabla 3) para realizar cultivos en un medio con SAF (*Folinic acid calcium*, F8259; Sigma-Aldrich). El suplemento fue de 0,08 g/l, 20 veces superior a los niveles fisiológicos. Con este experimento pretendíamos recrear *in vitro* la situación del grupo sometido al suplemento dietético de AF (tabla 6).

5.7.3. Procesamiento de los cultivos.

A) Los cultivos destinados a medir la **adhesión** y la **fusión** de los procesos palatinos fueron cultivados **36 horas** (tabla 6) y posteriormente fijados en PFA al 4% en PBS durante 1 hora y 30 minutos.

Tras ser fijados, se deshidrataron e incluyeron en parafina:

Etanol al 50% durante 20 minutos

Etanol al 70% durante 20 minutos

Etanol al 80% durante 20 minutos

Etanol al 90% durante 20 minutos min.

Etanol absoluto, 2 pases de 30 minutos

Butanol, 2 pases de 45 minutos

Parafina, 2 pases de 2 horas

Los bloques de parafina fueron cortados coronalmente a 7 μ m y se aplicó la técnica de tinción con Hematoxilina-Eosina (apartado 5.4). Para medir la longitud de la zona adherida y fusionada de los EBM opuestos en los paladares cultivados se fotografiaron una de cada diez secciones tomadas de las cien secciones centrales de cada cultivo, observadas a 20 aumentos.

Hablamos de “adhesión” de los procesos palatinos cuando el EBM de ambos procesos palatinos ha contactado y formado la CEM (fig. 14). Utilizamos el término “fusión” cuando la CEM ha desaparecido y sólo se observa tejido mesenquimático en la región donde se encontraba la CEM (fig. 14). A la hora de contabilizar la zona adherida tenemos en cuenta la fusionada, pues para que haya fusión antes ha debido ocurrir la adhesión (fig. 14).

Las mediciones de longitud de zona adherida y fusionada fueron realizadas con el programa IM50 que procesa las imágenes obtenidas con una cámara *Leica DFC320* acoplada a un microscopio *Leica DMR*. Foto a foto, se midieron, por un lado, las zonas adheridas y, por otro, las zonas fusionadas. Por cada cultivo se calculó la longitud media de EBM adherido -sumando las medidas de todas las zonas adheridas y fusionadas y dividiendo por el número de secciones fotografiadas consideradas- y la longitud media de EBM fusionado -de la misma forma, pero sumando sólo las medidas de todas las zonas fusionadas de cada cultivo y dividiendo por el mismo número de secciones escogidas-. Finalmente, se halló la media aritmética (\pm el error estándar) con las longitudes obtenidas en micras para todos los cultivos de cada grupo experimental.

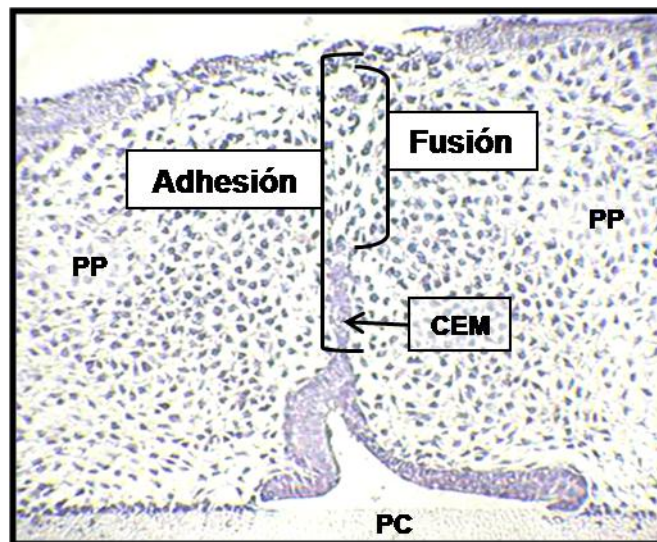


Figura 14. Adhesión y fusión. Sección de $7\mu\text{m}$ de grosor de un cultivo de procesos palatinos teñida con hematoxilina-eosina. Se observa la diferencia entre los términos “fusión”, cuando el tejido epitelial que formaba la CEM ha desaparecido completamente quedando sólo células mesenquimáticas, y “adhesión”, cuando los epitelios de ambos procesos han contactado formando la CEM. La zona de “fusión” se incluye dentro de la de “adhesión” porque la CEM se ha de formar primero para luego desaparecer quedando el lugar que ocupaba poblado de células mesenquimáticas. CEM: costura epitelial medial; PC: papel de cultivo; PP: proceso palatino.

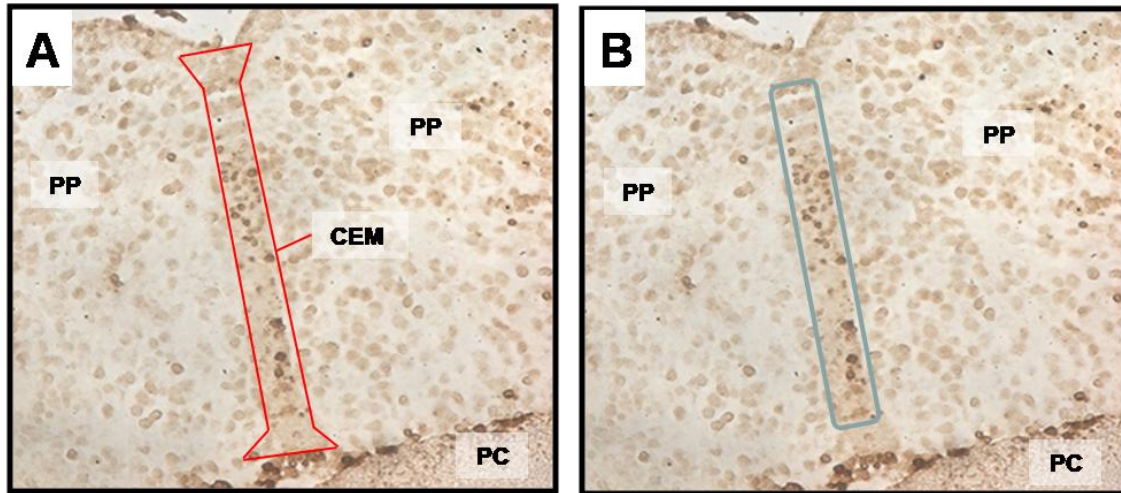


Figura 15. Muerte celular. Sección de 5µm de grosor de un cultivo de procesos palatinos en el que se ha realizado la técnica TUNEL. Las células con el marcaje más intenso son las consideradas células apoptóticas. En (A) la zona señalada por las líneas rojas corresponde a la CEM y a los triángulos epiteliales de los extremos de la CEM. En (B) el recuadro azul indica la zona de la CEM utilizada para medir la muerte celular. CEM: costura epitelial medial; PC: papel de cultivo; PP: Proceso palatino.

B) Cuando los cultivos fueron destinados a medir la **muerte celular**, los paladares embrionarios fueron cultivados **18 horas** (tabla 6) y posteriormente fijados en PFA al 4% en PBS durante 1 hora y 30 minutos. Tras la fijación, fueron deshidratados e incluidos en parafina de igual manera que el grupo de los cultivados durante 36 horas (apartado 5.7.3.A).

En este caso, las secciones obtenidas fueron de 5 µm de grosor y sobre ellas se efectuó la técnica TUNEL (nombre que proviene de “Tdt-mediated dUTP Nick End Labelling”) para detección de muerte celular. Esta técnica está basada en el marcaje de extremos de hebras de ADN mediante la acción de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal, que incorpora dNTP conjugados con biotina. Se utilizó el *kit* comercial “*In situ cell death detection Kit-POD*” (11.684.817.910; Roche), de acuerdo con las instrucciones que en él se especifican. Los controles positivos se consiguieron tratando secciones con el enzima DNAasa-I.

El método de TUNEL se basa en la característica degradación del ADN durante la etapa inicial de la muerte celular. Este proceso bioquímico es llevado a cabo por endonucleasas y es irreversible. La rotura del ADN se produce en las dos hebras (dando lugar a fragmentos mono- u oligonucleosomales) o bien puede ocurrir que tan solo se rompa una de ellas. Así se forman los denominados *nicks*. Las hebras de ADN rotas se pueden detectar marcando el extremo terminal 3'-OH libre, por reacción enzimática utilizando nucleótidos modificados. En el *kit* utilizado en este trabajo, los nucleótidos estaban marcados con fluoresceína y la enzima encargada de incorporarlos a los extremos 3'-OH era la deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT).

Para detectar los fragmentos incorporados se incubó con anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa (POD *horse-radish peroxidase*) y posteriormente se aplicó el sustrato de esta enzima (diaminobencidina o DAB). Donde tenía lugar la reacción apareció un precipitado marrón (fig. 15 A).

Reactivos utilizados:

- Proteinasa K (20 µg /ml) en TRIS 50 mM pH 7,5-8,0

- Contenidos del kit: Enzima TdT

 - Nucleótidos conjugados con fluoresceína

 - Anticuerpo anti- fluoresceína conjugado con peroxidasa

- Triton X-100 al 0,1 % en Citrato Sódico al 0,1 %

- PBS

- DAB (K3468; Dako Diagnósticos S.A., Barcelona, España)

El estudio tras el marcaje se realizó mediante microscopía óptica. Las imágenes fueron fotografiadas y procesadas mediante el analizador de imagen *Metamorph* (versión 7.01, Universal Imaging Corp.). Se delimitó el área a medir, que se circunscribió a la CEM excluyendo los triángulos epiteliales (fig.15 A, B). El área correspondiente a las células TUNEL positivas fue seleccionada mediante un balance de color y comparada con el área total delimitada de la CEM. Las medidas de cada grupo corresponden al valor medio del porcentaje del área correspondiente a las células TUNEL positivas con respecto al área total delimitada de la CEM de todas las secciones del grupo. Las secciones de los controles y de cada grupo experimental fueron medidas en la misma sesión, para evitar diferencias en los parámetros basales.

C) Si los cultivos fueron empleados para analizar la **proliferación**, los procesos palatinos aislados se cultivaron durante **12 horas** (tabla 6). Posteriormente se les retiró el medio de cultivo y se les añadió BrdU, incubándose durante 30 minutos. Posteriormente se fijaron en fijador de Carnoy (apartado 5.5) durante 1 hora. Tras la fijación se realizaron diversos lavados:

Etanol al 70% durante 30 min. x 2 veces

Butanol durante 45 min. x 2 veces

Parafina, 2 pases, durante 4 horas.

El conteo de células BrdU positivas en los cultivos se realizó siguiendo el mismo criterio descrito en el apartado 5.5.

5.8. Análisis estadístico.

Cuando los datos obtenidos fueron paramétricos se aplicó el test de la t de Student y/o la prueba ANOVA. Si no lo eran se aplicaba el test de Mann-Whitney y/o el de Kolmogorov-Smirnov.

El criterio para la significancia estadística fue considerar una $p < 0,05$ ó $p < 0,01$.

Los datos fueron analizados usando el programa para Windows SPSS versión 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Nivel de folato hepático en las hembras gestantes.

Para comprobar que las dietas administradas a los grupos 2 y 4 provocaban variaciones en los niveles de folato de las hembras que pertenecían a dichos grupos se analizaron los niveles de esta vitamina en el hígado de las hembras de los cuatro grupos empleados en este trabajo (tabla 3).

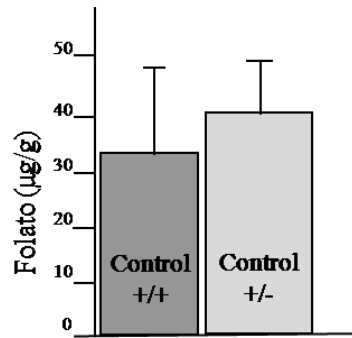
Los niveles de folato se midieron en los hígados de 9 hembras de cada grupo control, los grupos 1 y 3, en 46 hígados del grupo 2 y en 22 hígados del grupo 4 (tabla 7). Comprobamos que los datos obtenidos con los hígados del grupo 1 (33,9 $\mu\text{g/g}$) y los obtenidos en los del grupo 3 (39,4 $\mu\text{g/g}$) no presentaban diferencias estadísticamente significativas al ser comparados (fig. 16 A).

Tabla 7. Niveles de folato hepático: Número, genotipo y dieta de las hembras empleadas en la recolección de hígados en los que se midieron los niveles de folato.

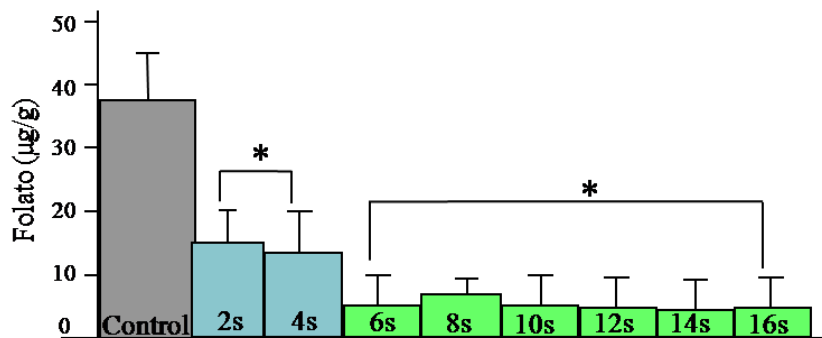
Grupo	Genotipo y dieta de las hembras	Número de hembras
1	+/+ control	9
2	+/+ CAF	46
3	+/- control	9
4	+/- SAF	22

Los hígados del grupo 2 pertenecían a hembras que fueron alimentadas durante un número diferente de semanas con dieta CAF. Las hembras que pasaron de 2 a 4 semanas con la dieta CAF presentaron niveles similares y sin diferencias estadísticamente significativas entre sí, por lo que asumimos un valor medio de 15 $\mu\text{g/g}$ en estos grupos. Dicho valor fue inferior al del grupo 1 de manera estadísticamente significativa (fig. 16 B). Las hembras que habían pasado entre 6 y 16 semanas con dieta CAF presentaron unos niveles comparables entre sí y sin diferencias estadísticamente significativas, por lo que se obtuvo una media de todos los valores que fue 5,2 $\mu\text{g/g}$.

A) Grupos 1 y 3



B) Grupos 1 y 2



C) Grupos 3 y 4

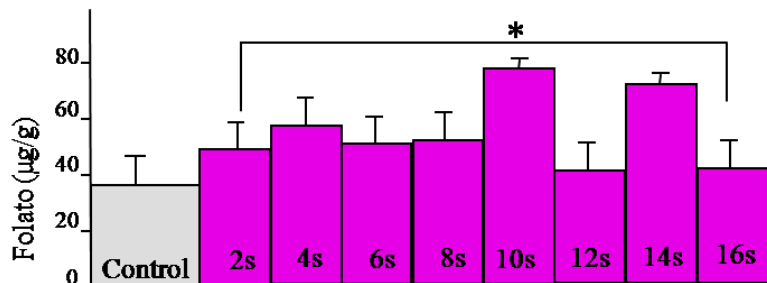


Figura 16. Niveles hepáticos de folato. A) Niveles obtenidos en el grupo 1, compuesto por hembras silvestres (+/+), y en el grupo 3, compuesto por hembras heterocigotas para el gen *Tgf-β₃* (+/-). Ambos grupos alimentados con dieta control. Estadísticamente no existen diferencias entre las medidas de ambos grupos. B) Niveles obtenidos en los grupos 1 y 2. Los niveles en las hembras +/+ alimentadas con dieta CAF, grupo 2, durante 2 y 4 semanas presentan unos niveles estadísticamente iguales entre sí (15 µg/g de media) e inferiores al valor del grupo 1 (33,9 µg/g). Los niveles obtenidos en las hembras alimentadas con dieta CAF de 6 a 16 semanas son estadísticamente iguales entre sí, con un valor medio de 5,2 µg/g, inferior significativamente al de los de 2-4 semanas e inferior significativamente al valor medio control. C) Niveles de AF de los grupos 3 y 4. Las medidas obtenidas en las hembras +/- alimentadas con SAF, grupo 4, no presentan diferencias significativas entre sí. El valor de media fue de 54,2 µg/g, superior al valor del grupo 3 (39,4 µg/g) de forma estadísticamente significativa. Asterisco: p<0,01.

El valor medio obtenido de las cantidades de folato hepático medido en los hígados de las hembras que permanecieron de 6 a 16 semanas con la dieta CAF fue estadísticamente inferior al de aquellas que permanecieron 2-4 semanas e inferior al valor obtenido en el grupo 1 (fig. 16 B).

Los hígados del grupo 4 pertenecían a hembras sometidas a dieta con SAF durante diferentes semanas, de 2 a 16. Estos datos no presentaron diferencias estadísticamente significativas y la media de todos los valores fue de 54,2 µg/g. Este valor era superior al del grupo 3 (39,4 µg/g) de forma estadísticamente significativa (fig. 16 C). En todos los casos, la significación fue de $p < 0,01$.

6.2. Efectos de la ausencia de ácido fólico en el desarrollo embrionario.

6.2.1. Malformaciones registradas en fetos descendientes de hembras sometidas a dieta carente de ácido fólico.

Fueron extraídos 35 fetos de 17 DG de 7 hembras control del grupo 1 y 257 fetos de 45 hembras del grupo 2 sometidas a dieta CAF durante 2 a 16 semanas (tablas 3 y 8). Los fetos fueron analizados macroscópicamente, antes de ser incluidos en parafina, y posteriormente se realizó el análisis microscópico de las secciones de parafina. No se registraron malformaciones en los controles pero sí en 116 de los individuos sometidos a déficit de AF, lo que supuso un 45,14% de afectados (tabla 8).

Las malformaciones detectadas resultaron de diversa índole y fueron catalogadas como “malformaciones craneofaciales” por un lado, cuando afectaban al paladar, a la lengua y/o a la mandíbula, y como “otro tipo de malformaciones” cuando afectaban al sistema nervioso o a la región abdominal (tabla 9).

Las malformaciones comenzaron a aparecer en los fetos cuyas madres fueron sometidas a 2 semanas de dieta CAF, afectando estas primeras malformaciones al paladar y a los ojos. Los afectados fueron 2 fetos de un total de 51, lo que supuso el 3,92% (tabla 8).

Tabla 8. Incidencia y tipo de malformaciones en fetos que han sufrido el déficit de AF durante diferentes semanas.

Semanas en dieta CAF	Nº hembras	Nº fetos	Nº fetos malformados	%	Tipo de malformaciones encontradas
0 (control)	7	35	0	0	Ninguna
2	6	51	2	3,92	Palatinas / Oculares
4	7	53	2	3,77	Oculares / DTN / Región abdominal afectada
6	4	19	6	31,58	Craneofaciales / Sistema nervioso afectado / Región abdominal afectada
8	6	29	22	75,86	Craneofaciales / Sistema nervioso afectado / Región abdominal afectada
10	9	58	43	74,14	Craneofaciales / Sistema nervioso afectado / Región abdominal afectada
12	8	31	28	74,19	Craneofaciales / Oculares/ Región abdominal afectada
14	2	8	6	75,00	Craneofaciales / Sistema nervioso afectado / Región abdominal afectada
16	3	8	7	87,50	Craneofaciales / Sistema nervioso afectado
Totales	45	257	116	45,14	

Tabla 9. Tipos de malformaciones encontradas en los fetos extraídos en 17 DG y número de fetos afectados por cada una de ellas.

Zona afectada por la malformación		Tipo de malformación	Nº de fetos afectados	Nº total	Nº de fetos con malformación craneofacial
Malformaciones craneofaciales	Paladar	Fisura anterior	2	17	33
		Fisura completa	8		
		Paladar comprimido	7		
	Lengua y/o mandíbula	Microglosias, aglosias, micrognatias, agnatias	16	16	
Otras malformaciones	Sistema nervioso	Oculares	112	112	
		Anencefalias/ Exencefalias (DTN)	15	24	
		Espinas Bífidas (DTN)	9		
	Región abdominal	Evisceraciones	12	16	
		Hernias umbilicales	4		

Las malformaciones oculares, englobadas dentro de las del sistema nervioso (tabla 9), eran apreciables a nivel macroscópico. Se registraron microftalmias, donde el ojo aparecía más pequeño y menos pigmentado que en los individuos control (fig. 17 A, B), y anoftalmias, en las que no se apreciaba pigmentación ni estructuras oculares (fig. 17 C). Los individuos con este tipo de malformaciones han supuesto el 43,58% del total de los fetos analizados y el 96,55% de los individuos malformados (tabla 10).

Los primeros fetos con DTN y malformaciones de la región abdominal se observaron en aquéllos cuyas madres fueron sometidas a 4 semanas de dieta CAF. De 53 fetos sometidos a 4 semanas de déficit de AF fueron 2 los que sufrieron alguna malformación, lo que supuso un 3,77% de afectados (tabla 8). Dentro del grupo de alteraciones asociadas al sistema nervioso incluimos los casos de DTN visibles macroscópicamente, como los casos de anencefalia (tabla 9), donde el encéfalo no ha llegado a desarrollarse o lo ha hecho muy poco (fig. 17 C) y los de exencefalia (fig. 17 D), en los que el encéfalo queda completa o parcialmente en contacto con el exterior. En el grupo de las malformaciones que afectaban al sistema nervioso también se incluyeron los casos de espina bífida (tabla 9). Los casos registrados fueron aquéllos que presentaron un fallo en el cierre de la zona sacra, y que apareció asociado a una posición anómala del apéndice caudal respecto de los individuos control (fig. 17 E, F). Estas malformaciones aparecieron en el 9,34% del total de los fetos analizados, lo que supuso el 20,69% del total de fetos malformados (tabla 10).

Respecto a la región abdominal, los fetos control de 17 DG presentan totalmente formada la pared abdominal (fig. 17 G). En 4 de los fetos deficitarios analizados se registraron hernias umbilicales (tabla 9, fig. 17 H), en las que la pared muscular abdominal no se ha cerrado correctamente y una porción del intestino se eviscera, quedando revestida únicamente por la piel del abdomen. También se observaron 12 casos de evisceración (tabla 9, fig. 17 I), en los que la pared abdominal no se ha formado y los órganos como el hígado y/o el intestino se exteriorizan. Estos casos, presentados por el 6,22% de los fetos, representaban el 13,79% de los malformados (tabla 10).

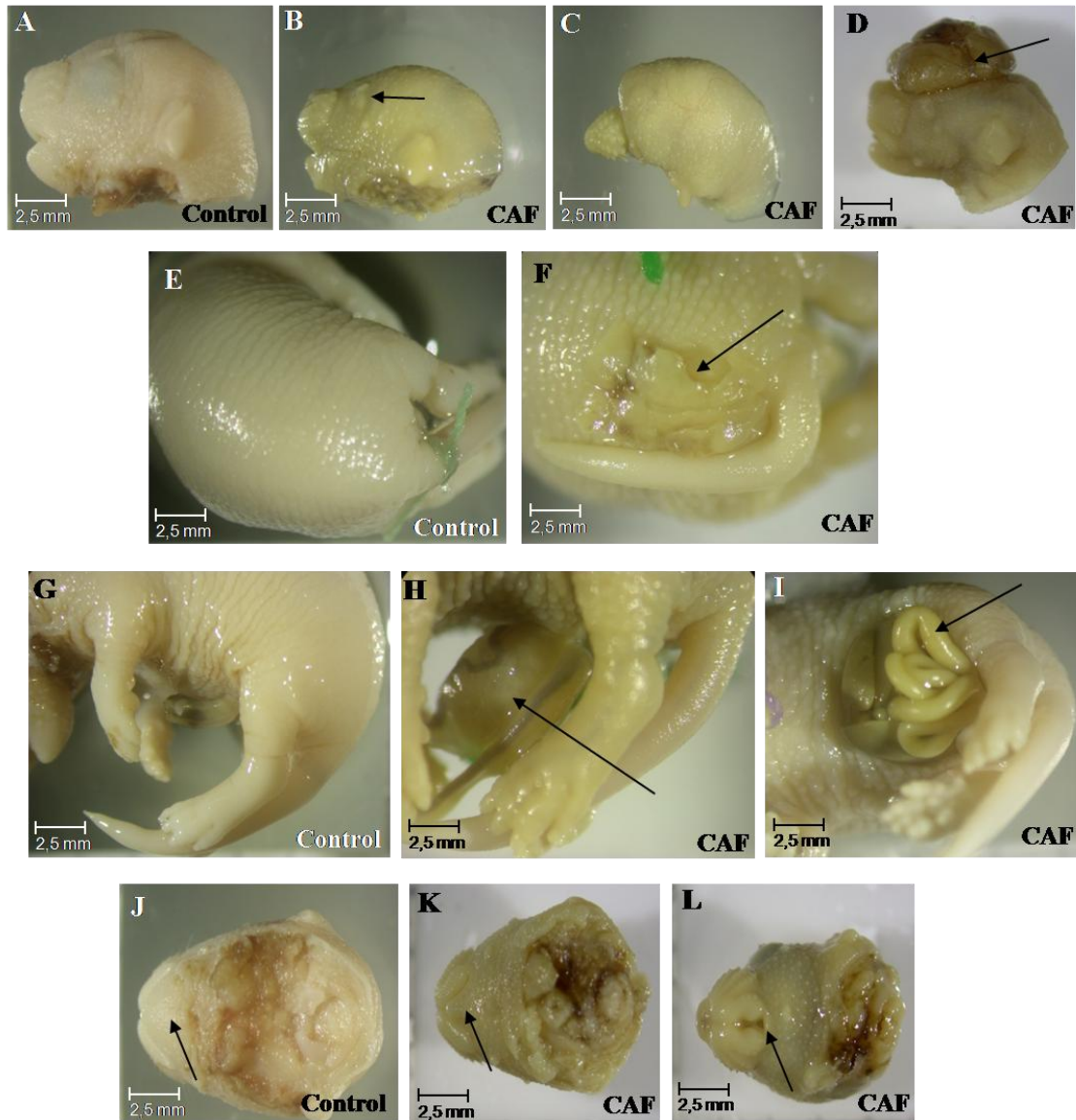


Figura 17. Malformaciones macroscópicas encontradas. (A, E, G, J) pertenecen a fetos de 17 DG control y (B-D, F), (H,I) y (K,L), a fetos cuyas madres han pasado de 8 a 16 semanas bajo una dieta CAF. (A-D), son cabezas de fetos de 17 DG fotografiadas lateralmente. (B) presenta una microftalmia. La flecha indica el ojo, que es más pequeño y menos pigmentado que el control (A). (C) corresponde a un individuo anencéfalo y anoftálmico y (D) a uno exencéfalo. La flecha señala el encéfalo fuera de la cavidad craneal. (E, F) son visiones posteriores de la región sacra de un feto control (E) y de otro que presenta espina bífida caudal (F), defecto que aparece señalado por la flecha. (G,H) son visiones laterales del abdomen de un feto control (G) y de otro con hernia umbilical (H), señalada por la flecha. (I) visión frontal del abdomen de un feto eviscerado, la flecha indica el intestino. (J-L) son visiones inferiores de cabezas de un feto control (J) y de dos fetos cuyas madres fueron alimentadas con dieta CAF, uno de los que presentó micrognatia (K) y otro agnatia (L). Las flechas indican la mandíbula normal (J), la disminuida (K) y la ausencia de ella (L).

Tabla 10. Relación entre el número de fetos con las diferentes malformaciones registradas y el número total de fetos analizados, el número total de malformados y el número total de los que presentaron malformaciones craneofaciales.

Tipos de malformaciones		Nº de fetos malformados	% respecto al nº de fetos totales (n=257)	% respecto al nº de fetos malformados (n=166)	% respecto al nº de fetos con malformación craneofacial (n=33)
Malformaciones craneofaciales	Palatinas	17	6,61	14,65	51,51
	No palatinas	16	6,22	13,79	48,48
Otras malformaciones	Asociadas al sistema nervioso	Oculares	112	43,58	96,55
		DTN	24	9,34	20,69
	Abdominales	16	6,22	13,79	

En los fetos extraídos de hembras que habían sido alimentadas entre 6 y 16 semanas con dieta CAF encontramos todos los tipos de malformaciones clasificadas (tablas 8 y 9). Se observa que el porcentaje de fetos con malformaciones, que supone un 3,92% y un 3,77% en los casos de 2 y 4 semanas respectivamente, aumenta hasta un 31,58% en el grupo de 6 semanas de déficit de AF (tabla 8). El aumento del porcentaje de fetos malformados era mucho mayor a partir de las 8 semanas de dieta, donde se registró un 75,86%. Un porcentaje similar al encontrado en el grupo de 8 semanas apareció en los grupos de 10, 12 y 14 semanas de dieta CAF (74,14%, 74,19% y 75% respectivamente). El mayor porcentaje de fetos malformados, 87,50%, se encontró en el grupo cuyas madres fueron sometidas a 16 semanas de dieta CAF (tabla 8).

En el caso de las malformaciones craneofaciales hicimos una división entre aquéllas que no afectaban al paladar y las que sí lo hacían (tabla 9). Las denominadas no palatinas englobaban los casos en los que la mandíbula apareció afectada. Los fetos que comparados con los control (fig. 17 J) presentaban micrognatia, una mandíbula de tamaño muy reducido (fig. 17 K), o agnatia, cuando ésta estaba ausente (fig. 17 L). Las malformaciones craneofaciales no palatinas también engloban los casos de microglosia, en los que la lengua aparece muy poco desarrollada (fig. 18 A, B), y los de aglosia, en los que la lengua sólo era un mínimo esbozo (fig. 18 C). Todos estos tipos de

malformaciones aparecieron en el 6,22% de los individuos, lo que supuso el 13,79% de los malformados y el 48,48% de los que sufrieron alguna malformación craneofacial (tabla 10).

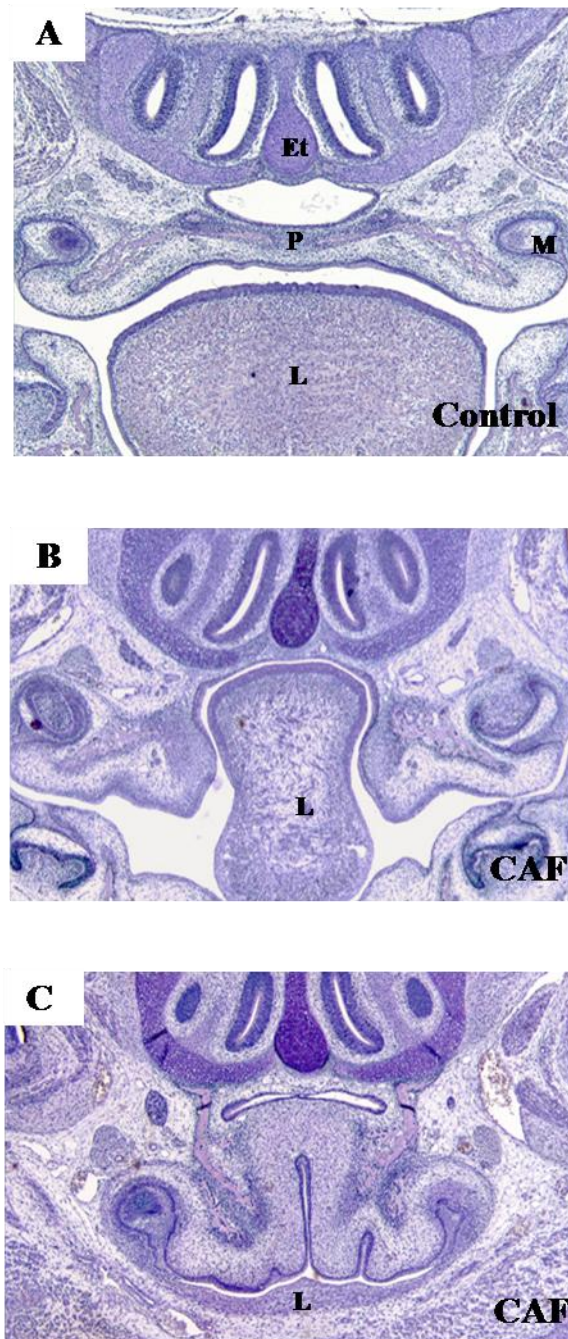


Figura 18. Malformaciones relacionadas con la lengua. Secciones coronales de individuos de 17 DG realizadas a la altura del primer molar. (A) Individuo control. (B,C) Individuos que han sufrido el déficit de AF y presentan alteraciones en la lengua. (B) presenta microglosia, una lengua de menor tamaño que el caso control (A). (C) presenta aglosia, donde debería aparecer la lengua sólo existe un esbozo de ésta. Et: etmoides; L: lengua; M: molar; P: paladar.

Por tanto, los fetos malformados de hembras que habían pasado de 2 a 4 semanas con dieta CAF suponían un porcentaje inferior al 4%, en la 6ª semana de dieta el porcentaje alcanzaba el 30% y a partir de la 8ª semana de dieta CAF los porcentajes de los fetos nacidos que mostraron alguna malformación superaban el 70% (tabla 8). Además, registramos que la mitad de los individuos (51,51%) con alguna malformación craneofacial presentaban el paladar afectado, mientras que el 48,48% restante correspondía a otras alteraciones (microglosias, micrognatias, agnatias). El porcentaje de individuos con alguna alteración palatina respecto al número total de malformados supuso un 14,65% (tabla 10).

En resumen, respecto al número total de individuos estudiados, hemos hallado que el tipo de alteraciones más frecuentes son las oculares, las cuales suponen un 43,58% del total de fetos analizados. En segundo lugar se encuentran los DTN (9,34%) seguidos de las malformaciones palatinas (6,61%) y, por último, las malformaciones craneofaciales no palatinas y las abdominales con un 6,22% en ambos casos (tabla 10).

6.2.2. Malformaciones del paladar de fetos descendientes de hembras sometidas a dieta carente de ácido fólico.

Las malformaciones craneofaciales palatinas detectadas en los fetos hijos de hembras sometidas a dieta CAF, que son el eje central de este estudio, se clasificaron en 3 tipos (tabla 9):

- a) Fisuras palatinas anteriores: son aquellas que a nivel macroscópico se asemejan a los controles (fig. 19 A, B) salvo por el hecho de que la parte anterior de los procesos palatinos no está adherida (fig. 19 C, D); en las secciones analizadas de la región anterior aparece un defecto de adhesión (fig. 19 D) que no presentan los controles (fig. 19 B). Estos casos se encontraron en fetos cuyas madres habían sido sometidas a 2 y 16 semanas de dieta CAF y supusieron el 0,78% del total de individuos analizados (tabla 11).

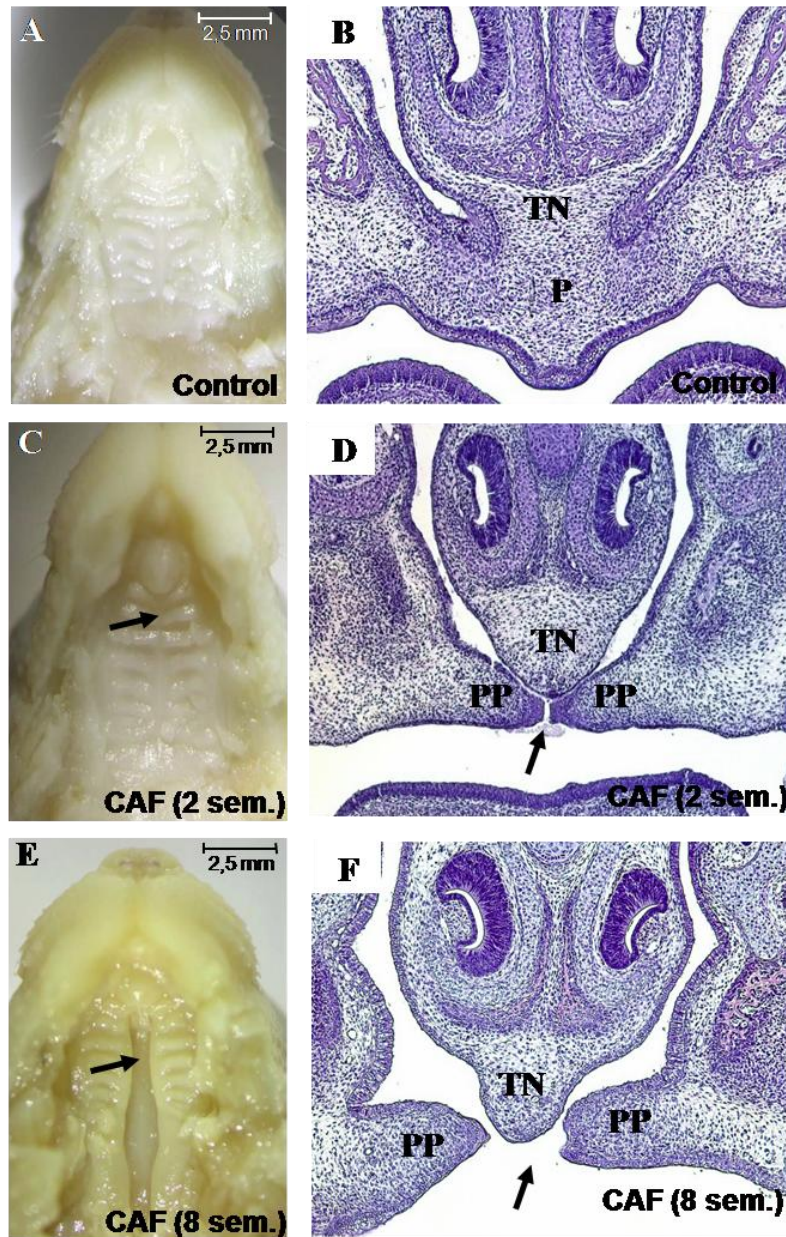


Figura 19. Malformaciones del paladar I. Las imágenes (A, C, E) corresponden a la visión intraoral de fetos de 17 DG a los que se les ha retirado la mandíbula y las (B, D, F) a secciones coronales de la región anterior de fetos de 17 DG teñidas con hematoxilina-eosina. (A-B) pertenecen a un caso control; en la sección se observa la fusión de los procesos palatinos con el paladar primario y el tabique nasal. (C-D) son de un feto cuya madre fue alimentada 2 semanas con dieta CAF y presentó una fisura anterior (flecha); obsérvese que los procesos palatinos no se han fusionado entre sí ni con el tabique nasal. (E-F) son imágenes de un feto cuya madre fue sometida a 8 semanas de dieta CAF y presentó una fisura completa (flecha) perfectamente visible a nivel macroscópico y microscópico. P: paladar; PP: proceso palatino; TN: tabique nasal.

Tabla 11. Incidencia de las malformaciones palatinas en los fetos extraídos en 17 DG hijos de hembras sometidas a dieta CAF durante 2 a 16 semanas.

Semanas de dieta CAF	N° total de individuos	Fisuras anteriores		Fisuras completas		Paladares plegados		N° total de afectados	
		N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
2	51	1	1,96%	0	0	0	0	1	1,96%
4	53	0	0	0	0	0	0	0	0
6	19	0	0	0	0	1	5,26%	1	5,26%
8	29	0	0	3	10,34%	2	6,89%	5	17,24%
10	58	0	0	4	6,90%	2	3,45%	6	10,34%
12	31	0	0	1	3,22%	0	0	1	3,22%
14	8	0	0	0	0	1	12,50%	1	12,50%
16	8	1	12,50%	0	0	1	12,50%	2	25,00%
Totales	257	2	0,78%	8	3,11%	7	2,72%	17	6,61%

b) Fisuras palatinas completas: son las que a nivel macroscópico muestran claramente que los procesos palatinos no han llegado a adherirse, presentando una hendidura evidente macroscópica (fig. 19 E) y microscópicamente (fig. 19 F). Estos casos aparecieron en aquellos cuyas madres estuvieron 8 semanas o más alimentándose con dieta CAF. El grupo que presentó un porcentaje mayor de FP completa fue el de las hembras que pasaron 8 semanas alimentándose con la dieta CAF (tabla 11).

c) Paladar plegado: son aquellos casos que, comparados con los controles (fig. 20 A, B), macroscópicamente aparentaban presentar una FP completa, estando los procesos palatinos muy próximos (fig. 20 C). Sin embargo, al realizar el análisis microscópico observamos que la fusión era correcta pero, comparado con los individuos control (fig. 20 B), el paladar aparecía plegado contra la base del cráneo y algo hipoplásico, de forma que en su región posterior dejaba obliterado el pasaje nasal común (fig. 20 D). Paralelamente, los bordes alveolares del maxilar aparecían aproximados el uno al otro y cercanos a la línea media, dando sensación de presencia de una FP en realidad inexistente. Este tipo de alteración apareció en fetos cuyas madres habían pasado 6 semanas o más bajo dieta CAF y supuso un 2,72% del número total de fetos analizados (tabla 11).

Además de las alteraciones palatinas comentadas, al analizar el paladar en las secciones teñidas de fetos sin malformación palatina encontramos un aparente retraso en la osificación del paladar con respecto a los individuos control (fig. 21 A). Observamos que los núcleos de osificación del paladar están más alejados cuanto mayor es el número de semanas que las madres de esos fetos han pasado sometidas a la dieta CAF. Tras 2 semanas de dieta este efecto no es evidente (figs. 21 A, B), es a partir de las 4 semanas cuando empieza a ser apreciable este defecto (figs. 21 C-H).

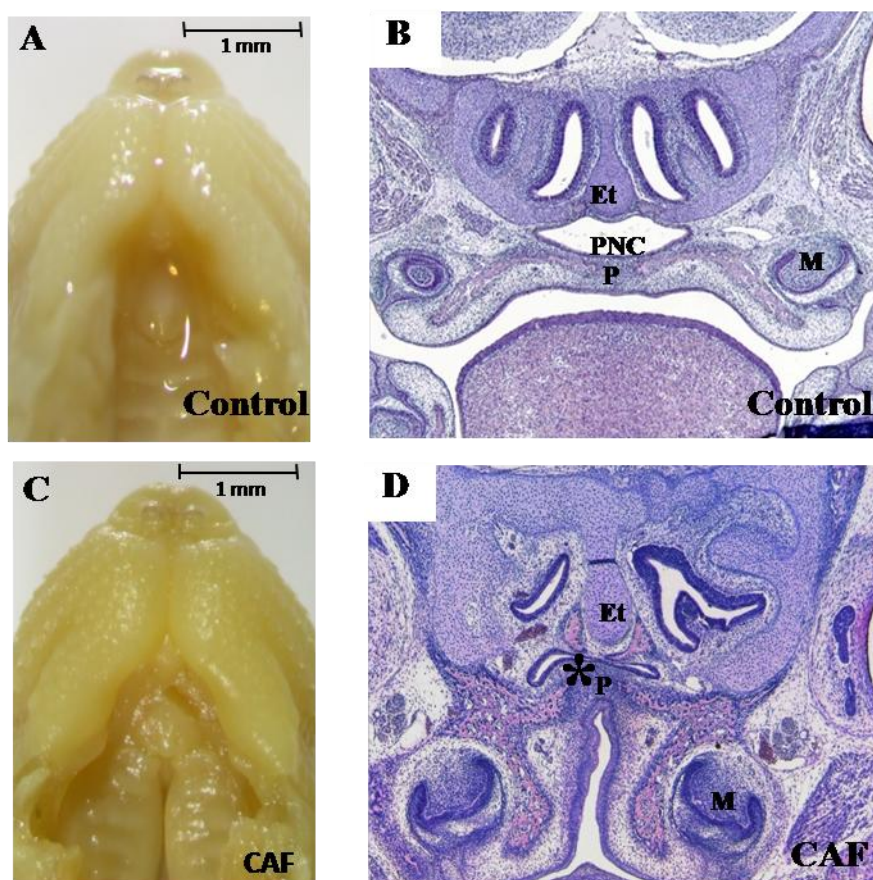


Figura 20. Malformaciones del paladar II. (A, C) visión intraoral del paladar de fetos de 17 DG a los que se les ha retirado la mandíbula. (B, D) secciones coronales correspondientes a la altura del primer molar de los fetos mostrados en (A, C) respectivamente. (A, B) pertenecen a un caso control; en la sección (B) se observa la fusión propia de los procesos palatinos de los individuos silvestres. (C, D) pertenecen a un feto de 17 DG cuya madre fue sometida a dieta CAF y presentó un “paladar plegado”, el cual aparenta macroscópicamente ser una fisura con los procesos palatinos muy cercanos (C), pero al analizar la sección microscópicamente muestra una perfecta fusión de los procesos palatinos pero un plegamiento del paladar (D). Obsérvese en la imagen la cercanía entre los esbozos de los molares y la obliteración del pasaje nasal común (*). Et: etmoides; M: esbozo del molar; P: paladar; PCN: pasaje nasal común.

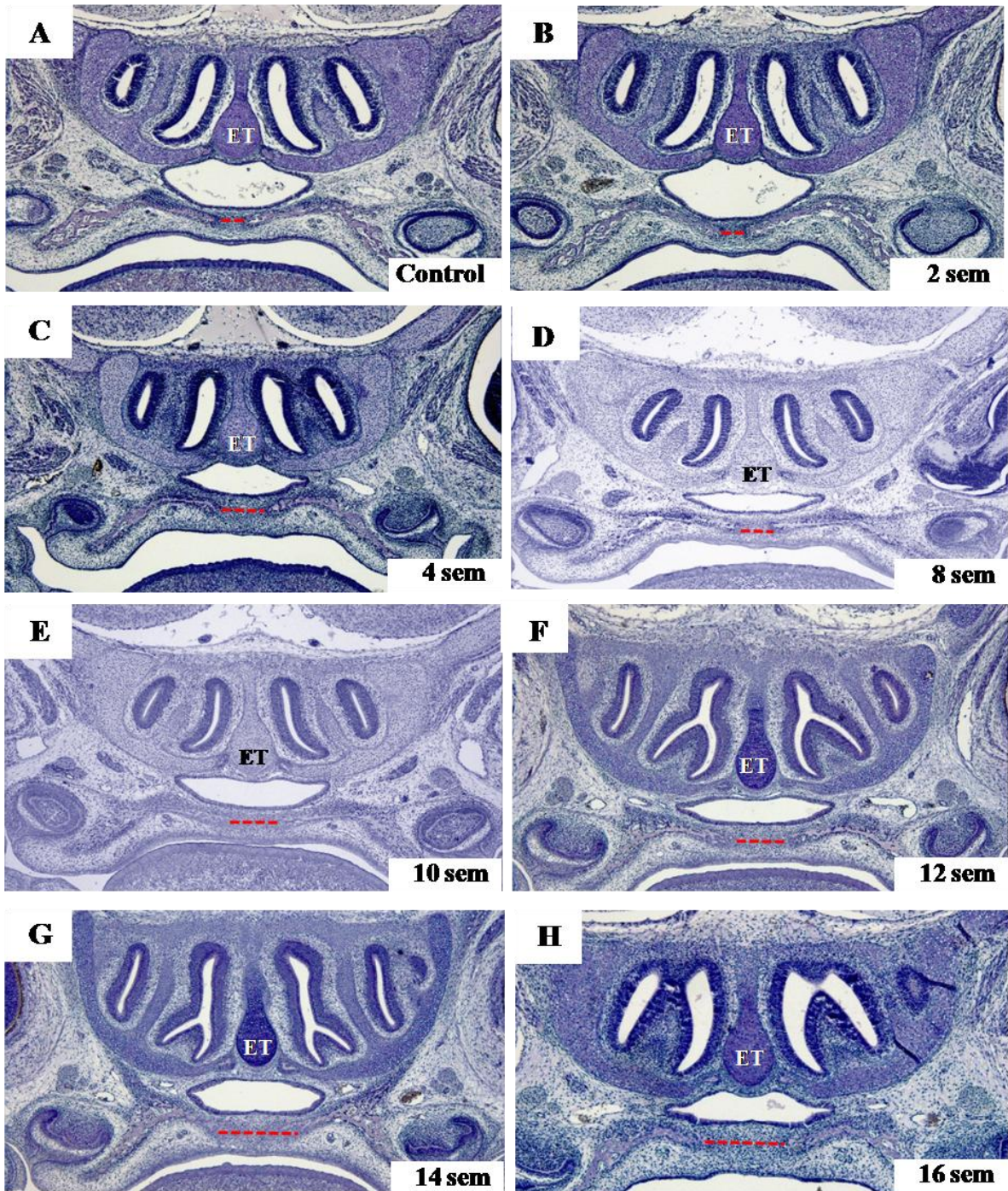


Figura 21. Alteración de la osificación palatina en fetos sometidos a déficit de AF sin FP ni paladar plegado. Secciones de cabezas de fetos de 17 DG teñidas con hematoxilina-eosina, cortadas a la altura del esbozo del molar. En ellas se observa, respecto a lo observado en el control (A) y en los individuos de 2 semanas de dieta CAF (B), cómo aumenta la distancia entre los núcleos de osificación (líneas discontinuas rojas) a partir de las 4 semanas de dieta materna CAF (C-H). ET: Etmoides.

6.2.3. Alteración de los mecanismos básicos de la palatogénesis por la carencia de ácido fólico.

Tras realizar el análisis de los fetos de 17 DG cuyas madres habían sido sometidas a una dieta CAF y observar la aparición de FP en algunos de ellos (apartado 6.2.2, tabla 11), decidimos estudiar cómo podía afectar el déficit de AF a los mecanismos básicos implicados en la palatogénesis.

Como se ha comentado en la introducción (apartado 1.1), una vez los procesos palatinos se han horizontalizado, es esencial en la palatogénesis la proliferación celular en el mesénquima que los constituye y el descenso de la misma en el EBM, cuyo destino final es desaparecer. Cuando los epitelios del borde medial opuestos contactan, una fuerte adhesión asegura su unión en la línea media, que es seguida de la desaparición del EBM por medio de muerte celular programada, principalmente, y también por transformación epitelio-mesenquimatoso y emigración celular. Con este paso se consigue la fusión de los procesos palatinos.

Decidimos analizar si los mecanismos más importantes de este proceso se veían afectados en los embriones cuyas progenitoras fueron alimentadas con dieta CAF. Debido a que ya a las 2 semanas de dieta CAF observamos FP anterior (tabla 11), analizamos en especímenes de este grupo experimental si se alteraban la proliferación celular del mesénquima y del EBM, la adhesión de los procesos palatinos, la muerte de las células del EBM y la fusión de los procesos palatinos.

6.2.3.1. Alteración de la proliferación celular en el paladar de embriones descendientes de hembras sometidas durante 2 semanas a dieta carente de ácido fólico.

La proliferación fue analizada en el mesénquima y en el EBM de los procesos palatinos de 4 embriones control (tabla 12, fig. 22 A) y de 5 embriones cuyas madres fueron sometidas a dieta CAF durante 2 semanas (tabla 12, fig. 22 B). Consideramos el paladar dividido en 3 regiones: anterior, media y posterior (fig. 8). La proliferación se midió por separado en cada una de ellas, empleando unas 100 secciones de cada región en el caso de los controles y alrededor de 30 en el caso de los del grupo deficitario (tabla 12). La diferencia en el número de secciones medidas es debida a que los individuos sometidos al déficit de AF presentan un tamaño menor al de los individuos control.

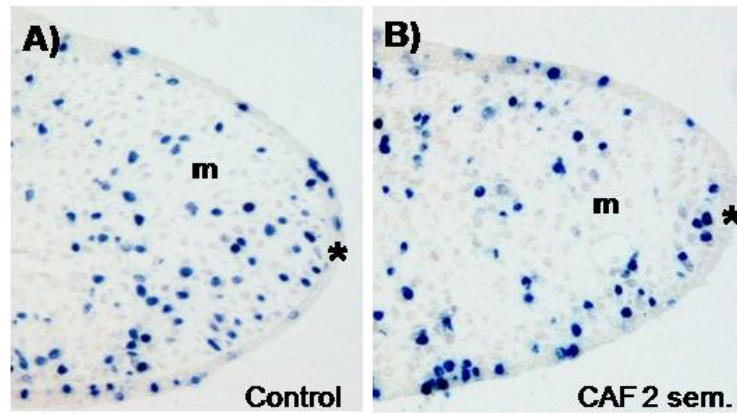
En el EBM de los individuos control, la proliferación era mayor cuanto más posterior la región analizada, apareciendo una media de 1,32 células en la región anterior, 2,25 en la región media y 3,57 en la posterior. Este ascenso en la media se mantenía en el caso de los embriones sometidos a CAF; 0,11 en la anterior, 0,86 en la media y 1,54 en la posterior (fig. 22 C), observándose que los embriones cuyas madres fueron sometidas a dieta CAF presentaron una proliferación significativamente ($p < 0,05$) menor que la de los embriones control, aunque manteniendo el patrón de distribución que aparecía a lo largo del paladar en los individuos control.

En el caso del mesénquima, los datos recogidos en los embriones control mostraron una proliferación similar en las regiones anterior y media del paladar, una media de 51,62 y 55,19 células proliferantes respectivamente y mayor en la posterior (88,28 células de media). Esta distribución varía en los deficitarios, ya que éstos presentaron datos similares en las tres regiones; 31,22 en la anterior, 32,97 en la media y 39,77 en la posterior (fig. 22 D) significativamente ($p < 0,05$) menor que en los controles.

Por tanto, la proliferación celular del paladar en desarrollo de los individuos sometidos al déficit de AF fue menor de forma estadísticamente significativa, $p < 0,05$, en el EBM y en el mesénquima en las tres regiones analizadas.

Tabla 12. Proliferación celular: Número de embriones y número de secciones de cada uno de ellos que fueron empleados para la medida de la proliferación celular en el paladar de embriones de 14,5 DG de los grupos 1 (control) y 2 (dieta CAF durante 2 semanas).

PROLIFERACIÓN CELULAR (CAF)			
Dieta	Nº embriones	Región	Nº secciones
Control	4	Anterior	117
		Media	124
		Posterior	136
CAF	5	Anterior	27
		Media	35
		Posterior	26



■ = control ■ = CAF 2 sem.

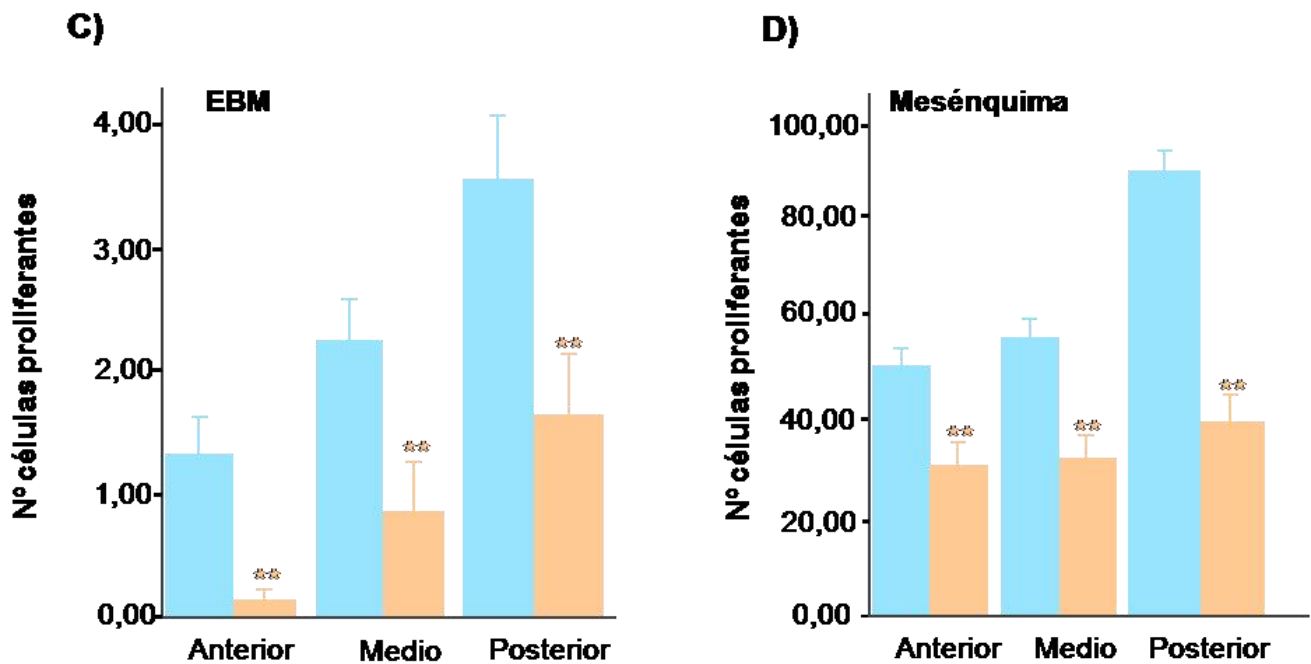


Figura 22. Proliferación celular en el paladar de embriones de 14,5 DG. Medida en embriones del grupo 1 (A) y del grupo 2 cuyas madres fueron sometidas a 2 semanas de dieta CAF (B). La proliferación fue medida en secciones de la región anterior, media y posterior del paladar, tanto en el EBM (C) como en el mesénquima (D). En todos los casos, la proliferación fue menor de forma estadísticamente significativa en el paladar de los embriones del grupo deficitario que en el de los del grupo control. Asterisco: EBM; m: mesénquima; doble asterisco: $p < 0,05$.

6.2.3.2. Alteración de la adhesión y fusión de los procesos palatinos de embriones descendientes de hembras sometidas 2 semanas a dieta carente de ácido fólico.

Para analizar la adhesión de los procesos palatinos y su fusión se mide la longitud de los epitelios del borde medial que están en contacto y ha desaparecido en cultivos de procesos palatinos enfrentados. Consideramos “adhesión” cuando se ha formado la CEM y “fusión” cuando la CEM desaparece y, en su lugar, aparece tejido mesenquimático (apartados 1.1. y 5.7.3.A).

Para llevar a cabo este estudio se realizaron cultivos con paladares de 8 individuos de 13'5 DG del grupo control (tabla 13, fig. 23 A) y 8 embriones hijos de hembras sometidas 2 semanas a dieta CAF (tabla 13, fig. 23 B). Analizamos la adhesión y la fusión ocurridas entre los procesos palatinos en 160 secciones de los individuos control y 288 secciones de los deficitarios de AF (tabla 13).

La longitud se midió en micras y la media obtenida de epitelios del borde medial enfrentados adheridos en los embriones deficitarios fue 170 frente a las 196 de los controles (fig. 23 D); es decir, los embriones sometidos al déficit de AF presentan una adhesión inferior a los controles y la diferencia fue estadísticamente significativa con una $p < 0,01$.

La fusión medida mostró valores de 71 micras de media en las secciones de individuos del grupo deficitario frente a las 101 de los controles (fig. 23 E), lo que indica una fusión menor en los deficitarios. Esta diferencia también fue significativa de forma estadística ($p < 0,01$).

Por tanto, se detectó un descenso en los niveles de adhesión y de fusión en los paladares de embriones que sufrieron 2 semanas el déficit de AF y, en ambos casos, de forma estadísticamente significativa.

Tabla 13. Adhesión y fusión: Número de embriones y número de secciones de cada uno de ellos que fueron empleados para la medida de la adhesión y fusión de los procesos palatinos cultivados del grupo 1 (control) y del grupo 2 (dieta CAF durante 2 semanas). Los del grupo 2 fueron cultivados con y sin TGF- β_3 en el medio de cultivo.

ADHESIÓN Y FUSIÓN (CAF)		
	Nº embriones	Nº secciones
Control	8	160
CAF	8	288
CAF + TGF- β_3	8	145

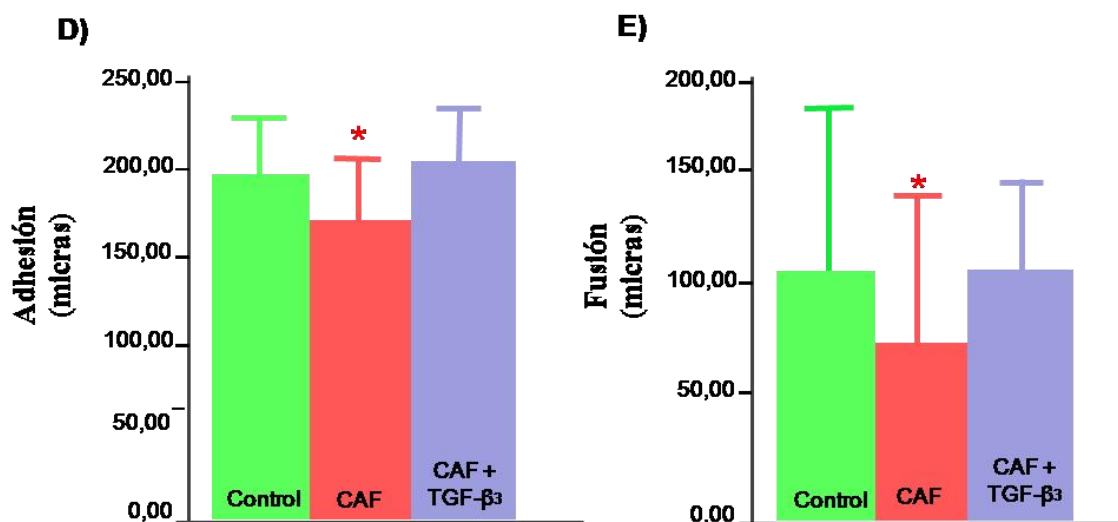
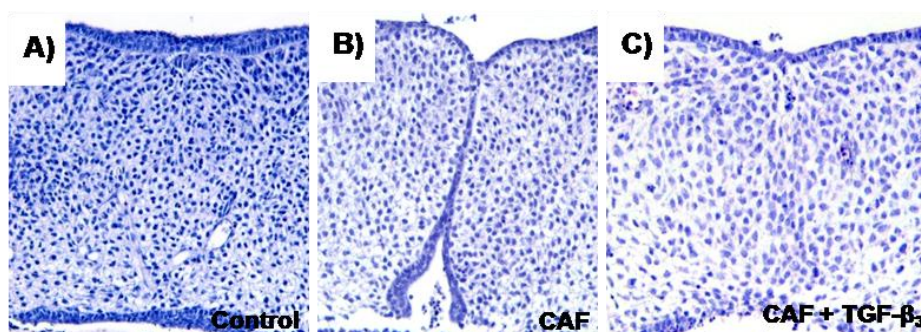


Figura 23. Adhesión y fusión en cultivos de procesos palatinos embrionarios. Medida de la adhesión y de la fusión en paladar de embriones del grupo control 1 (A), del grupo 2 cuyas madres fueron sometidas a 2 semanas de dieta CAF (B) y de este mismo grupo pero con TGF- β_3 añadido en el medio de cultivo (C). Tanto la adhesión (D) como la fusión (E) fueron inferiores en los individuos sometidos al déficit de AF a las medias registradas en los controles y se restablecieron cuando se añadió TGF- β_3 al medio de cultivo. Datos estadísticamente significativos. Asterisco: $p < 0,01$

6.2.3.3. Alteración de la muerte celular en la costura epitelial medial de embriones descendientes de hembras sometidas 2 semanas a dieta carente de ácido fólico.

Analizamos la muerte celular en la CEM de los procesos palatinos cultivados de 13 embriones control (tabla 14, fig. 24 A) y de 19 embriones hijos de hembras del grupo 2 que pasaron 2 semanas con dieta CAF (tabla 14, fig. 24 B). Se registró una media de 1,86% de muerte celular en la CEM formada por los procesos palatinos de los embriones obtenidos de las hembras del grupo 2 y una media de muerte celular de 1,49% en el caso de los embriones control (fig. 24 D).

Por tanto, estos datos revelan la existencia de un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,01$) de la muerte celular en la CEM del paladar de los embriones descendientes de las hembras del grupo sometido al déficit de AF respecto a los embriones control.

Tabla 14. Muerte celular: Número de embriones y número de secciones de cada uno de ellos que fueron empleados para la medida de la muerte de las células de la CEM de procesos palatinos cultivados del grupo 1 (control) y 2 (dieta CAF durante 2 semanas). Los del grupo 2 fueron cultivados con y sin TGF- β_3 en el medio de cultivo.

MUERTE CELULAR (CAF)		
	Nº embriones	Nº secciones
Control	13	177
CAF	19	110
CAF + TGF-β_3	14	83

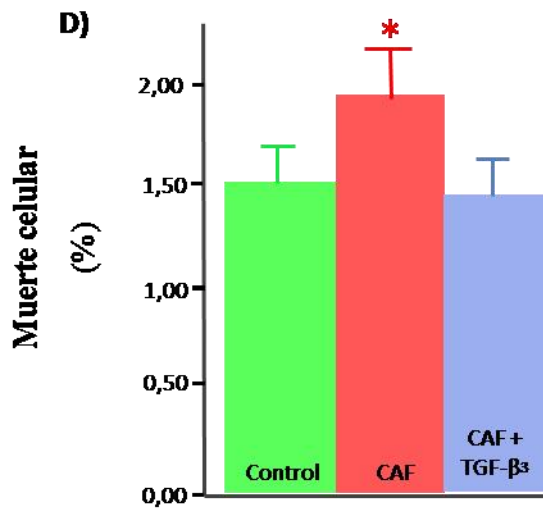
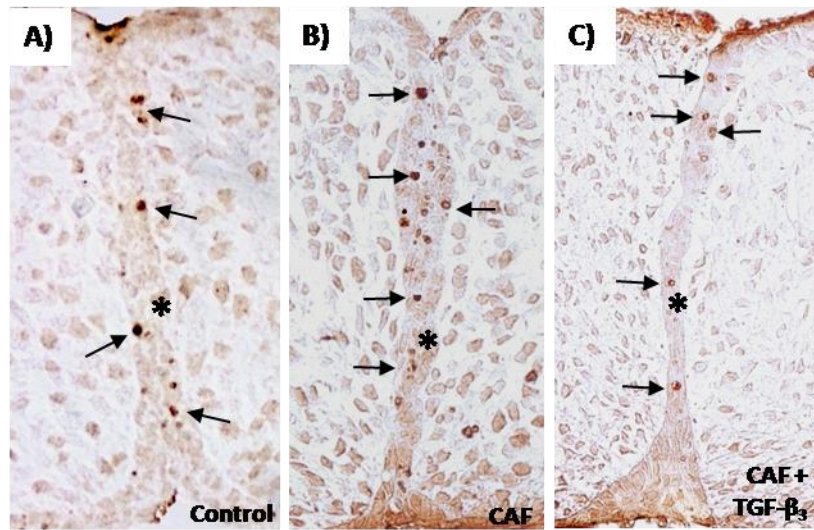


Figura 24. Muerte celular en cultivos de procesos palatinos. Medida en cultivos de procesos palatinos de embriones control (A), de embriones que han sufrido déficit de AF durante 2 semanas (B) y embriones sometidos el mismo tiempo al déficit de AF pero con TGF-β₃ añadido en el medio de cultivo (C). Las flechas indican las células apoptóticas marcadas. (D) La muerte celular medida en los embriones sometidos a la dieta materna CAF fue superior a la de los individuos control, datos estadísticamente significativos. Al añadir TGF-β₃ en el medio de cultivo la muerte disminuyó hasta unos valores similares a los detectados en los controles. Asterisco en A-C: CEM; asterisco en D: p<0,01.

6.2.4. Expresión de TGF- β_3 en el paladar de embriones descendientes de hembras sometidas durante 2 y 8 semanas a dieta carente de ácido fólico.

Dado que en los embriones cuyas madres sufrieron un déficit de AF en la dieta se observaron alteraciones en los mecanismos básicos implicados en la palatogénesis (apartado 6.2.3.) y partiendo de dos premisas fundamentales: primera, la importancia de TGF- β_3 en la formación del paladar (apartados 1.2. y 1.3.) y, segunda, que los mismos mecanismos aparecen alterados en los mutantes que no expresan TGF- β_3 , que poseen FP completa (apartado 1.4.), decidimos analizar la expresión de TGF- β_3 en los embriones hijos de las hembras del grupo 2 (tabla 3) por medio de la técnica de la HIS a fin de ver si la carencia de AF altera su expresión.

Se realizó HIS en cabezas de embriones de 14,5 DG hijos de las hembras del grupo 1 y del grupo 2 (tabla 3), que habían permanecido 2 y 8 semanas bajo dieta CAF. Decidimos analizar los fetos de esas semanas concretamente porque en los de 2 semanas ya aparecía una FP anterior y los mecanismos de fusión de los procesos palatinos estaban alterados, y en los de 8 semanas habíamos observado el mayor porcentaje de fisuras palatinas completas (tabla 11).

Se utilizaron 9 embriones control (fig. 25 A) y 7 embriones hijos de hembras que fueron alimentadas 2 semanas con dieta CAF (fig. 25 B). Se observó una ligera disminución de la expresión de TGF- β_3 en los del grupo sometido a la dieta CAF frente a los del grupo control, principalmente apreciable en la región media del paladar (fig. 25 A, B, E, H).

Para la HIS de cabezas de individuos del grupo 2 cuyas madres habían pasado 8 semanas bajo dieta CAF se emplearon 7 embriones y otros 9 embriones del grupo control. Se observó que la expresión de TGF- β_3 sufría una disminución mucho más evidente que en el caso de los que procedían de 2 semanas de dieta materna CAF, al comparar individuos control (fig. 25 C) con individuos cuyas madres se alimentaron de dieta CAF durante 8 semanas (fig. 25 D). Esta diferencia de expresión era evidente a cualquier nivel del paladar (fig. 25 F, I), pero principalmente en las regiones donde se había formado la CEM (fig. 25 G, J).

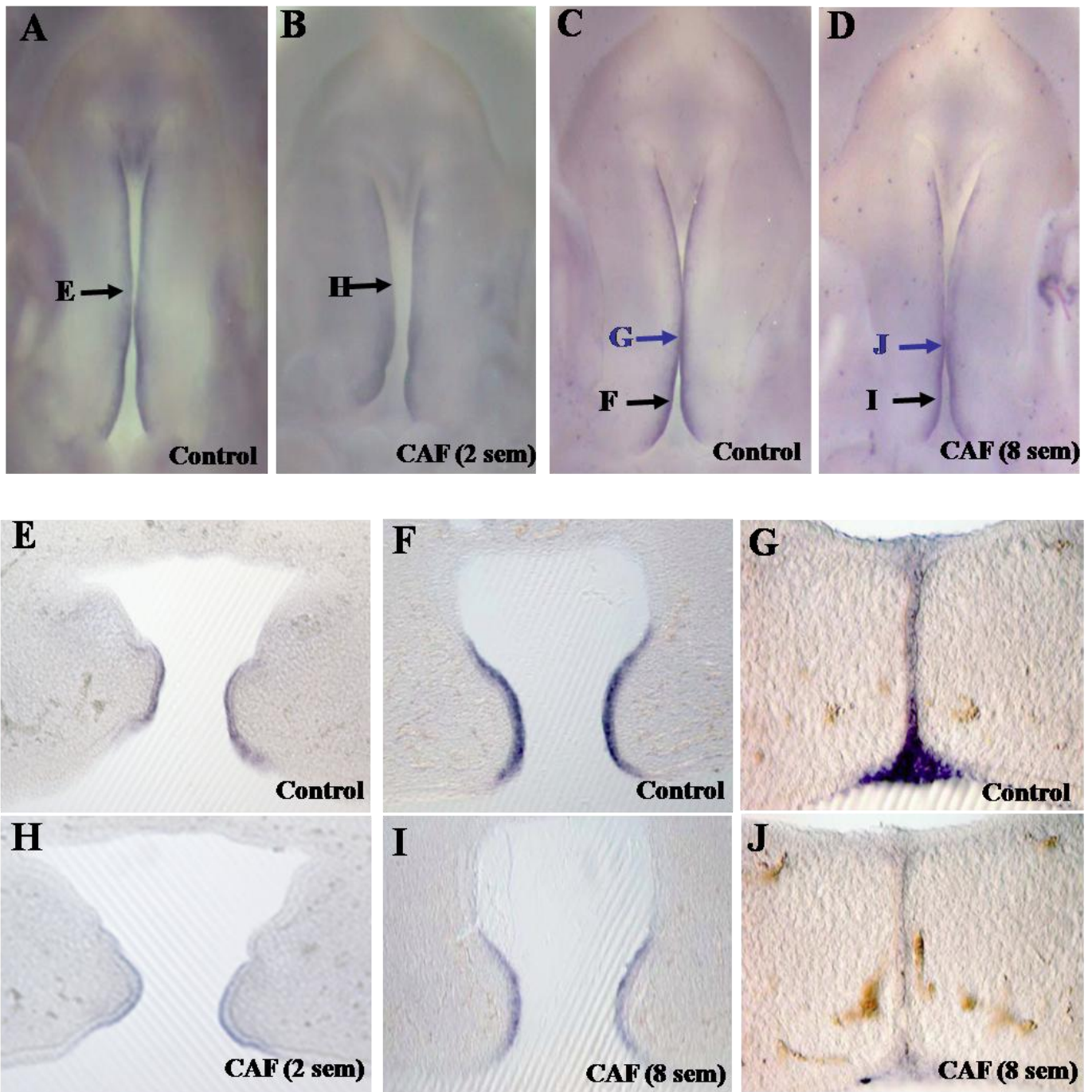


Figura 25. Expresión de TGF- β_3 en el paladar de embriones de 14,5 DG. (A-D) Visiones intraorales de cabezas de embriones a las que se les retiró la mandíbula y se hibridaron para observar la expresión de TGF- β_3 . (E-J) Secciones de 50 μm de grosor correspondientes a las cabezas (A-D). (A, C) Embriones control, (B) embrión cuya madre fue sometida 2 semanas a dieta CAF y (D) embrión cuya madre fue alimentada durante 8 semanas con dieta CAF. Las flechas indican la zona a la que pertenecen las secciones a las que corresponden las imágenes (E-J). En todos los casos los individuos del grupo CAF (B, D, H, I, J) presentan menor expresión de TGF- β_3 que los individuos control (A, C, E, F, G), siendo la diferencia más evidente en la CEM (G-J) que en las zonas no adheridas (E, F, H, I).

Por tanto, el déficit de AF en la dieta materna generó que la expresión de TGF- β_3 en el paladar fuera inferior a la del grupo control. Dicha reducción fue mayor en los embriones cuyas madres pasaron 8 semanas alimentándose con dieta CAF que en aquéllos cuyas madres pasaron 2 semanas con la misma dieta.

6.2.5. Papel de TGF- β_3 en el rescate de los mecanismos implicados en la palatogénesis alterados por el déficit de ácido fólico.

Tras haber registrado alteraciones en los mecanismos implicados en el desarrollo del paladar de los embriones del grupo 2 (apartado 6.2.3.2.) y observar en embriones del mismo grupo un descenso de la expresión de TGF- β_3 en su EBM (apartado 6.2.4.), decidimos analizar si un aporte exógeno de TGF- β_3 podía recuperar dichos mecanismos a los niveles detectados en los embriones del grupo 1.

Para determinar los efectos del TGF- β_3 exógeno sobre la adhesión y la fusión se emplearon 8 embriones hijos de hembras alimentadas 2 semanas con dieta CAF (tabla 13), que fueron cultivados con una dosis fisiológica de TGF- β_3 añadida al medio de cultivo (fig. 23 C). Se analizaron 145 secciones, obteniéndose una media de 209 micras de EBM adherido y de 102 micras de EBM desaparecido (fig. 23 D, E). Los datos fueron comparados con las medias obtenidas en los cultivos de embriones control y en los sometidos a 2 semanas de dieta CAF (apartado 6.2.3.2). Se observó que tanto la adhesión como la fusión presentaban unos datos estadísticamente iguales a los medidos en los paladares de embriones control, que fueron de 196 micras para la adhesión y de 101 para la fusión (fig. 23 D, E).

Para analizar los efectos del TGF- β_3 exógeno sobre la muerte celular de las células de la CEM de cultivos sometidos a carencia de AF se obtuvieron 83 secciones de cultivos de paladares de 14 embriones del grupo 2 (tabla 14) a los que se añadió una dosis fisiológica de TGF- β_3 al medio de cultivo (fig. 24 C). Los datos obtenidos se compararon con los registrados en los grupos 1 y 2 sin TGF- β_3 añadido al medio (fig. 24 D). Se observó una media de la muerte celular de 1,36%, la cual no presentaba diferencias estadísticamente significativas con la media de 1,49% del grupo control (apartado 6.2.3.3. y fig. 24 D).

Para medir los efectos del TGF- β_3 exógeno sobre la proliferación del EBM y del mesénquima de los procesos palatinos sometidos al déficit de AF se utilizaron 14 embriones del grupo control y 11 embriones hijos de hembras sometidas a 2 semanas de dieta CAF (tabla 15, fig. 26 A-C). En este caso los procesos palatinos fueron cultivados de forma aislada (apartado 5.7.1.), por lo que los procesos derechos de los embriones afectados por la carencia de AF fueron cultivados en medio de cultivo DMEM y los izquierdos en DMEM con TGF- β_3 añadido. El número de células proliferantes de media en el EBM fue obtenido al contabilizarlas en 67 secciones del grupo control, 75 secciones del grupo sometido a la carencia de AF y de 133 secciones de los cultivos con el TGF- β_3 añadido al DMEM (tabla 15). En el caso del mesénquima, las medias se obtuvieron tras haber medido 99 secciones de cultivos control, 118 secciones de los cultivos de embriones afectados por la dieta CAF y 132 secciones de los tratados con una adición de TGF- β_3 (tabal 15).

Tabla 15. Proliferación celular en cultivos: Número de embriones y número de secciones de cada uno de ellos que fueron empleados para la medida de la proliferación celular de cultivos del grupo 1 (control) y 2 (dieta CAF durante 2 semanas). Los del grupo 2 fueron cultivados con y sin TGF- β_3 en el medio de cultivo.

PROLIFERACIÓN CELULAR (cultivos CAF)			
	Nº embriones	Nº secciones	
		EBM	Mesénquima
Control	14	67	99
CAF	11	75	118
CAF + TGF-β_3	11	133	132

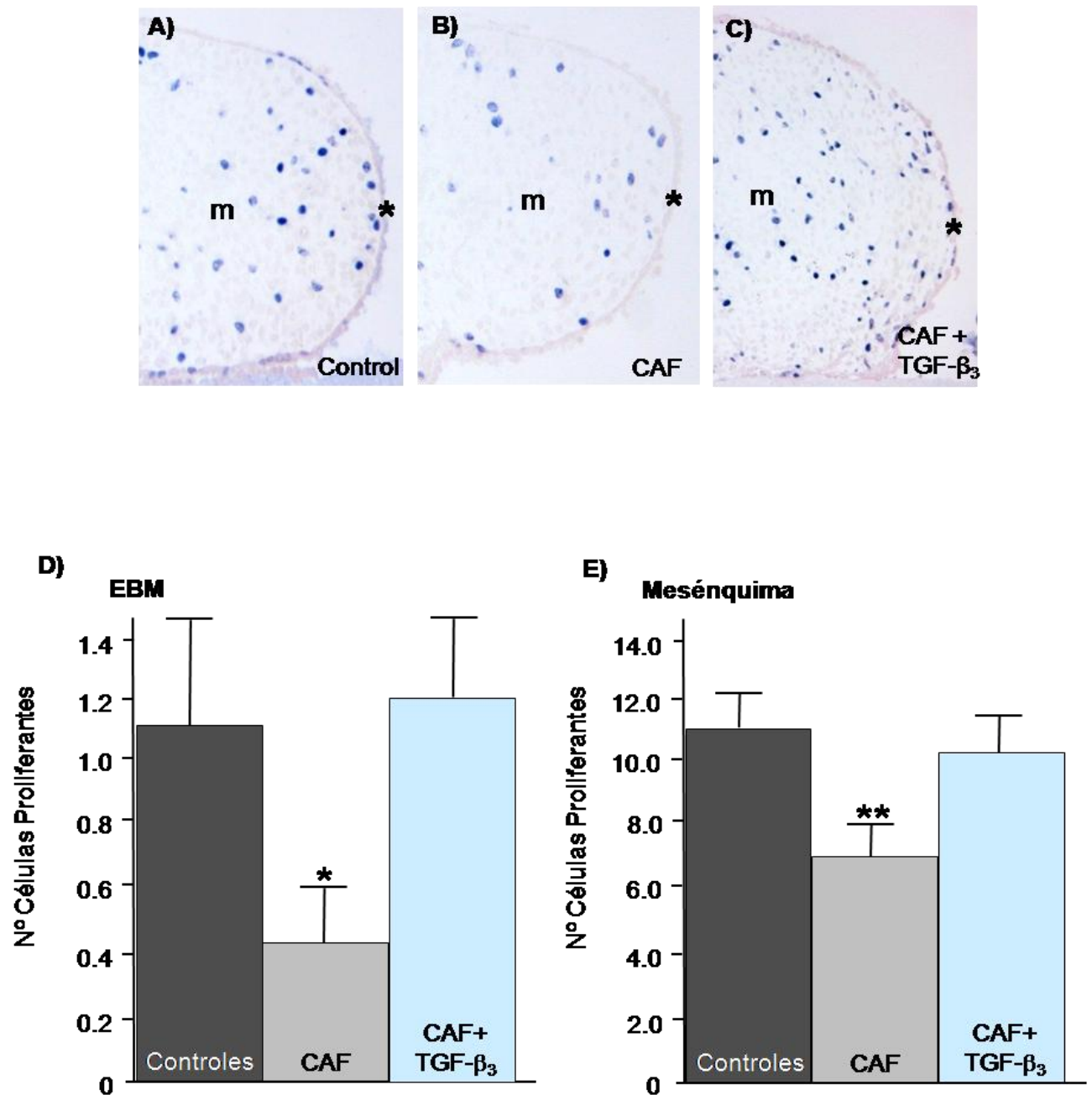


Figura 26. Proliferación en cultivos CAF. Medida de proliferación celular en cultivos de procesos palatinos aislados de embriones control (A), de embriones cuyas madres pasaron 2 semanas con dieta CAF (B) y de embriones de éste mismo grupo con TGF-β₃ añadido al medio de cultivo (C). Se observa la disminución de la proliferación en los cultivos del grupo sometido a la carencia de AF y la reversión a los niveles controles al añadir TGF-β₃ en el medio de cultivo, tanto en el EBM (D) como en el mesénquima (E). Datos estadísticamente significativos. Asterisco en A-C: EBM; m: mesénquima; asterisco en D-E: p<0,01; doble asterisco en D-E: p<0,05.

Detectamos un descenso del número de células proliferantes en los cultivos de procesos palatinos sometidos a la carencia de AF respecto a los cultivos del grupo control (fig. 26 D, E). En el EBM obtuvimos 0,43 células proliferantes de media en el grupo afectado por la carencia de AF respecto a las 1,07 células de media del grupo control y 1,21 células medidas en los tratados con TGF- β_3 en el medio de cultivo (fig. 26 D). En el mesénquima se contabilizó una media de 11,44 células en los controles, 6,9 células en los afectados por la carencia de AF y 10,40 células proliferantes en los cultivos influenciados por el déficit de AF y tratados con TGF- β_3 (fig. 26 E). Los datos fueron estadísticamente significativos tanto en el EBM ($p < 0,01$) como en el mesénquima ($p < 0,05$).

Por tanto, observamos que, tanto en el EBM como en el mesénquima, el número de células proliferantes de media en los procesos palatinos afectados por el déficit de AF descendía de forma estadísticamente significativa respecto a la media obtenida en los procesos palatinos control, pero que, al añadir TGF- β_3 al medio de cultivo de los afectados por el déficit de AF, los niveles no presentaban diferencias con los procesos del grupo control. Es decir, ante el déficit de AF, la proliferación en el paladar sufre una disminución y aumenta hasta niveles fisiológicos si TGF- β_3 es añadido al medio de cultivo (fig. 26 D, E).

Resumiendo, los embriones cuyas madres han sido alimentadas con dieta CAF presentan alteraciones en la adhesión, fusión, muerte y proliferación celular que actúan en sus procesos palatinos, pero todas esas alteraciones son revertidas *in vitro* al añadir TGF- β_3 al medio de cultivo.

6.3. Efecto del suplemento de ácido fólico en el desarrollo del paladar de ratones homocigotos negativos para el gen *Tgf-β₃*.

6.3.1. Fisuras presentadas por los fetos mutantes negativos para *Tgf-β₃*.

Para investigar el papel que un aporte dietético de AF puede tener en la prevención de la FP presentada por la alteración del gen *Tgf-β₃* extrajimos 29 fetos homocigotos negativos de 17 DG de 20 hembras del grupo 3 y otros 29 fetos procedentes de 23 hembras del grupo de 4 (tabla 16), las cuales fueron alimentadas con dieta con SAF de 2 a 16 semanas. Debido a que no encontramos diferencias entre los niveles de AF medidos en sus hígados (fig. 16 C) ni diferencias morfológicas entre sus fetos, decidimos no tener en cuenta en esta parte del estudio el número de semanas que las hembras habían permanecido con la dieta. Los fetos extraídos fueron analizados macroscópicamente y posteriormente incluidos en parafina y procesados para ser estudiados microscópicamente.

Tabla 16. Efecto del SAF en la aparición de fisura palatina de ratones *Tgf-β₃* -/-

Grupo y dieta	Nº de hembras preñadas	Nº de fetos <i>Tgf-β₃</i> -/-	Nº fisuras completas	Nº fisuras suavizadas	% de fisuras suavizadas respecto del total de fisuras
Grupo 3 (2 mg de AF/kg)	20	29	28	1	3'40%
Grupo 4 (40 mg de AF/kg)	23	29	24	5	17'24%

Los ratones mutantes negativos para *Tgf-β₃* de la raza C57 BL/6J siempre presentan FP al nacimiento y, en esta raza, la fisura que aparece es completa en un alto porcentaje de individuos (apartado 1.4.). En nuestra casuística, de 29 embriones *Tgf-β₃* -/- del grupo control extraídos (tabla 16), hemos obtenido 28 fisuras palatinas completas, en las que hay separación amplia y completa tanto de los procesos palatinos entre sí como de estos con del paladar primario (figs. 27 A-D). En este grupo sólo obtuvimos una fisura

incompleta, en la que hay fisura anterior y posterior en el paladar, pero en la zona central del paladar los procesos palatinos aparecen adheridos o incluso parcialmente fusionados. En el grupo control, las fisuras palatinas parciales suponen un 3,4% del total de fisuras (tabla 16).

Al proporcionar una dieta con SAF a hembras de ratón heterocigotas para el gen *Tgf-β3*, los resultados obtenidos revelan que la FP no desaparece en sus fetos mutantes negativos (tabla 16). Sin embargo, observamos que en un 17,24% de los fetos de este grupo, los procesos palatinos o bien se aproximaron en el tercio anterior del paladar hasta casi contactar (fig. 27 E-H) o aparecían adheridos en su tercio medio (figs. 27 I-L). En la zona adherida del paladar de estos últimos, la histología reveló que la mayor parte de la CEM había desaparecido y sólo permanecían algunos islotes epiteliales en algunas secciones (inserto fig. 27 K). Estas formas de FP que acabamos de describir son las que denominamos “formas suavizadas”.

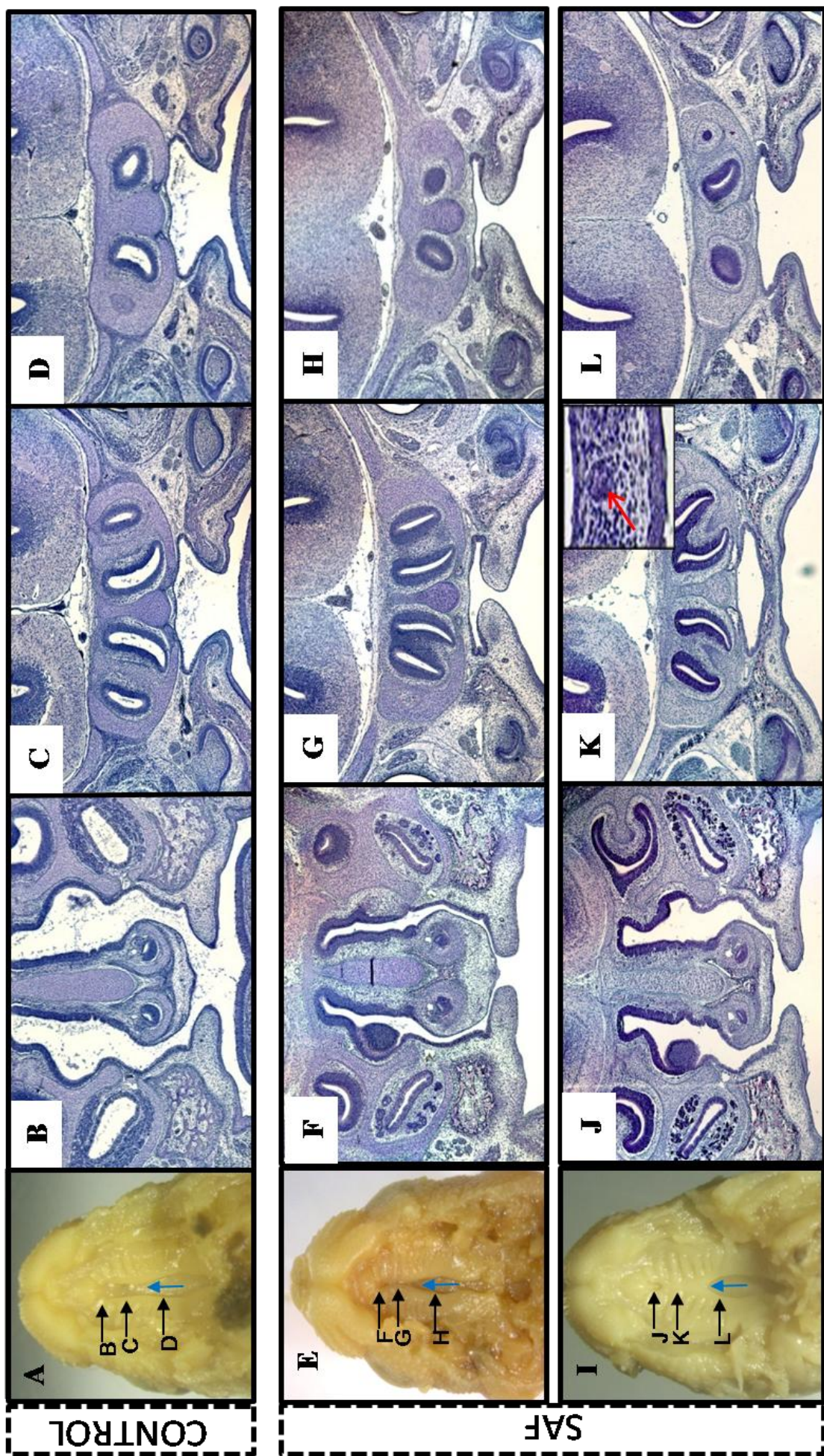


Figura 27. Fisuras palatinas mostradas por los fetos homocigotos negativos para *Tgf-β3*. Diferentes fisuras encontradas en los fetos de 17 DG del grupo control 3 (A-D) y del grupo 4 (E-L). (A, E, I) son vistas intraorales de cabezas de fetos a los que se les retiró la mandíbula. (B-D), (F-H) y (J-L), son secciones teñidas con hematoxilina-eosina de la región anterior del paladar (B, F, J) de la región media (C, G, K) y de la región posterior (D, H, L). (A) Feto que presenta fisura completa (flecha azul) que habitualmente poseen los individuos *Tgf-β3* ^{-/-}; (B-D) son secciones del mismo individuo y se observa como los procesos palatinos están alejados. (E) Feto con una fisura de bordes palatinos muy próximos (flecha azul). (F-H) secciones de (E), muestran como los procesos palatinos están muy próximos pero sin llegar a adherirse. (I) Feto que muestra una fisura parcial en la que la zona media se ha fusionado (flecha azul), (J-L) son secciones del mismo individuo donde se aprecia la adhesión de la región media (K). El inserto en (K) muestra una magnificación de la región central del paladar en esta sección donde se observa resto epitelial (flecha).

6.3.2. Análisis del estado de la proliferación de las células palatinas de los fetos mutantes negativos descendientes de hembras sometidas a dieta con suplemento de ácido fólico.

Tras observar un aumento en el número de fisuras suavizadas en los embriones *-/-* para *Tgf-β₃* (apartado 6.3.1.) nos planteamos que una posible causa de esta mejora podría ser un aumento en la proliferación de las células del paladar. Esta hipótesis parte del conocimiento de que un cambio en la proliferación celular en el paladar en desarrollo puede desembocar en la aparición de FP (apartados 1.1. y 1.4.) y, de hecho, los ratones C57 mutantes negativos para *Tgf-β₃* presentan una alteración de la proliferación, tanto en el EBM como en el mesénquima (apartado 1.4.). Además, existe una estrecha relación del folato con la generación de bases púricas y pirimidínicas esenciales en la replicación del ADN (apartado 1.5.), por lo que el AF está relacionado con la proliferación celular.

Para analizar si el suplemento dietético de AF de las hembras heterocigotas para *Tgf-β₃* podía afectar a la proliferación de las células del paladar embrionario, comparamos la medida de las células proliferantes del EBM y del mesénquima entre embriones homocigotos negativos: 8 del grupo control (tabla 17, fig. 28 A) y otros 8 del grupo con SAF en la dieta materna (tabla 17, fig. 28 B). Las medidas se realizaron en la región anterior del paladar, empleando 53 secciones de los embriones control y 43 de los de SAF; en la región media, usando 59 secciones de los controles y 44 de los tratados; y en la región posterior del paladar, empleando 40 secciones de los control y 42 de los de SAF (tabla 17).

Se midió la proliferación de las células del EBM, obteniendo: en la región anterior, 3,1 células proliferantes de media en el caso de los controles y 2,7 en el de los de SAF; en la región media se obtuvieron 4,9 y 4,5 células proliferantes de media respectivamente; y en la región posterior, fueron 6,3 en los controles y 7,7 células en los tratados. En ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas (fig. 28 C).

También fue medida la proliferación celular en el mesénquima en las regiones anterior, media y posterior del paladar. En la región anterior se obtuvieron 66 células proliferantes de media en el caso del grupo control y 83 en el del grupo de SAF; esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$). En la región media el número medio de células contabilizadas fue de 78 en los embriones control y 92 en los de SAF, siendo también una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Finalmente, en la región posterior del paladar se obtuvieron unas medias de 83 células en los control y 96 en los del suplemento, siendo, una vez más, una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (fig. 28 D).

Por tanto, la proliferación de las células del EBM no es significativamente diferente entre los embriones cuyas madres fueron alimentadas con un SAF y los individuos control, pero el mesénquima palatino de los embriones tratados con SAF sí presentan una proliferación celular superior a los embriones control de manera estadísticamente significativa.

Tabla 17. Proliferación celular en embriones *Tgf- β_3* -/-: Número de embriones y número de secciones de cada uno de ellos que fueron empleados para la medida de la proliferación celular en el paladar de embriones de 14,5 DG de los grupos 3 (control) y 4 (dieta SAF).

PROLIFERACIÓN CELULAR (SAF)			
Dieta	Nº embriones	Región	Nº secciones
Control	8	Anterior	53
		Media	59
		Posterior	40
SAF	8	Anterior	43
		Media	44
		Posterior	42

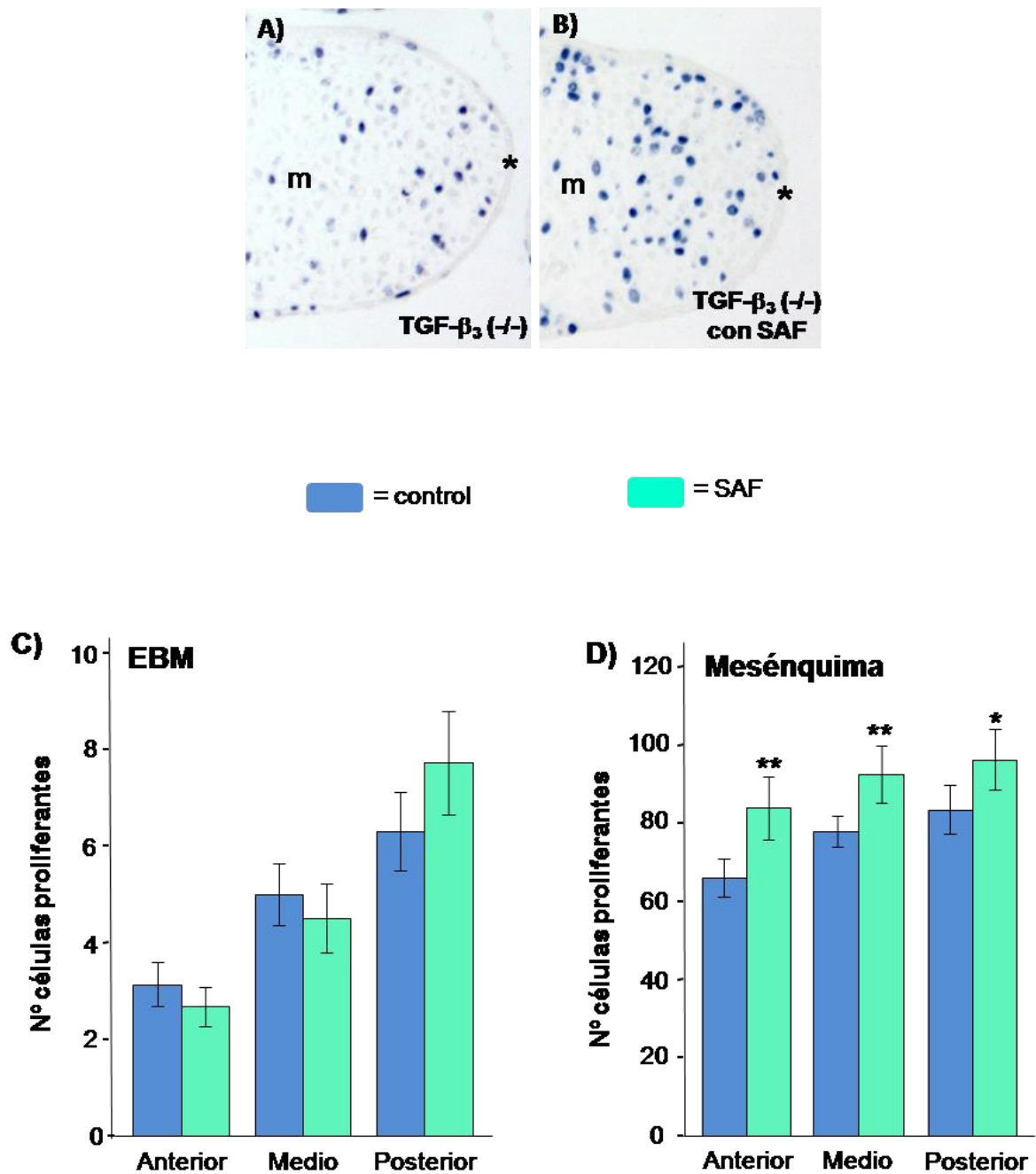


Figura 28. Proliferación celular en el paladar de embriones con SAF. La proliferación celular medida en embriones mutantes negativos para TGF- β_3 del grupo control (A) y del grupo cuyas madres fueron alimentadas con una dieta con SAF (B). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las medidas registradas en el EBM (C), pero en el mesénquima de los sometidos al SAF existe una proliferación celular superior a la aparecida en los embriones control de forma estadísticamente significativa (D). Asterisco en A,B: EBM; m: mesénquima; asterisco en D: $p < 0,05$; doble asterisco: $p < 0,01$.

6.3.3. Análisis de la adhesión y fusión de los procesos palatinos cultivados en presencia o ausencia de un suplemento de ácido fólico.

La presencia de adhesión y fusión en la zona media de los procesos palatinos de dos casos de los 29 fetos mutantes negativos con SAF frente a un sólo caso de los 29 fetos control dejaba duda respecto a un posible papel del AF en los mecanismos de adhesión y fusión de los procesos palatinos durante el desarrollo del paladar. Para analizarlo, se llevaron a cabo dos aproximaciones *in vitro*. En la primera se añadió AF al medio de cultivo de procesos palatinos de embriones *Tgf-β₃* homocigotos negativos procedentes de hembras alimentadas con dieta control (grupo 3). En la segunda, se cultivaron procesos palatinos de embriones *Tgf-β₃* *-/-* cuyas madres habían sido alimentadas con dieta con SAF (grupo 4).

Se realizaron cultivos con los paladares de 6 embriones homocigotos negativos del grupo 3 (tabla 18, figs. 29 A, B) y de 9 embriones homocigotos negativos del mismo grupo pero en cuyo medio de cultivo añadimos AF en una concentración 80 mg/l (tabla 18, fig. 29 C). Esa cantidad de AF es 20 veces superior a la de un medio de cultivo control, que posee los niveles fisiológicos de AF (4 mg/l). Este SAF añadido al medio de cultivo equivale al que contiene la dieta administrada a las hembras del grupo 4.

Tabla 18. Adhesión y fusión de los procesos palatinos con SAF: Número de embriones y número de secciones de cada uno de ellos que fueron empleados para la medida de la adhesión y fusión de los procesos palatinos cultivados de embriones homocigotos negativos para *Tgf-β₃* del grupo control 3, con y sin SAF en el medio de cultivo, y del grupo 4.

ADHESIÓN Y FUSIÓN (SAF)		
	Nº embriones	Nº secciones
Control	6	114
SAF en medio (80 mg/ml)	9	135
SAF en dieta (40 mg/kg)	6	105

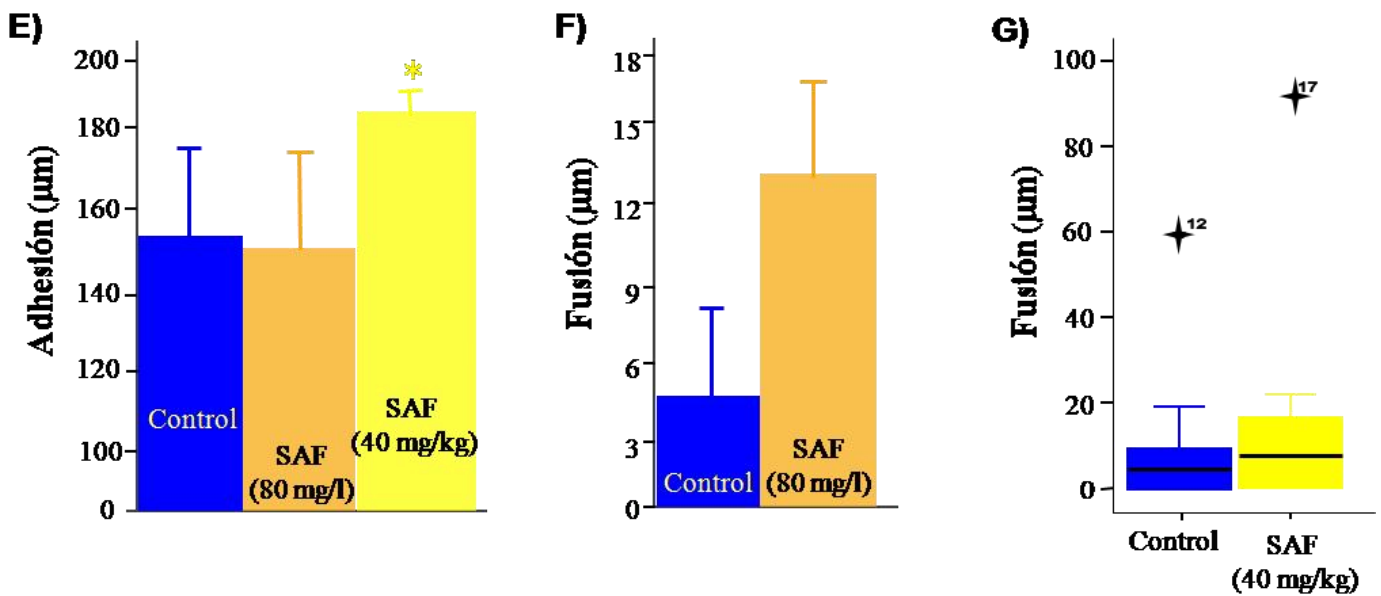
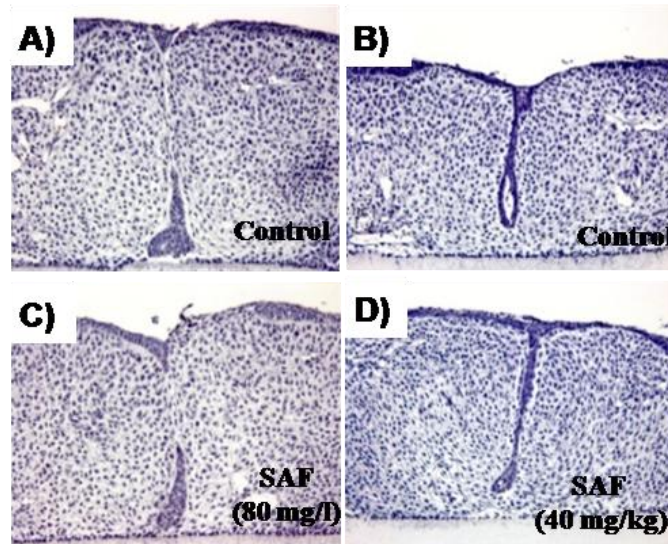


Figura 29. Adhesión y fusión en cultivos con SAF. Cultivos de procesos palatinos de embriones *Tgf-β₃*^{-/-} del grupo control (A, B) y de los grupos sometidos a SAF: SAF (80 mg/ml) añadido al medio de cultivo (C) y SAF (40 mg/kg) en la dieta materna (D). (E) Medias de la adhesión en los tres casos. No existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo que ha recibido el SAF en el medio de cultivo. Los que han recibido el SAF a través de la dieta materna sí muestran un aumento estadísticamente significativo de la adhesión. (F) La fusión media del grupo que ha recibido el SAF en el medio de cultivo es mayor que la media del grupo control, pero los datos no son estadísticamente significativos. (G) Los datos obtenidos al medir la fusión del grupo que ha recibido el SAF a través de la dieta materna se presentan como medianas por no seguir una distribución normal. No presentan diferencias respecto a los datos del grupo control. Asterisco: $p < 0,01$.

La medida de la adhesión y de la fusión producida entre los procesos palatinos se calculó en 114 secciones de los del grupo control y 135 de los sometidos al SAF (tabla 18). La adhesión media resultante en los controles fue de 151,15 micras y de 148,77 en los del SAF, no mostrando diferencias significativas (fig. 29 E). En cuanto a la fusión, los datos obtenidos fueron de 4,94 micras de media en los controles y 13,54 micras en los del suplemento (fig. 29 F), en este caso tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas.

También fueron analizadas la adhesión y la fusión de los procesos palatinos en 105 secciones de cultivos de 6 embriones hijos de hembras del grupo 4 y comparadas con 114 secciones de 6 embriones del grupo control 3 (tabla 18). En este caso se observó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,01$) de la adhesión, 183,41 micras de media frente a las 151,15 micras obtenidas en los control (fig. 29 E). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas respecto a la fusión. En este caso no pudimos obtener una media porque los datos no presentaban estadísticamente una distribución normal así que se empleó la mediana, que fue de 7,74 micras en los del SAF y 4,43 micras en los del grupo control (fig. 29 G).

En conclusión, la fusión no sufrió alteraciones por el SAF ni cuando fue administrado en el medio de cultivo ni cuando se administró a través de la dieta materna. Lo mismo ocurrió con la adhesión cuando el SAF fue adicionado al medio de cultivo. Sin embargo, cuando el SAF se proporcionó a través de la dieta materna la adhesión sufrió un aumento estadísticamente significativo.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1. Efectos de la dieta carente de ácido fólico en fetos de ratón C57.

Es bien conocido el hecho de que un déficit de AF provoca alteraciones durante el desarrollo embrionario, dando lugar a DTN (Feinleib y cols., 2001; Antony, 2007; Dunlevy y cols., 2007) y FLP (Hayes y cols., 1996; Burgoon y cols., 2002; Prescott y Malcom., 2002; Schubert y cols., 2002; Finnell y cols., 2004; Martinelli y cols., 2006). Aunque su relación con la aparición de DTN es aceptada sin reparos, no ocurre lo mismo respecto a las FLP, pues existen estudios epidemiológicos que no pudieron reflejar un descenso en la incidencia de las FLP tras el enriquecimiento alimenticio con AF (Elmazar y cols., 1992; Shaw y cols., 1995; Hayes y cols., 1996). Muchos autores creen que esto se debe a su estrecha relación con la carga genética, por lo que piensan que según la población estudiada el déficit de AF incide en la frecuencia de las FLP o no.

Además, son escasos los estudios en los que se valoran los efectos de una dieta CAF de forma experimental (Burgoon y cols., 2002; Craciunescu y cols., 2004; Li y Rozen, 2006) y los existentes no hacen referencia a la posibilidad de que los individuos experimentales que hayan sido sometidos al déficit de AF dietético sufran diferentes efectos según el tiempo que haya transcurrido desde el inicio de la dieta deficitaria.

Todo ello nos indujo a iniciar un estudio para determinar si el déficit de AF alteraba el desarrollo palatino de ratones C57, manejados habitualmente por este grupo de investigación, en función del tiempo que las hembras progenitoras pasaran sometidas a la dieta CAF.

Lo primero que decidimos fue investigar si la dieta CAF administrada tenía alguna repercusión sobre los niveles de folato hepático materno con respecto al grupo control, basándonos en las mediciones realizadas por otros autores en trabajos anteriores (Horne y cols., 1981; Hyun y Tamura, 2005). En nuestro estudio observamos que los niveles de folato medidos en las hembras del grupo experimental 2 sometidas a 2 y 4 semanas de dieta CAF eran similares entre sí e inferiores a los que presentaba el grupo 1, formado

por hembras alimentadas con dieta control. Los niveles de folato que presentaron los hígados de las hembras que habían pasado de 6 a 16 semanas con dieta CAF también eran similares entre sí, siendo inferiores a los registrados en los hígados de las de 2 y 4 semanas. Esta similitud de datos entre los grupos de 2-4 semanas y los de 6-16 semanas de dieta CAF también apareció reflejada al analizar las malformaciones presentadas por los fetos, que supusieron un porcentaje de fetos malformados inferior al 10% en los hijos de las de 2-4 semanas y superior al 30% en los de 6 semanas, llegando a ser de más del 70% a partir de las 8 semanas. Esto parece indicar que los fetos de hembras que han pasado un corto período de tiempo, de 2 a 4 semanas, bajo dieta CAF ya muestran alteraciones, pero estas se agravan mucho cuando el tiempo pasado con esa dieta supera las 4 semanas. Es posible que esto sea debido a que el AF es almacenado en el citoplasma celular (Foo y cols., 1982; Green y cols., 1988), siendo los hepatocitos las células que más folato almacenan (Horne y cols., 1978; Pita, 1998; Varela-Moreiras y Alonso-Aperte; 1999), y esa acumulación permitiría que las 4 primeras semanas sin ingerir AF no tuvieran gran repercusión porque el AF acumulado en el hígado sea suficiente para que los efectos de la deficiencia no afecten gravemente al desarrollo embrionario, pero tras cuatro semanas las reservas de folato se agotarían y al continuar sin recibir ningún aporte de esta vitamina los efectos serían de mayor gravedad.

Las malformaciones encontradas en los embriones sometidos al déficit de AF en el presente estudio son del mismo tipo que las halladas en los ratones mutantes con el gen *Folbp1* silenciado (Spiegelstein y cols., 2004): fallos en el cierre de la pared abdominal, agnatias, micrognatias, microftalmias, anoftalmias, diversos DTN (anecefalias, exencefalias, espinas bífidas) y FLP. El gen *Folbp1* expresa el principal receptor del folato, el FBP1 en ratón, y es esencial para que la vitamina llegue al interior celular y cumpla su función (apartado 1.5). Esto indica que las malformaciones surgidas en nuestros embriones son resultado del déficit de AF sufrido por las hembras progenitoras. De forma interesante, Oyama y colaboradores (2009) observaron que los fetos hijos de ratonas diabéticas presentaban malformaciones similares a los fetos hijos de hembras del grupo 2 de nuestro estudio (DTN, anomalías craneales y evisceraciones, entre otras) y que las malformaciones disminuían al proporcionar AF a las madres diabéticas.

Es interesante destacar que el porcentaje de fetos malformados no alcanzó el 4% en los individuos sometidos a 2 y 4 semanas de dieta CAF (3,92% y 3,77% respectivamente) pero llegó al 31,58% en el grupo de 6 semanas de dieta. El porcentaje siguió incrementándose con el aumento del número de semanas con carencia de AF en la dieta materna, manteniéndose alrededor de un 75% en los que sufrieron el déficit de 8 a 14 semanas. En el grupo de 16 semanas de dieta CAF el porcentaje de fetos malformados fue el más elevado, siendo de 87,50%.

También es interesante el hecho de que las hembras de los grupos de 14 y 16 semanas produjeron un bajo número de fetos. Una posible explicación de este hecho puede ser por las reabsorciones de los embriones muertos. Es decir, puede ocurrir que algunos embriones hayan tenido malformaciones letales y hayan sido reabsorbidos en estados muy iniciales del desarrollo embrionario, efecto conocido como teratanasia (Cipollone y cols., 2008). También puede haber ocurrido un aumento de los abortos espontáneos, los cuales han sido asociados a un déficit de AF en el trabajo de George y colaboradores (2002) y que se creen debidos a fallos graves a nivel del ADN. Un dato que puede confirmar esto es el hecho de que las hembras de nuestras colonias que llevaban más de 8 semanas con dieta CAF tenían más dificultades para quedarse preñadas. Lo mismo pudieron comprobar Santoso y Rhoman (2006) en su estudio, en el que administraban bajas dosis de AF a ratas, observando que cuando las dosis eran muy bajas era difícil que las hembras engendraran.

7.1.1. Efectos en la génesis de malformaciones congénitas.

Las malformaciones encontradas en nuestro estudio fueron de diversa índole, siendo las de menor incidencia las relacionadas con la región abdominal ya que sólo un 6,22% de los fetos analizados presentan hernia umbilical o evisceración. Estas malformaciones se han asociado anteriormente a déficits de AF: en algunos estudios se destaca que suelen aparecer asociadas a DTN como la anencefalia y/o la espina bífida (Chen, 2008a, b), mientras que otros autores proponen una posible relación entre una variante del gen de la 5-MTHF reductasa, cuya alteración equivaldría a un déficit de AF, pues es una enzima básica en el ciclo de los folatos (apartado 1.5), y la predisposición a sufrir onfalocele (Mills y cols., 2005), defecto de la pared abdominal que se sigue de herniación de las vísceras abdominales. Ciertos estudios epidemiológicos, asocian una reducción en la incidencia de esta anomalía con la toma de complejos multivitamínicos,

siendo el AF una de las vitaminas que los componen (Botto y cols., 2002; Simmons y cols., 2004), pero son muy escasos y no explican el origen de dicha relación.

Al igual que las malformaciones abdominales, se observaron en un 6,22% de los fetos malformaciones craneofaciales no palatinas, es decir, aquéllas en las que se veía afectada la lengua (aglosias, microglosias) o la mandíbula (agnatias, micrognatias). También son escasos los trabajos que se centran en la posible relación entre un déficit de AF y este tipo de anomalías, sobre todo en lo que a la lengua se refiere. Del Campo y colaboradores (1999) asociaron la administración de metotrexato, un inhibidor del ciclo del folato, con fallos en la formación de la mandíbula y en la osificación craneal, aunque no determinaron qué tipo de conexión puede existir entre el bloqueo del ciclo de los folatos y la aparición de dichas malformaciones. Otros autores han observado cómo el cartílago de Meckel, que es un inductor de la formación de la mandíbula, se ve afectado por el déficit de AF, lo que sugieren que ocurre porque este cartílago se origina a partir de CCN y el déficit de AF afecta a la dinámica de este tipo celular (Reynolds y cols., 2003; Firat y cols., 2005). Uno de los pocos estudios en que se hace referencia a la aparición de microglosia asociada al estado del folato es el de Xiao y colaboradores (2005), los cuales observaron que esta alteración era consecuencia de bloquear los receptores del folato y proponían que al inhibir el efecto del AF disminuía la proliferación de algunas células como las de la lengua.

Un 9,34% de los fetos analizados presentaron DTN (anencefalias, exencefalias, espinas bífidas), sin embargo cabe la posibilidad de que su incidencia sea mayor, dado que muchos DTN son incompatibles con la vida y quizás bastantes casos hayan terminado como abortos o como reabsorciones tempranas sin que hayamos podido registrarlos. Esta sugerencia está basada en que los DTN son las malformaciones congénitas más frecuentes después de las cardíacas (Pitkin, 2007). Resultan de un fallo en el cierre del tubo neural durante la embriogénesis, pudiendo ocurrir en la región caudal o en la craneal del tubo neural. La anomalía más común cuando el fallo ocurre en la región craneal es la anencefalia, en la que el cortex cerebral no se desarrolla, y cuando es en la caudal, la más habitual es la espina bífida (Pitkin, 2007). La relación del déficit de AF y la aparición de DTN es ampliamente aceptada desde la década de los años 50 (Laurence y cols., 1968; Shojania, 1984; Heid y cols., 1992; Wald y cols., 2001; Rothenberg y cols., 2004; Weingaertner y cols., 2005; Antony, 2007), aunque 50 años después se

siguen investigando las causas que relacionan directamente al AF y las células del tubo neural, pues aunque se trata de una relación ampliamente aceptada los mecanismos implicados en ella aún permanecen siendo desconocidos.

Las malformaciones más numerosas de nuestro estudio fueron las oculares, apareciendo en el 43,58% de los individuos analizados, lo que representaba el 96,55% del total de fetos malformados. Junto con la FP anterior, fueron las primeras anomalías en aparecer, concretamente en fetos cuyas madres sólo habían sido sometidas 2 semanas a dieta CAF. Aunque existe algún estudio epidemiológico que no ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre el descenso de anoftalmias y microftalmias con la ingesta de AF (Shaw y cols., 2007), en la mayoría se ha observado lo contrario. En estos estudios, lo que realmente se asocia a la alteración ocular es la hiperhomocisteinemia, pero un déficit de AF provoca un aumento en los niveles de Hcy, siendo ambos fenómenos normalmente equiparables (apartado 1.5.). Dado que el aumento de Hcy genera un descenso de la angiogénesis (Khandanpour y cols., 2009) a través de la alteración del factor de crecimiento del endotelio vascular –VEGF- (Latacha y Rosenquist, 2005) y enfermedades vasculares (Lee y cols., 2007) se puede pensar que la alteración de los niveles de Hcy por el descenso de los niveles de folato puede ocasionar una reducción de la luz de la arteria central de la retina, capaz de desembocar en microftalmias y anoftalmias (Wright y cols., 2008).

Estos datos, en los que las alteraciones oculares aparecieron casi en el 100% de los afectados, nos resultaron especialmente llamativos debido a los pocos trabajos de investigación que existen al respecto. Es posible que su incidencia sea mayor que la de los DTN pero sus efectos no sean tan graves, ya que no son incompatibles con la vida, y por ello hayan sido analizados por menor número de investigadores. En nuestro caso hemos decidido estudiarlos con mayor detenimiento en otro trabajo (Maestro y cols., en preparación).

7.1.2. Efectos sobre el desarrollo morfológico del paladar.

El 51,51% de los individuos con malformaciones craneofaciales presentaron aquellas malformaciones que representan el objetivo inicial de nuestro estudio: las malformaciones palatinas. Observamos 3 tipos diferentes de estas alteraciones: FP anterior, FP completa y lo que denominamos “paladar plegado”.

Detectamos una FP anterior, la cual sólo pudo apreciarse a nivel histológico, en un individuo de los 51 analizados cuyas madres fueron alimentadas durante 2 semanas con dieta CAF. De hecho, fue la única malformación detectada, junto con un caso de alteración ocular, en los fetos cuyas madres pasaron 2 semanas con dieta CAF. En los 8 fetos obtenidos de hembras alimentadas durante 16 semanas con dieta CAF apareció otra fisura del mismo tipo. En total, de los 257 fetos analizados del grupo 2, fueron 2 individuos los que presentaron FP anterior. Esto supuso que un 0,78% de los fetos analizados de 17 DG presentaban ese tipo de FP. Aunque fuera un porcentaje poco elevado creemos importante el hecho de que tras 2 semanas de dieta CAF el desarrollo embrionario del paladar ya puede aparecer alterado, ya que ninguno de los 35 fetos control presentó FP anterior ni se ha encontrado ningún otro que la presente en experimentos previos a este trabajo en nuestro laboratorio.

En los fetos de 17 DG hijos de hembras del grupo 2 que analizamos fueron más numerosas las fisuras palatinas completas. En concreto, 8 individuos de los 257 totales presentaron esta patología, lo que supone un 3,11%. Curiosamente sólo a partir de las 8 semanas de dieta CAF empezó a aparecer este tipo de fisura. En total obtuvimos 3 individuos de los 29 (10,34%) afectados por las 8 semanas de déficit de AF, 4 de 58 (6,90%) de 10 semanas y 1 de 31 (3,22%) de 12 semanas de dieta. Una vez más, como ocurría al observar el número total de fetos malformados, la primera FP completa apareció cuando las madres habían pasado más de 4 semanas con dieta CAF, concretamente a partir de las 8 semanas, lo que se corresponde con la diferencia en los niveles de folato hepático medidos. Estos niveles fueron inferiores a los del grupo control (33,9 µg/g) pero en las hembras de 2 y 4 semanas de dieta CAF la reducción era de la mitad (15 µg/g) y en las de más de 6 semanas la reducción era aún mayor (5,2µg/g). El hecho de que a las 6 semanas de déficit de AF no halláramos individuos con FP, aunque los niveles de folato hepático fueran similares a los de 8 semanas, puede deberse al bajo número de fetos obtenidos en este grupo (n=19). En un principio se podría esperar que a mayor número de semanas con dieta CAF mayor sería el número de individuos con FP; sin embargo no encontramos ningún caso ni cuando las hembras pasaron 14 semanas con dieta CAF ni cuando pasaron 16 semanas. Curiosamente estos fueron los grupos con mayor porcentaje de fetos malformados (75,00% y 87,50% respectivamente), lo que hace pensar que esto es debido a la escasa casuística de estos grupos (n=8 cada uno).

Nuestros resultados en cuanto a la aparición de FP en fetos cuyas madres fueron sometidas a dieta CAF concuerdan con el estudio realizado por Burgoon y colaboradores (2002), que administraron la misma dieta empleada por nosotros durante 4 semanas, lo que encontraron fue un retraso en el desarrollo del paladar en día 15 de gestación, que se recuperaba en día 18. Es probable que si estos autores hubieran prolongado las semanas de dieta hubieran obtenidos resultados similares a los apreciados por nosotros.

Un resultado interesante de nuestra investigación es el que se refiere a la aparición de lo que hemos denominado “paladar plegado”. En estos casos, aunque macroscópicamente el paladar aparentaba estar fisurado, la observación microscópica revelaba que los procesos palatinos se habían fusionado en la línea media, pero el paladar se había plegado como las hojas de un libro siguiendo un eje sagital y medio, lo que hacía que pareciera una hendidura. El primero de los casos surgió en los individuos cuyas madres permanecieron 6 semanas con dieta CAF y siguieron apareciendo casos en los grupos de mayor número de semanas, excepto en los fetos de hembras que pasaron 12 semanas con dieta CAF.

No hemos analizado en profundidad las razones que han podido causar la aparición de esta malformación, pero una posible explicación es que una hipoplasia del paladar en la línea media o del tabique nasal, con un crecimiento adecuado aunque en una posición anómala del resto del maxilar, haya causado un movimiento en bisagra de toda la región lateral del macizo facial por un crecimiento diferencial, mayor en la porción lateral y menor en la medial. Otra posibilidad es que la disminución en la osificación del paladar, que hemos registrado ya en los individuos cuyas madres permanecieron 4 semanas con dieta CAF y que se va incrementando con el aumento de las semanas de dieta, haga que éste presente menor resistencia y permita la posibilidad de plegamiento. Este tipo de malformación también podría ser derivada de la existencia de aglosia, pues todos los fetos que presentaron paladar plegado también carecían de estructura lingual. Ya que la presencia física de la lengua en el interior de la boca es un factor determinante del crecimiento en anchura del paladar, quizás la existencia de la lengua hubiera impedido que el paladar se plegara simplemente por ocupación física. Por otra parte, tanto el posible déficit de osificación como la aparente hipoplasia del paladar están probablemente relacionados con la alteración de la proliferación celular que hemos

observado en el mesénquima palatino ya en los individuos procedentes de hembras sometidas 2 semanas a dieta CAF (apartado 7.1.3.).

Nuestro estudio es el primero en demostrar experimentalmente que, aunque el paladar pueda verse ligeramente afectado por la dieta materna CAF tras poco tiempo de actuación (2 semanas), después de un período mayor (8 semanas) aparece FP completa. Estos datos reafirmaban que el déficit de AF debía afectar a la palatogénesis de alguna manera y nos permitió considerar que los embriones cuyas madres habían sido alimentadas durante 2 y 8 semanas con dieta CAF podían ser los más interesantes para profundizar en el estudio de la alteración de los mecanismos básicos implicados en el desarrollo embrionario del paladar, dado que la primera FP anterior apareció tras 2 semanas de dieta CAF y la primera FP completa lo hizo tras 8 semanas de dieta.

7.1.3. Efecto sobre los mecanismos implicados en la palatogénesis.

Uno de los mecanismos esenciales en la palatogénesis es la proliferación celular del mesénquima palatino (apartado 1.1.), ya que inicialmente los procesos palatinos deben crecer lo suficiente para llegar a contactar y ese crecimiento es debido, en parte, a la proliferación de las células que los componen. De hecho, se sabe que una alteración de la proliferación celular puede desencadenar FP (Rice y cols., 2004; Yu y cols., 2005; Lu y cols., 2008). Existen cepas mutantes de ratón que presentan FP completa debido a las mutaciones que poseen, como los *Wnt5a* *-/-* (He y cols., 2008) y los *Tgf-β3* *-/-* (Xu y cols., 2006; Del río y cols., 2011), y que muestran alterada la proliferación de las células que componen los procesos palatinos.

Ya ha sido comentado cómo la proliferación celular se ve afectada por el déficit de AF, al existir una estrecha relación entre esta vitamina y las bases purínicas y pirimidínicas (apartado 1.5). Dado que el AF es esencial en la síntesis de dichas bases nitrogenadas, su déficit provocará una disminución de éstas y ello afectará al ADN, que no podrá replicarse adecuadamente, lo que se traduce en un descenso de la proliferación celular (Craciunescu y cols., 2004; Courtemanche y cols., 2004; Li y Rozen, 2006; Xiao y cols., 2006). Comprobamos que los embriones hijos de hembras sometidas 2 semanas a dieta CAF presentaban un descenso estadísticamente significativo en la proliferación celular tanto en el EBM como en el mesénquima palatino respecto a los embriones control. Además de observarlo en procesos palatinos de embriones de 14,5 DG, cultivos de

procesos palatinos de embriones de 13,5 DG del mismo grupo mostraron nuevamente un descenso similar del número de células proliferantes.

Cabe la posibilidad de que el déficit de AF afecte a determinados factores de crecimiento implicados en la proliferación celular del paladar en desarrollo. Por ejemplo, Crott y colaboradores (2004) observaron un descenso en los niveles del factor de crecimiento IGF-BP3 (insuline-like growth factor binding protein 3) en células del colon de rata sometidas a una dieta CAF. Este descenso provoca el aumento de IGF-1 (insuline-like growth factor-1) que desencadena una inhibición de la proliferación celular (Buckbinder y cols., 1995). En el paladar podría ocurrir algo similar con el EGF (epidermal growth factor), ya que es un factor fundamental durante la palatogénesis (Ferguson, 1988), concretamente, por su estrecha relación con el proceso de proliferación celular (Tyler y Pratt, 1980). De hecho, Del Río y colaboradores (2011) observaron cómo en los procesos palatinos de los embriones de ratón *Tgf-β3* *-/-* los niveles de EGF son más elevados que en los procesos palatinos de individuos silvestres y cómo la proliferación celular palatina también es mayor en dichos mutantes. Experimentos recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio han revelado cómo en el mesénquima palatino de los embriones descendientes de hembras sometidas a 2 semanas de dieta CAF la expresión de EGF aparece disminuida (datos no publicados), lo que concuerda con la reducción de la proliferación celular de las células palatinas de los embriones del mismo grupo mencionados anteriormente. Además, existen estudios como el de Jaszewski y colaboradores (1999) en los que se detecta una relación entre la administración de AF y los niveles del receptor de EGF, lo cual repercute en la proliferación de las células cancerígenas estudiadas. Por todo ello, podemos plantear que en nuestro sistema el déficit de AF puede afectar a los niveles de EGF y esto repercutir en la proliferación celular del paladar.

Otro posible factor causante de la aparición de los casos de FP que hemos obtenido podría residir en una alteración de los fenómenos de adhesión y fusión de los procesos palatinos. Si los procesos son capaces de llegar a poner en contacto sus epitelios del borde medial se desencadena la adhesión y, si esto ocurre, aparece la CEM. Esta costura es tejido epitelial y debe desaparecer hasta que únicamente quede tejido mesenquimático en la línea media. Cuando esto ocurre, la fusión de los procesos palatinos se ha producido correctamente y el paladar estará formado (apartado 1.1.).

Para analizar el efecto que podía tener la deficiencia de AF en la adhesión y fusión del paladar se realizaron cultivos organotípicos con los paladares de embriones hijos de las hembras de los grupos 1 y 2. Se observó que en los cultivos con los procesos palatinos de los embriones correspondientes al grupo 2 tanto la adhesión como la fusión registradas fueron inferiores, de forma estadísticamente significativa, a las registradas en los cultivos control. Esto significa que los procesos palatinos de los embriones deficitarios no sólo no contactan bien, por el defecto en la proliferación de su mesénquima, sino que las células de sus epitelios del borde medial no se adhieren convenientemente.

El por qué puede verse reducido el fenómeno de adhesión celular frente al déficit de AF podría explicarse porque dicho déficit estuviera ocasionando alguna perturbación relacionada con la MEC (apartado 1.1). La importancia de las moléculas de adhesión en la palatogénesis, tanto las que forman parte de la MEC como las presentes en las membranas celulares, ha sido demostrada con anterioridad por nuestro grupo de investigación, y moléculas como E-cadherina (y las que componen su sistema $-\alpha$ y β -catenina), integrinas α y β , fibronectina, laminina, los colágenos IV y IX, nectin-1 y el proteoglicano condroitin sulfato se han revelado cruciales en el proceso de adhesión de los procesos palatinos (Martínez-Álvarez y cols., 2000; Tudela y cols., 2002; Gato y cols., 2002; Martínez-Sanz y cols., 2008).

No hay conocimiento sobre el efecto del déficit de folato en las moléculas implicadas en la adhesión de las células del paladar embrionario pero sí en otros sistemas, lo que nos hace pensar la posibilidad de que el déficit de AF ejerza una acción similar en él. Por ejemplo, Jhaveri y colaboradores (2001) observaron, en células de carcinoma nasofaríngeo, cómo el descenso de adhesión celular podía deberse al descenso de H-cadherina provocado por el déficit de AF. Una situación similar fue descrita por Crott y colaboradores (2008) en células del colon de ratas sometidas a un déficit de AF, donde observaron un descenso de la H-cadherina y de la proto-cadherina. A su vez, Zhu y colaboradores (2007) analizaron la expresión de diferentes genes en ratones *Folr1* $-/-$, cuyo gen bloqueado les impide expresar el receptor de folato, lo que equivale a un déficit de la vitamina. Observaron que en estos mutantes la expresión de los genes *Nkd* estaba aumentada, lo que genera un bloqueo de la expresión de genes *Wnt*, los cuales están implicados en la adhesión celular a través de las cadherinas.

Por otra parte, el déficit de folato puede afectar también a la dinámica de las MMP: moléculas proteolíticas que se activan en determinados momentos del desarrollo embrionario y que llevan a cabo la remodelación de la MEC (apartado 1.1), lo que las hace esenciales durante fenómenos como la palatogénesis (Brown y cols., 2002; Blavier y cols., 2001). De hecho, se conoce la existencia de casos en los que la aparición de fisuras palatinas está asociada a alteraciones en la dinámica de las MMP (Brown y cols., 2002; Letra y cols., 2007; Meng y cols., 2009). Cuando la actividad de las MMP es anómala se produce un desequilibrio en la composición de la MEC, como un acumulo excesivo de colágeno en hueso, debilitando los huesos afectados (Tyagi y cols., 2011), o un desequilibrio de los diferentes colágenos que forman la oreja, alterando su correcto desarrollo (Kundu y cols., 2009). La alteración más estudiada provocada por la hiperhomocisteinemia, efecto relacionado con un déficit de AF (apartado 1.5), es la que provoca la activación de la MMP-9. Ésta permanece inactiva por la acción del óxido nítrico pero unos elevados niveles de Hcy generan un estrés oxidativo que lo convierte en peroxinitrito y éste desencadena la activación de la MMP-9 (Holven y cols., 2003; Brassard y cols., 2005; Moshal y cols., 2006; Liu y cols., 2008; Tyagi y cols., 2011; Munjal y cols., 2011). Sin embargo, no es la única MMP que se ha visto alterada cuando los niveles de Hcy son anómalos, pues también se ha detectado alteración de MMP-2 en células musculares (Guo y cols., 2006) y de MMP-2 y MMP-14 en tejido cloquear (Kundu y cols., 2009). Aunque ninguno de los trabajos mencionados se ha realizado en paladar embrionario, podríamos pensar que dichas alteraciones debidas al déficit de folato son perfectamente posibles también en él y por ello creemos que será un interesante estudio que desearíamos realizar en un futuro cercano.

En los cultivos de procesos palatinos de embriones cuyas madres fueron alimentadas con dieta CAF se detectó, además de un descenso de la adhesión de los epitelios del borde medial, un descenso de la fusión de los procesos palatinos (desaparición de la CEM en las zonas en las que ésta se formó). Si no existe una correcta adhesión de epitelios del borde medial no existirá una fusión adecuada, ya que es un fenómeno posterior, pero también puede existir una afectación directa de la propia fusión. Este proceso se debe a tres mecanismos: la TEM, la migración celular y la muerte celular programada o apoptosis (apartado 1.1); si existen alteraciones en alguno de ellos se traducirá en una incorrecta fusión.

De esos tres mecanismos, es el de la muerte celular el más relevante (Martínez-Álvarez y cols., 2000a; Cuervo y cols., 2002; Cuervo y Covarrubias, 2004; Vaziri Sani y cols., 2005) y es por ello que decidimos analizar si un déficit de AF causaba algún efecto sobre la muerte celular de la CEM. Para ello se realizaron cultivos de procesos palatinos de embriones de los grupos 1 y 2. Nuestros resultados ponen de manifiesto que un déficit de AF se traduce en un aumento de la muerte celular en la CEM de los procesos palatinos adheridos.

La relación entre el déficit de AF y el aumento de la apoptosis o muerte celular programada ha sido ampliamente estudiada en diversos tipos celulares, principalmente del sistema nervioso (Kruman y cols., 2002; Craciunescu y cols., 2004; Tang y cols., 2005; Li y Rozen, 2006; Ramírez y cols., 2007; Zhang y cols., 2009), pero también en células hepáticas (Huang y cols., 1999; Chern y cols., 2001), endoteliales (Alam y cols., 2009), en cardiomiocitos (Levrant y cols., 2007) y, más escasamente, del mesénquima palatino (Knott y cols., 2003). Todos estos trabajos coinciden en que el déficit de folato desencadena un aumento en los niveles de Hcy (hiperhomocisteinemia), ya que un déficit de la vitamina genera que el aminoácido no se transforme en Met y, por tanto, se acumule incrementando su cantidad (apartado 1.5.). Es este acúmulo de Hcy el principal responsable de desencadenar la muerte celular por diferentes vías: la que genera el estrés oxidativo (Chern y cols., 2001; Knott y cols., 2003; Levrant y cols., 2007), a través de la activación de caspasas (Levrant y cols., 2007; Alam y cols., 2009; Zhang y cols., 2009) y, en el menor de los casos, vía activación de la proteína p53 (Kruman y cols., 2002).

El único estudio realizado sobre la implicación del déficit de AF en la muerte de las células del paladar embrionario es el que realizaron Knott y colaboradores (2003) en células del mesénquima palatino humano y llegaron a la conclusión de que el aumento de la muerte registrado se debía al estrés oxidativo que generan los altos niveles de Hcy provocados por el déficit vitamínico. Recientemente, Yao y colaboradores (2011) observaron cómo altas dosis de ácido transretinoico, causantes de FP, generan un aumento de células apoptóticas en el mesénquima de procesos palatinos cultivados de embriones de ratón y cuando añadían AF junto con el ácido transretinoico los niveles de muerte celular se asemejaban a los del grupo control. Concluyen que el ácido transretinoico activa la caspasa-9 y el AF actúa como antagonista inhibiéndola, por lo

que no deberíamos descartar la posibilidad de que el déficit de AF provoque la activación de ciertas caspasas. Aunque estos estudios se centren en las células mesenquimáticas y en nuestro caso medimos la muerte en células epiteliales de la CEM, podemos suponer que el mecanismo por el que aumenta el porcentaje de mortalidad celular será muy similar al encontrado en las células del mesénquima.

Otra posible explicación a tener en cuenta es que cuando el ciclo de los folatos se altera por un déficit de AF se produce un descenso en la producción de bases púricas y pirimidínicas (apartado 1.5), lo que afecta al conjunto de nucleótidos. Debido a esto, el ADN en replicación sufrirá fallos graves que desencadenará la muerte de las células (James y cols., 1997; Huang y cols., 1999; Levrant y cols., 2007; Ramírez y cols., 2007).

El hecho de que la muerte celular de la CEM de cultivos de procesos palatinos de embriones deficitarios en AF se haya incrementado y a la vez se observe una reducción de la desaparición de la CEM (fusión) puede parecer contradictorio. Sin embargo, este hecho está sugiriendo que los otros mecanismos por los que desaparecen las células de la CEM (EMT y migración celular a epitelios adyacentes) deben estar alterados, impidiéndose que, aún habiendo mayor número de células que mueren, la CEM desaparezca adecuadamente. En los procesos de TEM y migración celular la implicación de las moléculas de MEC es crucial (Hay, 1995) y estudios realizados en nuestro laboratorio en paladares de embriones deficitarios en AF demuestran que parte de estas moléculas están alteradas (datos no publicados).

7.1.4. Efecto sobre la expresión de *Tgf-β₃* en el paladar embrionario.

Como ha sido comentado en el apartado anterior, hemos observado que el déficit de AF en la dieta materna altera los mecanismos básicos implicados en la palatogénesis y se han expuesto diversas teorías por las que puede llevar a cabo dichas alteraciones. Otra posible explicación de cómo afecta el déficit vitamínico al desarrollo embrionario del paladar puede ser la existencia de una relación con factores de crecimiento fundamentales en dicho proceso como los TGF-β en general y, particularmente, con TGF-β₃, que es el más relevante durante la formación del paladar (apartados 1.2. y 1.4.).

Partiendo del hecho de que existen estudios que han relacionado un déficit de AF con la alteración de la expresión de ciertos factores de crecimiento (EGFR - Jaszewski y cols., 1999; EGF - Hise y cols., 2001; *Tgf- α* - Jugessur y cols., 2003; *Tgf- β_1* e IGF-1 - Santoso y Rohman, 2006) y de la importancia de los TGF- β en este sistema, decidimos investigar si la expresión de *Tgf- β_3* también estaba alterada por dicho déficit vitamínico.

Los embriones del grupo 2 cuyas madres estuvieron 2 semanas bajo dieta CAF presentaron una ligera disminución de la expresión de *Tgf- β_3* en los epitelios del borde medial respecto a los embriones del grupo control. Pero en embriones hijos de hembras sometidas 8 semanas a dieta CAF, que fue en los que aparecieron las primeras fisuras palatinas completas, la expresión de *Tgf- β_3* aparece claramente disminuida respecto a la encontrada en los embriones control y es evidente a lo largo de todo el EBM de todos los individuos analizados.

Según los datos obtenidos sobre los niveles de AF en hígado, el descenso de estos niveles en las hembras que habían pasado de 2 a 4 semanas con dieta CAF no era tan elevado como en las que llevaban entre 6 y 16 semanas, situación que volvía a apreciarse al analizar las malformaciones encontradas, que eran más abundantes a partir de las 6 semanas de dieta. Una vez más, podemos pensar que cabe la posibilidad de que tras 2 semanas de dieta el AF acumulado en el hígado de las hembras sea suficiente para no provocar graves alteraciones pero a partir de las 4-6 semanas ya no quedaría nada acumulado y seguirían sin recibir ningún aporte dietético, lo que explicaría por qué en los individuos de 2 semanas de dieta CAF parece existir una disminución menor de la expresión de *Tgf- β_3* que la que presentaron los hijos de las hembras que pasaron 8 semanas con dieta CAF.

Posiblemente la forma en que el AF actúa sobre el gen de *Tgf- β_3* sea a través de la metilación del ADN, dado que el folato es esencial para obtener grupos metilo que serán los que se unan a zonas concretas del ADN como las islas CpG, determinando así el patrón de expresión genético (apartado 1.5). Son múltiples los trabajos en los que se asocian diferentes patologías con los niveles de folato y/o los de Hcy y con la alteración de la metilación genética, como distintos tipos de cánceres (Jaszewski y cols., 1999; Arasaradnam y cols., 2008), DTN (Björklund y Gordon, 2006) o aterosclerosis (Zaina y cols., 2005). También son diversos los trabajos en los que se deduce que la actuación

del AF seguramente sea a través de los cambios en los patrones de metilación (Jaszewski y cols., 1999; Crott y cols., 2008; Zhang y cols., 2008). Por todo ello, muy posiblemente la relación AF y expresión de *Tgf-β₃* se encuentre en la necesidad de unos determinados niveles de grupos metilos para una correcta metilación que desencadene una expresión génica adecuada.

Por otra parte, el hecho de que el déficit de AF afecte a la expresión de *Tgf-β₃* en el paladar y, por ende, de otras estructuras embrionarias, también podría guardar relación con la dinámica de las CCN. Las CCN surgen del tubo neural y emigran en un estado muy temprano del desarrollo embrionario (8-9 DG en ratón) a sus múltiples destinos donde darán lugar a diferentes estructuras, entre otras, los huesos faciales y los craneales, excepto la región occipital y la ótica (revisado por Chai y cols., 2000). Para que una CCN se transforme en un tipo celular u otro son esenciales las señales que va a recibir cuando comience su migración y/o allí donde llegue. Entre las señales más importantes a la hora de decidir su destino se encuentran las que generan los miembros de la familia de los TGF-β, TGF-β₃ entre ellos (Shah y cols., 1996; Dorsky y cols., 2000; Chai y cols., 2003; Ito y cols., 2003). De hecho, los TGF-β pueden provocar la muerte o la diferenciación de las CCN según la concentración, momento y lugar de la expresión (Hagedorn y cols., 2000; Chai y Maxson, 2006).

Basándonos en lo anteriormente expuesto podríamos plantear que si un déficit severo de AF puede generar un descenso en la expresión de *Tgf-β₃*, además de afectar a la palatogénesis directamente, también lo hará a la diferenciación y/o emigración de las CCN requeridas para la formación del paladar. Boot y colaboradores (2003) mostraron cómo un exceso de Hcy (directamente relacionado con el déficit de AF) afecta a la diferenciación de las CCN *in vitro* y Rosenquist y colaboradores (2007), cómo aumentos en los niveles de Hcy alteran la migración de las CCN y esto desemboca en DTN.

Ello también podría explicar por qué algunas de las malformaciones encontradas en nuestros fetos son similares a las que registraron Sanford y colaboradores (1997) al trabajar con ratones mutantes que presentaban el gen *Tgf-β₂* bloqueado, los cuales presentan FP y/o micrognatia (aunque no en el 100% de los casos). Según el estudio de Dorsky y colaboradores (2000), durante la emigración de las CCN hay una fuerte

expresión de *Tgf-β₂* y *Tgf-β₃* en el ectodermo y otra más débil en el tubo neural y los somitos. Según nuestros datos, podemos plantear que si se reduce la expresión de *Tgf-β₃* cabe la posibilidad de que aquella que es más débil se llegue incluso a ver suprimida.

A este posible efecto hay que sumarle la ya expuesta alteración de la proliferación celular debida al déficit de AF dietético. Las CCN, al igual que todas las células del tubo neural, tienen una elevada capacidad proliferativa y requieren altas dosis de AF para multiplicarse de forma adecuada (Spiegelstein y cols., 2004); por lo que al disminuir el AF se puede ver mermada la proliferación y alterado su patrón de actuación por los mismos motivos explicados en el apartado anterior (7.1.3.), en el que analizábamos los resultados obtenidos en las células proliferantes de los procesos palatinos empleados en nuestros experimentos.

7.1.5. Papel de TGF-β₃ exógeno en la reversión de los efectos adversos del déficit de ácido fólico en el desarrollo del paladar.

Al observar que el descenso de los niveles de AF provocaba una disminución en los de TGF-β₃ y sabiendo lo importante que es este factor en los mecanismos básicos de la palatogénesis (apartados 1.3. y 1.4.), decidimos investigar si TGF-β₃ administrado exógenamente es capaz de revertir los efectos adversos causados por el déficit de AF en la dieta materna. Resultados positivos en este sentido supondrían un beneficio científico doble. Por un lado, demostrarían que el déficit de TGF-β₃ está en las causas de la alteración de los mecanismos de la palatogénesis producida por el déficit de AF. Por otro lado, apuntarían hacia una posibilidad futura de prevenir la aparición de FP en niños cuyas madres tienen alterado el metabolismo del AF, bien por déficit de ingesta o de origen metabólico o iatrogénico (medicamentos que interfieren con su metabolismo).

Para llevar a cabo este objetivo, planteamos analizar la proliferación, adhesión, fusión y muerte celular en cultivos de procesos palatinos de embriones hijos de hembras sometidas 2 semanas a dieta CAF añadiendo dosis fisiológicas de TGF-β₃ al medio de cultivo. El resultado fue que, en todos los casos, se recuperaron los niveles presentados por los procesos palatinos de embriones control. Es decir, si el déficit de AF generaba una menor adhesión, fusión y proliferación celular en los procesos palatinos cultivados, en presencia de TGF-β₃ en el medio de cultivo, los niveles aumentaban hasta alcanzar valores estadísticamente iguales a los presentados por los cultivos realizados con

procesos palatinos de embriones control. De forma interesante, el aumento de muerte celular generado por el déficit de AF en la CEM de los cultivos era reducido hasta los valores de los casos control ante la presencia de TGF- β_3 en el medio de cultivo.

Todo ello nos lleva a confirmar la existencia de una estrecha relación entre AF y TGF- β_3 en el paladar, y que ésta sea una explicación de peso para relacionar la deficiencia de AF y la aparición de FP. Pero además, nos muestra a TGF- β_3 como un regulador de actividades como la apoptosis. Esto supone una visión novedosa de este factor, ya que generalmente se acepta que es un inductor de apoptosis en células epiteliales del paladar (Martínez-Álvarez y cols., 2000a; Massagué y cols., 2000; Nakamura y cols., 2009) pero nuestros resultados muestran cómo en este caso lo que hace es disminuirla y restablecer los niveles fisiológicos. Por ello, TGF- β_3 en el paladar, al igual que ante las CCN, seguramente no tenga unas funciones definidas, sino que estas dependerán de su concentración y de las señales del ambiente circundante en cada momento.

7.2. Efectos de la dieta con suplemento de ácido fólico sobre el paladar de los mutantes homocigotos negativos para *Tgf- β_3* .

Es ampliamente aceptado el hecho de que un suplemento dietético de AF es beneficioso para prevenir DTN (Laurence y cols., 1968; Shojania, 1984; Heid y cols., 1992; Wald y cols., 2001; Rothenberg y cols., 2004; Weingaertner y cols., 2005; Antony, 2007), pero no ocurre lo mismo frente a su posible beneficio frente a las FLP (Fraser y Warburton, 1964; Hayes y cols., 1996; Czeizel y cols., 1999). Existe una gran controversia en aceptar que un SAF sea beneficioso para prevenir FLP, pero además no existe unanimidad en si es mejor administrado solo o formando parte de un suplemento multivitamínico (Heid y cols., 1992; Shaw y cols., 1995; Czeizel y cols., 1999; Ray y cols., 2003; Yazdy y cols., 2007).

Por el reducido número de estudios experimentales existentes sobre el efecto del SAF en el desarrollo del paladar y dado el conocimiento de este grupo de investigación en los procesos implicados en la palatogénesis del ratón C57 mutante negativo para *Tgf- β_3* , el último objetivo del presente estudio pretende determinar si un SAF 20 veces superior a los niveles fisiológicos puede mejorar la FP completa que presentan los embriones de

ratón C57 con el gen de *Tgf-β₃* bloqueado. El modelo de ratón mutante negativo para *Tgf-β₃* se tomó como modelo de FP de origen genético teniendo en cuenta que estos ratones no presentan ninguna otra malformación craneofacial y que, por tanto, la FP es causada únicamente por la mutación del gen.

Aunque actualmente el suplemento recomendado a las mujeres embarazadas es de 4 veces superior a los niveles fisiológicos, en nuestro estudio decidimos utilizar una cantidad mucho mayor pensando en la posibilidad de potenciar el posible efecto beneficioso de la elevada dosis y sabiendo que los posibles efectos tóxicos de tan elevada cantidad habían sido descartados anteriormente en los trabajos de otros investigadores (Varela-Moreiras y cols., 1991; Moreiras y cols., 1998; Achón y cols., 1999).

7.2.1. Análisis de las fisuras palatinas de fetos homocigotos negativos para *Tgf-β₃* sometidos a un suplemento de ácido fólico en la dieta materna.

En primer lugar se analizaron los niveles de folato en el hígado de las hembras del grupo 4, para saber si la dieta con el SAF administrada estaba siendo efectiva. Los niveles aparecieron aumentados significativamente respecto a las hembras control, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las hembras que habían permanecido diferentes semanas alimentadas con dieta con SAF. Por este motivo no realizamos distinción del número de semanas durante el que las hembras se alimentaron de la dieta con SAF entre los datos obtenidos posteriormente. Este hecho puede deberse a que la capacidad del hígado para la acumulación de folato tenga un límite y, una vez alcanzado, por mayor que sea la ingesta de AF, éste no seguirá siendo almacenado.

Los fetos de ratón C57 *Tgf-β₃* *-/-* presentan una FP completa excepto en el 3,4% de los casos, en el que pudimos observar una fisura parcial: las porciones anterior y posterior de los procesos palatinos estaban separados, existiendo una zona central de adhesión entre ellos. Al analizar los fetos de 17,5 DG cuyas madres fueron sometidas a dieta con SAF observamos que todos presentaron fisura, pero el 17,24% eran fisuras palatinas completas con los procesos palatinos muy cercanos o fisuras palatinas parciales como las antedichas. Esto indica que la dieta con SAF habría generado un aumento de la incidencia de una FP más leve. Es más, los que presentaron fisura parcial incluso

presentaban zonas de contacto donde además de adhesión había tenido lugar fusión, es decir, había desaparecido el tejido epitelial, algo que no se observa en el paladar de los embriones *Tgf-β₃* *-/-* control (Proetzel y cols., 1995). No esperábamos la aparición de individuos *Tgf-β₃* *-/-* sin FP, dado que en este caso la fisura surge por la ausencia de expresión de *Tgf-β₃*, y el AF no podía forzar a los genes silenciados a generar dicho factor de crecimiento. Por ello pensamos que el SAF podía estar potenciando los mecanismos básicos implicados en la palatogénesis como la proliferación celular, la adhesión y la fusión de los procesos palatinos.

7.2.2 Efecto del suplemento dietético de ácido fólico sobre la proliferación celular del paladar de embriones *Tgf-β₃* *-/-* .

Como se ha comentado anteriormente, los procesos palatinos de los mutantes *Tgf-β₃* *-/-* no se fusionan correctamente y esto se debe, en parte, al descenso de la proliferación celular registrado en el mesénquima palatino (Xu y cols., 2006; Del Río y cols., 2011). Se puede deducir que al no haber suficiente crecimiento de los procesos estos contactan pobremente y no llegan a adherirse correctamente, generando FP (apartado 1.4.). Es más, se sabe que se desarrollan fisuras palatinas cuando la proliferación celular en el mesénquima es reducida (Rice y cols., 2004; Alappat y cols., 2005; Yu y cols., 2005). Todo ello nos lleva a pensar que un estímulo que aumentara los niveles de proliferación celular podría mejorar en parte la situación de estos procesos.

Un SAF es capaz de generar un aumento de la proliferación en distintos tipos celulares: células tumorales del colon (Khosraviani y cols., 2002; Pellis y cols., 2008), en células madre nerviosas (Zhang y cols., 2008 y 2009; Liu y cols., 2010) y en células neuroepiteliales (Boot y cols., 2003). También existen estudios en los que una sobreexpresión del receptor α del folato (apartado 1.5), lo que equivaldría a un SAF, aumenta los niveles de proliferación celular allí donde tiene lugar (Yao y cols., 2009). Otros autores han realizado estudios con cultivos de células del paladar embrionario de ratón con el gen de la MTHFR silenciado, lo que equivaldría a un déficit de AF ya que es un enzima esencial en el ciclo de los folatos (apartado 1.5), y han observado una proliferación inferior a la de células control y cómo al añadir AF al medio de cultivo los niveles de proliferación aumentan de forma dosis-dependiente (Xiao y cols., 2006; Xiao y cols., 2009). En este mismo trabajo nosotros hemos detectado un descenso de proliferación celular en los individuos deficitarios en AF (apartado 6.2.3.1).

Basándonos en todo lo expuesto, decidimos analizar la proliferación de las células del EBM y del mesénquima de embriones de 14,5 DG *Tgf-β₃* *-/-* que habían sido sometidos a un SAF a través de la dieta materna y comparar los resultados con los obtenidos de aquellos cuyas madres fueron alimentadas con una dieta control. En nuestro estudio no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de proliferación de las células del EBM. Sin embargo, sí fue detectado un aumento estadísticamente significativo de la proliferación de las células mesenquimáticas en los procesos palatinos de los embriones sometidos al SAF.

El hecho de que la proliferación celular se comporte de forma diferente en las células del EBM y en las del mesénquima palatal ha sido descrito anteriormente, ya que los individuos *Tgf-β₃* *-/-* presentan mayor proliferación en el EBM y menor en el mesénquima respecto a los embriones silvestres (Del Río y cols., 2011). Es posible que la proliferación celular en el EBM del paladar esté relacionada principalmente con la expresión de *Tgf-β₃* (Cui y cols., 2003; Fitzpatrick y cols., 1990; Pelton y cols., 1990a), que es nulo en los embriones mutantes empleados para nuestra investigación, por lo que el AF no puede generar ningún efecto sobre él al no estar presente. Pero en el mesénquima, la proliferación puede estar regulada por otros factores, ya que TGF-β₃ en él no se expresa durante la palatogénesis (Fitzpatrick y cols., 1990; Pelton y cols., 1990b). Esos otros factores pueden ser el producto de los genes Wnt (He et al, 2008), el EGF (Del Río y cols., 2011) o SHH y/o BMP2 (Rice y cols., 2004). Otro candidato sería TGF-β₁, cuya expresión es detectada en el mesénquima durante la palatogénesis (Fitzpatrick y cols., 1990; Pelton y cols., 1990b). Además sabemos que existe una estrecha relación de TGF-β₁ con TGF-β₃, y que cuando éste no aparece o lo hace en niveles diferentes a los fisiológicos pueden verse alterados los niveles de TGF-β₁ (Murillo y cols., 2009) y, por tanto, sus funciones.

Además, ha sido descrito que el AF no siempre se comporta igual en el mismo tipo celular. De hecho, existen estudios con células cancerígenas en las que se ha observado que el SAF puede revertir un tumor si éste se encuentra en una fase temprana o acelerarlo si está en una más avanzada (Jaszewski y cols., 1999; Khosraviani y cols., 2002; Lindzon y cols., 2009; Bistulfi y cols., 2010). Esto seguramente sea debido a que los mecanismos celulares se desencadenan por diversas señales y éstas no tienen por qué ser iguales en todos los sistemas. Por ello en determinadas células y bajo ciertas

condiciones, el AF puede ser el responsable de un aumento de la proliferación y en otros casos no.

Es muy posible que el AF afecte a la proliferación a través de la metilación de determinados genes cuya expresión está involucrada en dicho mecanismo, al igual que ocurre en las células de gliomas humanos. En ellas, es la metilación del factor de crecimiento PDGF-B (platelet-derived growth factor-B) lo que modula la proliferación desencadenada por los TGF- β (Bruna y cols., 2007; Hervouet y cols., 2009). La metilación es un proceso en el que grupos metilo se unen a moléculas como el ADN y las zonas que han sido metiladas no son reconocidas por los factores de transcripción y, por tanto, no son expresadas (Jones, 1986; Ulrey y cols., 2005). Si un SAF genera un aumento en los niveles de Met puede ocurrir que se produzca la metilación de genes que no deberían estarlo, y si los genes metilados quedan silenciados su función no se cumplirá. Si estos genes silenciados fueran los implicados en inhibir la proliferación celular se desencadenaría un aumento del número de células proliferantes. Este fenómeno también explicaría por qué no se aprecia variación en la proliferación del EBM: en él, el represor de la proliferación parece ser el TGF- β_3 , que no está presente en los mutantes, y por ello se observa más proliferación en el EBM de los mutantes que en los silvestres y esos niveles se mantienen en los mutantes sometidos a la dieta con SAF.

7.2.3 Efecto del suplemento de ácido fólico sobre la adhesión y fusión de los procesos palatinos de embriones *Tgf- β_3 -/-* .

Además del aumento en la proliferación de las células del paladar, decidimos plantearnos que el aumento del porcentaje de fisuras suavizadas obtenido en los mutantes bajo efecto de la dieta con SAF podría también relacionarse con una mejora en la adhesión y/o en la fusión de los procesos palatinos.

Por ello, se realizaron en primer lugar cultivos con paladares de embriones del grupo 3 a los que se añadió AF en una concentración que superaba 20 veces los valores fisiológicos en el medio de cultivo, lo que recreaba *in vitro* el suplemento recibido a través de la dieta materna por los individuos del grupo 4. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos sometidos al SAF y los cultivos control respecto a la adhesión y fusión de epitelios del borde medial. Una posible explicación

de estos resultados es que el tiempo de cultivo (36 horas) no fuera suficiente para que el SAF fuera efectivo.

Sin embargo, al analizar la adhesión en cultivos de embriones del grupo 4, cuyo SAF provenía de la dieta materna y no del medio de cultivo, observamos un aumento estadísticamente significativo de los niveles de adhesión de las células del EBM, aunque no de la fusión, respecto a los cultivos control.

Una posible explicación para la mejora de la adhesión de los epitelios del borde medial podría ser la existencia de una modificación en la composición de la MEC (apartado 1.1.). El SAF puede estar alterando la dinámica de las MMP, que son esenciales en la composición de la MEC, y se ha descrito en distintos tipos celulares que una alteración de los niveles de Hcy desemboca en alteración de la activación o inhibición de algunas de ellas (Holven y cols., 2003; Brassard y cols., 2005; Guo y cols., 2006; Moshal y cols., 2006; Liu y cols., 2008; Kundu y cols., 2009; Tyagi y cols., 2011; Munjal y cols., 2011). Al igual que un déficit de AF supone un aumento de los niveles de Hcy y esto afecta a las MMP, un suplemento podría disminuirlos y generar otro tipo de efecto sobre estas moléculas. De hecho, Williams y colaboradores (2011), han descrito recientemente cómo en células de la placenta sometidas en cultivo a metotrexato, un anti-folato, presentaban una alteración en la producción de MMP-2, MMP-3 y MMP-9, que era restituida al añadir AF al medio de cultivo.

Pero puede que el SAF esté afectando a otros elementos esenciales en la correcta adhesión de los procesos palatinos, como las propias moléculas de adhesión. Esta hipótesis se fundamenta en el trabajo de Martínez-Sanz y colaboradores (2008), en el cual se analizaron diferentes moléculas de adhesión en el paladar de ratones mutantes negativos para *Tgf-β₃* de dos razas diferentes, C57 y MF1. Mientras que los C57 presentan una FP completa, los MF1 presentan una FP parcial, similar a la encontrada en este trabajo en algunos de los mutantes del grupo 4. En dicho estudio, se detectaron alteraciones en ciertas moléculas de adhesión en ambas razas, pero las alteraciones siempre fueron más evidentes en los C57 que en los MF1 (colágenos IV y IX, laminina, fibronectina, integrina-α5) mientras que ciertas moléculas (integrina-β1 y Nectin-1) sólo aparecían alteradas en los C57 y no en los MF1 (apartado 1.4.).

Por lo tanto, es posible que el SAF provoque cambios en moléculas de adhesión alteradas en el paladar de los mutantes homocigotos negativos para *Tgf-β₃* desembocando en una mejora de la FP. Dada la experiencia anterior de este grupo de investigación en este campo actualmente se están realizando experimentos enfocados a determinar la veracidad de esta hipótesis.

CONCLUSIONES

Tras el estudio realizado las conclusiones finales son:

1. La administración de una dieta CAF a hembras de ratón entre 2 y 16 semanas causa un descenso en los niveles hepáticos de folato con respecto a lo observado en hembras alimentadas con dieta control. El descenso es de la mitad en los grupos sometidos al déficit de AF por 2 y 4 semanas y de 6 veces menos en los grupos de 6 a 16 semanas.
2. La administración a hembras de ratón C57 de una dieta CAF causa malformaciones congénitas en sus descendientes tanto más frecuentes cuanto más largo es el período de administración de la dieta. Las malformaciones observadas más frecuentemente fueron las oculares, seguida de las craneofaciales (FP, paladar plegado, microglosia, aglosia, micrognatia y agnatia), DTN (anencefalia, exencefalia y espina bífida) y de la región abdominal (evisceración y hernia umbilical).
3. Una dieta CAF causa FP completa en la progenie de 17,5 DG si es administrada por 8 o más semanas. La administración de la dieta durante 8 semanas causó el mayor número de fisuras palatinas.
4. Tras 2 semanas de ingesta de dieta CAF se alteran los mecanismos por los que se desarrolla el paladar: proliferación celular del mesénquima y del EBM, adhesión de epitelios del borde medial opuestos, desaparición (fusión) y apoptosis de las células de la CEM.
5. El déficit de AF producido por la administración de dieta CAF por 2 semanas produce un descenso en la expresión de TGF- β_3 en el paladar de ratones de 14,5 DG y este descenso fue mayor cuando la ingesta tuvo lugar durante 8 semanas.
6. El tratamiento con TGF- β_3 exógeno de cultivos de procesos palatinos de embriones deficitarios en AF recupera a la normalidad los mecanismos implicados en la palatogénesis alterados por tal déficit.

7. Un SAF 20 veces superior al que contiene la dieta normal en la dieta de hembras de ratón C57/BL/6J heterocigotos para el gen *Tgf-β₃* mejora las fisuras palatinas presentadas por los fetos mutantes negativos para este gen. La mejora se evidencia por el incremento de fisuras palatinas parciales o procesos palatinos muy próximos en los individuos suplementados frente a FP completa con procesos separados en los individuos control.

8. El número de semanas que las hembras son alimentadas con el SAF no es relevante en cuanto al efecto que produce el aporte extraordinario sobre el paladar embrionario.

9. El SAF dietético causa aumento de la proliferación de las células mesenquimáticas y de la adhesión de los procesos palatinos embrionarios, lo que puede ser causa de la mejora de la FP que presentan los individuos suplementados con respecto a los controles.

REFERENCIAS

A

- Abbott, B.D. y Birnbaum, L.S. (1989)** Cellular alterations and enhanced induction of cleft palate after coadministration of retinoic acid and TCDD. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99(2): 287-301.
- Abramovich, A. (1997)** Embriología de la región maxilofacial. 3ª Edición. Ed. Panamericana. Madrid (España).
- Achón, M.,** Alonso-Apperte, E., Reyes, L., Ubeda, N., Varela-Moreiras, G. (1999) High dietary folate supplementation affects gestational development and dietary protein utilization in rats. *J. Nutr.* 129: 1204–1208.
- Achón, M.,** Alonso-Apperte, E., Reyes, L., Ubeda, N., Varela-Moreiras, G. (2000) High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br. J. Nut.* 83: 177–183.
- Achón, M.,** Alonso-Apperte, E., Ubeda, N., Varela-Moreiras, G. (2007) Supranormal dietary Folic acid supplementation: effects on methionine metabolism in weanling rats. *Br. J. Nutr.* 98(3): 490-6.
- Achón, M.,** Alonso-Apperte, E., Varela-Moreiras, G. (2002) High dietary folate supplementation: Effects on diet utilization and methionine metabolism in aged rats. *J. Nutr. Health. Aging.* 6: 51–54.
- Alam, M.M.,** Mohammad, A.A., Shuaib, U., Wang, C., Ghani, U., Schwindt, B., Todd, K.G., Shuaib, A. (2009) Homocysteine reduces endothelial progenitor cells in stroke patients through apoptosis. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 29(1): 157-165.
- Alappat, S.R.,** Zhang, Z., Suzuki, K., Zhang, X., Liu, H., Jiang, R., Yamada, G., Chen, Y. (2005) The cellular and molecular etiology of the cleft secondary palate in Fgf10 mutant mice. *Dev. Biol.* 277(1): 102-113.
- Alonso-Apperte, E. y Varela-Moreiras, G. (1996)** Brain folates and DNA methylation in rats fed a choline deficient diet or treated with low doses of methotrexate. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 66: 232–236.
- Antony, A.C. (1992)** The biological chemistry of folate receptors. *Blood.* 79(11): 2807-2820.
- Antony, A.C. (2007)** In utero physiology: Role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(suppl): 598S-603S.

Antony, A.C. y Hansen, D.K. (2000) Hypothesis: Folate-responsive neural tube defects and neurocristopathies. *Teratology*. 62(1): 42-50.

Arasaradnam, R.P., Commane, D.M., Bradburn, D., Mathers, J.C. (2008) A review of dietary factors and its influence on DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Epigenetics*. 3(4): 193-198.

B

Badovinac, R.L., Werler, M.M., Williams, P.L., Kelsey, K.T., Hayes, C. (2007) Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 79(1): 8-15.

Bermejo, E., Cuevas, L., Grupo Periférico del ECEMC, Martínez-Frías, M.L. (2009) Vigilancia epidemiológica de anomalías congénitas en España: Análisis de los datos del registro el ECEMC en el período 1980-2008. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*. Serie V, nº8: 64-91.

Bianchi, F., Calzolari, E., Ciulli, L., Cordier, S., Gualandi, F., Pierini, A., Mossey, P. (2000) Environment and genetics in the etiology of orofacial clefts, with reference to the role of folic acid. *Epidemiol. Prev.* 24(1): 21-27.

Bienengräber, V., Malek, F.A., Möritz, K.U., Fanghänel, J., Gundlach, K.K., Weingärtner, J. (2001) Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study. *Cleft Palate Craniof. J.* 38(4): 393-398.

Bistulfi, G., Vandette, E., Matsui, S., Smiraglia, D.J. (2010) Mild folate deficiency induces genetic and epigenetic instability and phenotype changes in prostate cancer cells. *BMC Biol.* 8: 6.

Björklund, N.K. y Gordon, R. (2006) A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 135-141

Blavier, L., Lazaryev, A., Groffen, J., Heisterkamp, N., DeClerck, Y.A., Kaartinen, V. (2001) TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol. Biol. Cell.* 12(5): 1457-1466.

- Bliek, J.B.**, Rothenberg, S.P., Steegers-Theunissen, R.P. (2006) Maternal folate receptor autoantibodies and cleft lip and/or palate. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 93(2): 142-143.
- Boot, M.J.**, Steegers-Theunissen, R.P., Poelmann, R.E., Van Iperen, L., Lindemans, J., Gittenberger-de Groot, A.C. (2003) Folic acid and homocysteine affect neural crest and neuroepithelial cell outgrowth and differentiation in vitro. *Dev. Dyn.* 227(2): 301-308.
- Botto, L.D.**, Mulinare, J., Erickson, J.D. (2002) Occurrence of omphalocele in relation to maternal multivitamin use: A population-based study. *Pediatrics.* 109(5): 904-908.
- Boyles, A.L.**, Wilcox, A.J., Taylor, J.A., Meyer, K., Fredriksen, A., Ueland, P.M., Drevon, C.A., Vollset, S.E., Lie, R.T. (2008) Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A(4): 440-449.
- Brassard, P.**, Amiri, F., Schiffrin, E.L. (2005) Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. *Hypertension.* 46(3): 598-606.
- Brinkley, LL.** (1984) Changes in cell distribution during mouse secondary palate closure *in vivo* and *in vitro*. I. Epithelial cells. *Dev. Biol.* 102: 216-227.
- Brouwer, I.A.**, van Dusseldorp, M., West, C.E., Steegers-Theunissen, R.P. (2001) Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. *Nutr. Res. Rev.* 14(2): 267-294.
- Brown, N.L.**, Yarram, S.J., Mansell, J.P., Sandy, J.R. (2002) Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J. Dent. Res.* 81(12): 826-830.
- Bruna, A.**, Darken, R.S., Rojo, F., Ocaña, A., Peñuelas, S., Arias, A., Paris, R., Tortosa, A., Mora, J., Baselga, J., Seoane, J. (2007) High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell.* 11(2): 147-160.
- Brunet, C.L.**, Sharpe, P.M., Ferguson, M.W. (1995) Inhibition of TGF-B3 (but not TGF-B1 or TGF-B2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int. J. Dev. Biol.* 39(2): 345-355.
- Buckbinder, L.**, Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B.R., Kley, N. (1995) Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature.* 377(6550): 646-664.

Burgoon, J.M., Selhub, J., Nadeau, M., Sadler, T.W. (2002) Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology*. 65: 219-227.

Burjel, L., Cordoba, M., Ribeiro, L., Thomas, C. (2007) Homocisteinemia basal y post sobrecarga de metionina. Experiencia en una Unidad de Prevención y Seguimiento de Riesgo Cardiovascular. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 41 (1): 21-25.

Butterworth, C.E. Jr., Baugh, C.M., Krumdieck, C. (1969) A study of folate absorption and metabolism in man utilizing carbon-14-labeled polyglutamates synthesized by the solid phase method. *J. Clin. Invest.* 48(6): 1131-1142.

Butterworth, C.E. Jr. y **Tamura, T.** (1989) Folic acid safety and toxicity: a brief review. *Am. J. Clin. Nutr.* 50(2): 353-358.

C

Canellos, G.P., Mead, J.A., Greenberg, N.H., Schrecker, A.W. (1967) The effect of treatment with cytotoxic agents on mouse spleen dihydrofolate reductase activity. *Cancer. Res.* 27(4): 784-788.

Capecchi, M.R. (1994) Targeted gene replacement. *Sci. Am.* 270(3): 52-59.

Carette, M.J.M. y **Ferguson, M.W.J.** (1992) The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion *in vitro*: an analysis by DiI labelling and confocal microscopy. *Development*. 114: 379-388.

Carlson, B.M. (1990) Embriología básica de Patten. 5ª Ed. *Interamericana, McGraw-Hill. Colonia Atrampa (México, D.F).*

Carstens, M.H. (2004) Neural tube programming and craniofacial cleft formation. I. The neuromeric organization of the head and neck. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 8(4): 181-210.

Chai, Y., Ito, Y., Han, J. (2003) TGF-beta signaling and its functional significance in regulating the fate of cranial neural crest cells. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14(2): 78-88.

Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P. Jr., Han, J., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., Sucov, H.M. (2000) Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 127(8): 1671-1679.

- Chai, Y. y Maxson, R.E. Jr. (2006)** Recent advances in craneofacial morphogenesis. *Dev. Dyn.* 235(9): 2353-2375.
- Chen, C.P. (2008a)** Syndromes, disorders and maternal risk factors associated with neural tube defects (III). *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 47(2): 131-140.
- Chen, C.P. (2008b)** Syndromes, disorders and maternal risk factors associated with neural tube defects (IV). *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 47(3): 276-282.
- Chern, C.L., Huang, R.F., Chen, Y.H., Cheng, J.T., Liu, T.Z. (2001)** Folate deficiency-induced oxidative stress and apoptosis are mediated via homocysteine-dependent overproduction of hydrogen peroxide and enhanced activation of NF-kappaB in human Hep G2 cells. *Biomed. Pharmacother.* 55(8): 434-442.
- Chevrier, C., Perret, C., Bahuau, M., Zhu, H., Nelva, A., Herman, C., Francannet, C., Robert-Gnansia, E., Finnell, R.H., Cordier, S. (2007)** Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am. J. Med. Genet. A.* 143(3): 248-257.
- Chiang, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K., McCann, P.P. (1996)** S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 10(4): 471-480.
- Cipollone, D., Carsetti, R., Tagliani, A., Rosado, M.M., Borgiani, P., Novelli, G., D'Amati, G., Fumagalli, L., Marino, B., Businaro, R. (2008)** Folic acid and methionine in the prevention of teratogen-induced congenital defects in mice. *Cardiovasc. Pathol.* 18(2): 100-109.
- Citterio, H.L. y Gaillard, D.A. (1994)** Expression of transforming growth factor alpha (TGF alpha), epidermal growth factor receptor (EGF-R) and cell proliferation during human palatogenesis: an immunohistochemical study. *Int. J. Dev. Biol.* 38(3): 499-505.
- Courtemanche, C., Elson-Schwab, I., Mashiyama, S.T., Kerry, N., Ames, B.N. (2004)** Folate deficiency inhibits the proliferation of primary human CD8+ T lymphocytes in vitro. *J. Immunol.* 173(5): 3186-3192.
- Cox, D.A. (1995)** Transforming growth factor-beta 3. *Cell Biol. Int.* 19(5): 357-371.
- Craciunescu, C.N., Brown, E.C., Mar, M.H., Albright, C.D., Nadeau, M.R., Zeisel, S.H. (2004)** Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J. Nutr.* 134(1): 162-166.
- Crane, J.F. y Trainor, P.A. (2006)** Neural crest stem and progenitor cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 267-286.

Crott, J.W., Choi, S.W., Ordovas, J.M., Ditelberg, J.S., Mason, J.B. (2004) Effects of dietary folate and aging on gene expression in the colonic mucosa of rats: Implications for carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 25(1): 69-76.

Crott, J.W., Liu, Z., Keyes, M.K., Choi, S.W., Jang, H., Moyer, M.P., Mason, J.B. (2008) Moderate folate depletion modulates the expression of selected genes involved in cell cycle, intracellular signaling and folate uptake in human colonic epithelial cell lines. *J. Nutr. Biochem*. 19(5): 328-335.

Cuervo, R., Valencia, C., Chandraratna, R.A., Covarrubias, L. (2002) Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid. *Dev. Biol*. 245: 145-156.

Cuervo, R., y Covarrubias, L. (2004) Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development*. 131(1): 15-24.

Cui, X.M., Chai, Y., Chen, J., Yamamoto, T., Ito, Y., Bringas, P., Shuler, C.F. (2003) TGF-beta3-dependent SMAD2 phosphorylation and inhibition of MEE proliferation during palatal fusion. *Dev. Dyn*. 227(3): 387-394.

Czeizel, A.E., Dobó, M., Vargha, P. (2004) Hungarian cohort-controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation shows a reduction in certain congenital abnormalities. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol*. 70(11): 853-861.

Czeizel, A.E., Tímár, L., Sárközi, A. (1999) Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics*. 104(6): e66.

Czeizel, A.E., Tóth, M., Rockenbauer, M. (1996) Population-based case control study of folic acid supplementation during pregnancy. *Teratology*. 53(6): 345-351.

D

Del Campo, M., Kosaki, K., Bennett, F.C., Jones, K.L. (1999) Developmental delay in fetal aminopterin/methotrexate syndrome. *Teratology*. 60(1): 10-12.

Del Río, A., Barrio, M.C., Rodríguez-Bobada, C., Murillo, J., Maldonado, E., López-Gordillo, Y., Martínez-Sanz, E., Martínez, M.L., Martínez-Álvarez, M.C. (2011) Presence of cell proliferation related molecules in the *tgf-β₃* null mutant mouse palate. *Cell Tissues Organs*. 193(3): 135-150.

- Dixon, M.J. y Ferguson, M.W. (1992)** The effects of epidermal growth factor, transforming growth factors alpha and beta and platelet-derived growth factor on murine palatal shelves in organ culture. *Arch. Oral Biol.* 37(5): 395-410.
- Dorsky, R.I., Moon, R.T., Raible, D.W. (2000)** Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest. *Bioessays.* 22(8): 708-716.
- Dudas, M., Li, W.Y., Kim, J., Yang, A., Kaartinen, V. (2007)** Palatal fusion - where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect. *Acta. Histochem.* 109(1): 1-14.
- Dünker, N. y Kriegelstein, K. (2000)** Targeted mutations of transforming growth factor- β genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur. J. Biochem.* 267: 6982-6988.
- Dunlevy, L.P., Chitty, L.S., Burren, K.A., Doudney, K., Stojilkovic-Mikic, T., Stanier, P., Scott, R., Copp, A.J., Greene, N.D. (2007)** Abnormal folate metabolism in fetuses affected by neural tube defects. *Brain.* 130(pt4): 1043-1049.

E

- Elmazar, M.M., Thiel, R., Nau, H. (1992)** Effect of supplementation with folic acid, vitamin B6, and vitamin B12 on valproic acid-induced teratogenesis in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18(3): 389-394.
- Elmore, C.L., Wu, X., Leclerc, D., Watson, E.D., Bottiglieri, T., Krupenko, N.I., Krupenko, S.A., Cross, J.C., Rozen, R., Gravel, R.A., Matthews, R.G. (2007)** Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol. Genet. Metab.* 91(1): 85-97.
- Elwood, J.M. y Colquhoun, T.A. (1997)** Observations on the prevention of cleft palate in dogs by folic acid and potential relevance to humans. *N. Z. Vet. J.* 45(6): 254-256.
- Ernest, S., Carter, M., Shao, H., Hosack, A., Lerner, N., Colmenares, C., Rosenblatt, D.S., Pao, Y.H., Ross, M.E., Nadeau, J.H. (2006)** Parallel changes in metabolite and expression profiles in crooked-tail mutant and folate-reduced wild-type mice. *Hum. Mol. Genet.* 15(23): 3387-3393.

F

- Fatemi, M.,** Pao, M.M., Jeong, S., Gal-Yam, E.N., Egger, G., Weisenberger, D.J., Jones, P.A. (2005) Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res.* 33(20): e176.
- Feinleib, M.,** Beresford, S.A., Bowman, B.A., Mills, J.L., Rader, J.I., Selhub, J., Yetley, E.A. (2001) Folate fortification for the prevention of birth defects: case study. *Am. J. Epidemiol.* 154(12 Suppl): S60-69.
- Ferguson, M.W.J. (1978)** Palatal shelf elevation in the Wistar rat fetus. *J. Anat.* 125: 555-577.
- Ferguson, M.W.J. (1987)** Palate development: mechanisms and malformations. *Ir. J. Med. Sci.* 156: 309-315.
- Ferguson, M.W.J. (1988)** Palate development. *Development.* 103 Suppl: 41-60.
- Finkelstein, J.D.,** Martin, J.J., Harris, B.J. (1988) Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cysteine. *J. Biol. Chem.* 263(24): 11750-11754.
- Finnell, R.H.,** Greer, K.A., Barber, R.C., Piedrahita, J.A. (1998) Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9(1): 38-53.
- Finnell, R.H.,** Shaw, G.M., Lammer, E.J., Brandl, K.L., Carmichael, S.L., Rosenquist, T.H. (2004) Gene-nutrient interactions: importance of folates and retinoids during early embryogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198(2): 75-85.
- Finnell, R.H.,** Spiegelstein, O., Wlodarczyk, B., Triplett, A., Pogribny, I.P., Melnyk, S., James, J.S. (2002) DNA methylation in Folbp1 knockout mice supplemented with folic acid during gestation. *J. Nutr.* 132(8 Suppl): 2457S-2461S.
- Firat, D.,** Kuntsal, L., Sirin, Y. (2005) Protective effects of prenatal administration of folic acid on retinoic acid-induced cellular damages of Meckel's cartilage in rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 205(1): 27-36.
- Fitchett, J.E. y Hay, E.D. (1989)** Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev. Biol.* 131: 455-474.
- Fitzpatrick, D.R.,** Denhez, F., Kondaiah, P., Akhurst, R.J. (1990) Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development.* 109: 585-595.

Flanders, K.C., Thompson, N.L., Cissel, D.S., Van Obberghen-Schilling, E., Baker, C.C., Kass, M.E., Ellingsworth, L.R., Roberts, A.B., Sporn, M.B. (1989) Transforming growth factor- β 1: histochemical localization with antibodies to different epitopes. *J. Cell Biol.* 108(2): 653-660.

Fogh-Andersen, P. (1942) Inheritance of harelip and cleft palate. *Copenhagen: Nyt Nordisk.*

Foo, S.K., McSloy, R.M., Rousseau, C., Shane, B. (1982) Folate derivatives in human cells: Studies on normal and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase-deficient fibroblasts. *J. Nutr.* 112(8): 1600-1608.

Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Alberto, J.M., Guéant-Rodriguez, R.M., Daval, J.L., Guéant, J.L. (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum. Reprod. Update.* 13(3): 225-238.

Fraser, F.C. y Warburton D. (1964) No association of emotional stress or vitamin supplement during pregnancy to cleft lip or palate in man. *Plast. Reconstr. Surg.* 33: 395-399.

G

Gato, A., Martínez, M.L., Tudela, C., Alonso, I., Moro, J.A., Formoso, M.A., Ferguson, M.W., Martínez-Alvarez, C. (2002) TGF- β 3-induced chondroitin sulphate proteoglycan mediates palatal shelf adhesion. *Dev. Biol.* 250: 393-405.

Gehris, A.L., D'Angelo, M., Greene, R.M. (1991) Immunodetection of the transforming growth factors beta 1 and beta 2 in the developing murine palate. *Int. J. Dev. Biol.* 35(1): 17-24.

George, L., Mills, J.L., Johansson, A.L., Nordmark, A., Olander, B., Granath F., Cnattingius, S. (2002) Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA.* 288(15): 1867-1873.

Gomes, F.C., Sousa Vde, O., Romão, L. (2005). Emerging roles for TGF- β 1 in nervous system development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23(5): 413-424.

González, M., Torres, D., Gutiérrez, J.L., Infante, P. (2004). Fisuras labio-palatinas. *Rev. Secib. On Line.* 4: 1-15.

González-Otero, T., Arias, J., Lassaletta, L., Martorell, V. (2003) Nascer e crescer. 12 (4): S293-S297.

Green, J.M., Ballou, D.P., Matthews, R.G. (1988) Examination of the role of MTHFR in incorporation of MTHF into cellular metabolism. *FASEB J.* 2(1): 42-47.

Gregory, J.F. 3rd. (2001) Case study: Folate bioavailability. *J. Nutr.* 131(4 Suppl): 1376S-1382S.

Griffith, C.M. y Hay, E.D. (1992) Epithelial-Mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development.* 116: 1087-1099.

Guo, H., Lee, J.D., Uzui, H., Yue, H., Wang, J., Toyoda, K., Geshi, T., Ueda, T. (2006) Effects of folic acid and magnesium on the production of homocysteine-induced extracellular matrix metalloproteinase-2 in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Circ. J.* 70(1): 141-146.

H

Hagedorn, L., Floris, J., Suter, U., Sommer, L. (2000) Autonomic neurogenesis and apoptosis are alternative fates of progenitor cell communities induced by TGF- β . *Dev. Biol.* 228: 57-72.

Hagedorn, L., Suter, U., Sommer, L. (1999) P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF-beta family factors. *Development.* 126(17): 3781-3794.

Hajjar, K.A. (2001) Homocysteine: A sulphurous fire. *J. Clin. Invest.* 107(6): 663-664.

Hall, B.K. (2008) The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J. Biosci.* 33(5): 781-793.

Han, Y., Pan, Y., Du, Y., Tong, N., Wang, M., Zhang, Z., Wan, L., Wang, L. (2011) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility in a southern Chinese population. *DNA Cell Biol.* 30(12): 1063-1068.

Hanumegowda, U.M., Judy, B.M., Welshons, W.V., Reddy, C.S. (2002) Selective inhibition of murine palatal mesenchymal cell proliferation in vitro by secalonic acid D. *Toxicol. Sci.* 66(1): 159-165.

- Hartridge, T.**, Illing, H.M., Sandy, J.R. (1999) The role of folic acid in oral clefting. *Br. J. Orthod.* 26: 115–120.
- Hay, E.D.** (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* 154: 8-20.
- Hayes, C.**, Werler, M.M., Willett, W.C., Mitchell, A.A. (1996) Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am. J. Epidemiol.* 143(12): 1229-1234.
- He, F.**, Xiong, W., Yu, X., Espinoza-Lewis, R., Liu, C., Gu, S., Nishita, M., Suzuki, K., Yamada, G., Minami, Y., Chen, Y. (2008) Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. *Development.* 135(23): 3871-3879.
- Heid, M.K.**, Bills, N.D., Hinrichs, S.H., Clifford, A.J. (1992) Folate deficiency alone does not produce neural tube defects in mice. *J. Nutr.* 122: 888-894.
- Heine, U.**, Munoz, E.F., Flanders, K.C., Elingsworth, L.R., Lam, H.Y., Thompson, N.L., Roberts, A.B. Sporn, M.B. (1987). Role of transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo. *J. Cell. Biol.* 105: 2861-2876.
- Heine, U.I.**, Munoz, E.F., Flanders, K.C. (1990) Colocalization of TGF- β 1 and collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis. *Development.* 109(1): 29-36.
- Hepner, G.W.**, Booth, C.C., Cowan, J., Hoffbrand, A.V., Mollin, D.L. (1968) Absorption of crystalline folic acid in man. *Lancet.* 2(7563): 302-306.
- Hervouet, E.**, Debien, E., Champion, L., Charbord, J., Menanteau, J., Vallette, F.M., Cartron, P.F. (2009) Folate supplementation limits the aggressiveness of glioma via the remethylation of DNA repeats element and genes governing apoptosis and proliferation. *Clin. Cancer Res.* 15(10): 3519-3529.
- Hise, M.K.**, Salmanullah, M., Liu, L., Drachenberg, C.I., Papadimitriou, J.C., Rohan, R.M. (2001) Control of the epidermal growth factor receptor and its ligands during renal injury. *Nephron.* 88(1): 71-79.
- Holven, K.B.**, Halvorsen, B., Schulz, H., Aukrust, P., Ose, L., Nenseter, M.S. (2003) Expression of matrix metalloproteinase-9 in mononuclear cells of hyperhomocysteinaemic subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* 33(7): 555-560.
- Horne, D.W.**, Briggs, W.T., Wagner, C. (1978) Transport of 5-methyltetrahydrofolic acid and folic acid in freshly isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 253(10): 3529-35.

Horne, D.W., Krumdieck, C.L., Wagner, C. (1981) Properties of folic acid γ -glutamyl hydrolase (conjugase) in rat bile and plasma. *J. Nutr.* 111: 442-449.

Huang, R.F., Ho, Y.H., Lin, H.L., Wei, J.S., Liu, T.Z. (1999) Folate deficiency induces a cell cycle-specific apoptosis in HepG2 cells. *J. Nutr.* 129(1): 25-31.

Hyun, T.H. y **Tamura, T.** (2005) Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 230(7): 444-454

I

Ishii, M., Merrill, A.E., Chan, Y.S., Gitelman, I., Rice, D.P., Sucov, H.M., Maxson, R.E. Jr. (2003) Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development.* 130(24): 6131-6142.

Itikala, P.R., Watkins, M.L., Mulinare, J., Moore, C.A., Liu, Y. (2001) Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology.* 63(2): 79-86.

Ito, Y., Yeo, J.Y., Chytil, A., Han, J., Bringas, P.Jr., Nakajima, A., Shuler, C.F., Moses, H.L., Chai, Y. (2003) Conditional inactivation of Tgfbr2 in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development.* 130(21): 5269-5280.

J

James, S.J., Miller, B.J., Basnakian, A.G., Pogribny, I.P., Pogribna, M., Muskhelishvili, L. (1997) Apoptosis and proliferation under conditions of deoxynucleotide pool imbalance in liver of folate/methyl deficient rats. *Carcinogenesis.* 18(2): 287-293.

Jaszewski, R., Khan, A., Sarkar, F.H., Kucuk, O., Tobi, M., Zagnoon, A., Dhar, R., Kinzie, J., Majumdar, A.P. (1999) Folic acid inhibition of EGFR-mediated proliferation in human colon cancer cell lines. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 277: 1142-1148.

Jhaveri, M.S., Wagner, C., Trepel, J.B. (2001) Impact of extracellular folate levels on global gene expression. *Mol. Pharmacol.* 60(6): 1288-1295.

Jin, J. y Ding, J. (2006) Analysis of cell migration, transdifferentiation and apoptosis during mouse secondary palate fusion. *Development*. 133 (17): 3341-3347.

Johnson, C.Y. y Little, J. (2008) Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int. J. Epidemiol.* 37: 1041–1058.

Jones, P.A. (1986) DNA methylation and cancer. *Cancer Res.* 46(2): 461-466.

Jugessur, A., Lie, R.T., Wilcox, A.J., Murray, J.C., Taylor, J.A., Saugstad, O.D., Vindenes, H.A., Abyholm, F. (2003) Variants of developmental genes (TGF α , TGF β 3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet. Epidemiol.* 24(3): 230-239.

Junqueira, L.C. y Carneiro, J. (1973) Histología Básica. Ed. Salvat, Barcelona (España).

K

Kaartinen, V., Cui, X.M., Heisterkamp, N., Groffen, J., Shuler, C.F. (1997) Transforming growth factor- β 3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev. Dyn.* 209(3): 255-260.

Kaartinen, V., Voncken, J.W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., Groffen, J. (1995) Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genetics.* 11: 415-421.

Kernahan, D.A. y Stark, R.B. (1958) A new classification for cleft lip and cleft palate. *Plast. Reconstr. Surg.* 22: 435-441.

Kerrigan, J.J., Mansell, J.P., Sengupta, A., Brown, N., Sandy, J.R. (2000) Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. *J. R. Coll. Surg. Edinb.* 45(6): 351-358.

Khandanpour, N., Loke, Y.K., Meyer, F.J., Jennings, B., Armon, M.P. (2009) Homocysteine and peripheral arterial disease: systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 38(3): 316-322.

Khosraviani, K., Weir, H.P., Hamilton, P., Moorehead, J., Williamson, K. (2002) Effect of folate supplementation on mucosal cell proliferation in high risk patients for colon cancer. *Gut.* 51(2): 195–199.

Kiemle, I. E. y da Silva, O.G. (2007) Fissuras Labiopalatinas. Uma abordagem interdisciplinar. *Livraria Santos Editora Ltda. São Paulo (Brasil)*.

Klipstein, F.A. y Lipton, S.D. (1970) Intestinal flora of folate-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 23(2): 132-140.

Knott L., Hartridge T., Brown N.L., Mansell J.P., Sandy J.R. (2003) Homocysteine oxidation and apoptosis: a potential cause of cleft palate. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 39(1-2): 98-105.

Kruman, I.I., Kumaravel, T.S., Lohani, A., Pedersen, W.A., Cutler, R.G., Kruman, Y., Haughey, N., Lee, J., Evans, M., Mattson, M.P. (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 1;22(5): 1752-1762.

Kulkarni, A.B., Huh C.G., Becker D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., Karlsson, S. (1993) Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(2): 770-774.

Kundu, S., Tyagi, N., Sen, U., Tyagi, S.C. (2009) Matrix imbalance by inducing expression of metalloproteinase and oxidative stress in cochlea of hyperhomocysteinemic mice. *Mol. Cell. Biochem.* 332(1-2): 215-224.

L

Latacha, K.S. y Rosenquist, T.H. (2005) Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular development in the avian embryo. *Dev. Dyn.* 234(2): 323-331.

Laurence, K.M., Carter, C.O., David, P.A. (1968) Major central nervous system malformations in South Wales. II. Pregnancy factors, seasonal variation, and social class effects. *Br. J. Prev. Soc. Med.* 22(4): 212-222.

Lee, I., Lee, H., Kim, J.M., Chae, E.H., Kim, S.J., Chang, N. (2007) Short-term hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress activates retinal glial cells and increases vascular endothelial growth factor expression in rat retina. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(5): 1203-1210.

Lehnert, S.A. y Akhurst, R.J. (1988) Embryonic expression pattern of TGF- β type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action. *Development.* 104: 263-273.

- Letourneau, P.C. (1996)** The cytoskeleton in nerve growth cone motility and axonal pathfinding. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 4(2-3): 111-123.
- Letra, A.,** Silva, R.A., Menezes, R., Astolfi, C.M., Shinohara, A., de Souza, A.P., Granjeiro, J.M. (2007) MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not MMP1. *Arch. Oral Biol.* 52(10): 954-960.
- Levrard, S.,** Pacher, P., Pesse, B., Rolli, J., Feihl, F., Waeber, B., Liaudet, L. (2007) Homocysteine induces cell death in H9C2 cardiomyocytes through the generation of peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359(3): 445-450.
- Li D. y Rozen R. (2006)** Maternal folate deficiency affects proliferation, but not apoptosis, in embryonic mouse heart. *J Nutr.* 136(7): 1774-1778.
- Lidral A.C.,** Murray J.C., Buetow K.H., Basart A.M., Scheerer H., Shiang R., Naval A., Layda E., Magee K., Magee W. (1997) Studies of the candidate genes TGF β 2, Msx1, TGF α y TGF β 3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate-Craniofacial Journal.* 34(1): 1-6.
- Lin, S.J.,** Lerch, T.F., Cook, R.W., Jardetzky, T.S., Woodruff, T.K. (2006) The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction.* 132(2): 179-190.
- Lindzon, G.M.,** Medline, A., Sohn, K.J., Depeint, F., Croxford, R., Kim, Y.I. (2009) Effect of folic acid supplementation on the progression of colorectal aberrant crypt foci. *Carcinogenesis.* 30 (9): 1536-1543.
- Liu, H.,** Huang, G.W., Zhang, X.M., Ren, D.L., Wilson, J. (2010) Folic acid supplementation stimulates notch signaling and cell proliferation in embryonic neural stem cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 47(2): 174-180.
- Liu, F.,** Zhang, J., Yu, S., Wang, R., Wang, B., Lai, L., Yin, H., Liu, G. (2008) Effect of folate on neointima formation and matrix metalloproteinase-9 expression after balloon injury in hyperhomocysteinemic rabbits. *Int. J. Cardiol.* 17;131(1): 59-65.
- Lu, S.J.,** He, W., Shi, B., Meng, T., Li, X.Y., Liu, Y.R. (2008) A preliminary study on the teratogenesis of dexamethasone and the preventive effect of vitamin B12 on murine embryonic palatal shelf fusion in vitro. *J. Zhejiang Univ. Sci B.* 9(4): 306-312.
- Lucock, M. (2000)** Folic Acid: Nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab.* 71(1-2): 121-138.

Lucock, M.D., Priestnall, M., Daskalakis, I., Schorah, C.J., Wild, J., Levene, M.I. (1995) Nonenzymatic degradation and salvage of dietary folate: Physicochemical factors likely to influence bioavailability. *Biochem. Mol. Med.* 55(1): 43-53.

Lucock, M. y Yates, Z. (2005) Folic acid-vitamin and panacea or genetic time bomb? *Nat. Rev. Genet.* 6(3): 235-240.

M

Maldonado, J.G. y Jaramillo, H.N. (1996) Factores de crecimiento. III. Factores transformadores del crecimiento (TGF). *IATREIA.* 9(4): 159-163.

Marsillach, J., Ferré, N., Camps, J., Riu, F., Rull, A., Joven, J. (2008) Moderately high folic acid supplementation exacerbates experimentally induced liver fibrosis in rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 233(1): 38-47.

Martinelli, M., Scapoli, L., Palmieri, A., Pezzetti, F., Baciliero, U., Padula, E., Carinci, P., Morselli, P.G., Carinci, F. (2006) Study of four genes belonging to the folate pathway: Transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum. Mutat.* 27(3): 294.

Martínez-Álvarez, C., Blanco, M.J., Pérez, R., Rabadán, M.A., Aparicio, M., Resel, E., Martínez, T., Nieto, M.A. (2004) Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev. Biol.* 265(1): 207-218.

Martínez-Álvarez, C., Bonelli, R., Tudela, C., Gato, A., Mena, J., O'Kane, S., Ferguson, M.W. (2000b) Bulging medial edge epithelial cells and palatal fusion. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 331-335.

Martínez-Álvarez, C., Tudela, C., Pérez-Miguelsanz, J., O'Kane, S., Puerta, J., Ferguson, M.W. (2000a) Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Dev. Biol.* 220: 343-357.

Martínez-Frías, M.L., Rodríguez-Pinilla, E., Bermejo, E. (2003) Análisis de la situación en España sobre el consumo de ácido fólico/folinato cálcico para la prevención de defectos congénitos. *Med. Clin. (Barc).* 121(20): 772-775.

Martínez-Sanz, E., Del Río, A., Barrio, C., Murillo, J., Maldonado, E., Garcillán, B., Amorós, M., Fuerte, T., Fernández, A., Trinidad, E., Rabadán, M.A., López, Y.,

- Martínez, M.L., Martínez-Alvarez, C. (2008) Alteration of medial-edge epithelium cell adhesion in two Tgf-beta3 null mouse strains. *Differentiation*. 76(4): 417-430.
- Massagué, J. (2000) How cells read TGF- β signals. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 1(3): 169-178.
- Massagué, J., Blain, S.W., Lo, R.S. (2000) TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 103(2): 295-309.
- Mathews, C.K. y Huennekens, F.M. (1963) Further Studies on Dihydrofolic Reductase. *J. Biol. Chem.* 238: 3436-3442.
- McGuire, J.J., Hsieh, P., Coward, J.K., Bertino, J.R. (1980) Enzymatic synthesis of folylpolyglutamates. Characterization of the reaction and its products. *J. Biol. Chem.* 255(12): 5776-5788.
- McNulty, H. y Pentieva, K. (2004) Folate bioavailability. *Proc. Nutr. Soc.* 63(4): 529-536.
- Meng, L., Bian, Z., Torensma, R., Von den Hoff, J.W. (2009) Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J. Dent. Res.* 88(1): 22-33.
- Millan, F.A., Denhez, F., Kondaiah, P., Akhurst, R.J. (1991) Embryonic gene expression patterns of TGF-b1, b2 and b3 suggest different developmental functions in vivo. *Development*. 111(1): 131-143.
- Mills, J.L., Druschel, C.M., Pangilian, F., Pass, K., Cox, C., Seltzer, R.R., Conley, M.R., Brody, L.C. (2005) Folate-related genes and omphalocele. *Am. J. Med. Genet. A*. 136(1): 8-11.
- Mitchell, H.K., Snell, E. E., Williams, R. J. (1941) The concentration of folic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 63: 2284.
- Mitchell, L.E., Murray J.C., O'Brien S., Christensen K. (2001) Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population. *Am. J. Epidemiol.* 153(10): 1007-1014.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L. (1998) Tablas de Composición de Alimentos. . 4^a Edición. Ed. Pirámide. Madrid (España).
- Mori, C., Nakamura, N., Okamoto, Y., Osawa, M., Shiota, K. (1994) Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation. *Anat. Embryol. (Berl)*. 190(1): 21-28.

- Moshal, K.S.**, Sen, U., Tyagi, N., Henderson, B., Steed, M., Ovechkin, A.V., Tyagi, S.C. (2006) Regulation of homocysteine-induced MMP-9 by ERK1/2 pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290(3): C883-891.
- Mossey, P.A.**, Little, J., Munger, R.G., Dixon, M.J., Shaw, W.C. (2009) Cleft lip and palate. *Lancet.* 374(9703): 1773-1785.
- Mullis, K.B.** y **Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Munger, R.G.**, Sauberlich, H.E., Corcoran, C., Nepomuceno, B., Daack-Hirsch, S., Solon, F.S. (2004) Maternal vitamin B-6 and folate status and risk of oral cleft birth defects in the Philippines. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 70(7): 464-471.
- Munjaj, C.**, Givvimani, S., Qipshidze, N., Tyagi, N., Falcone, J.C., Tyagi, S.C. (2011) Mesenteric vascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Mol. Cell Biochem.* 348(1-2): 99-108.
- Murillo, J.**, Maldonado, E., Barrio, M.C., Del Río, A., López, Y., Martínez-Sanz, E., González, I., Martín, C., Casado, I., Martínez-Alvarez, C. (2009) Interactions between TGF-beta1 and TGF-beta3 and their role in medial edge epithelium cell death and palatal fusion in vitro. *Differentiation.* 77(2): 209-220.
- Murray, J.C.** y **Schutte, B.C.** (2004) Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J. Clin. Invest.* 113(12): 1676-1678.

N

- Nakamura, S.I.**, Kawai, T., Kamakura, T., Ookura, T. (2009) TGF-beta3 is expressed in taste buds and inhibits proliferation of primary cultured taste epithelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 46(1): 36-44.
- National Research Council** (1995) Nutrient requirements of the mouse. In: Nutrient requirements of laboratory animals. *National Academy Press, Washington, DC.* Fourth Revised Edition. pp. 80-102.
- Natsume, N.**, Nagatsu, Y., Akiyama, Y., Kawai, T. (1999) Influence of folic acid on pregnant women. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 37(5): 421-422.

Nawshad, A., LaGamba, D., Hay, E.D. (2004) Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch. Oral Biol.* 49(9): 675-689.

Noden, D.M. y Trainor, P.A. (2005) Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J. Anat.* 207(5): 575-601.

O

O'Brien, M.D. y Gilmour-White, S. (1993) Epilepsy and pregnancy. *BMJ.* 307(6902): 492-495.

Oakley, G.P. Jr. (2009). The scientific basis for eliminating folic acid-preventable spina bifida: A modern miracle from epidemiology. *Ann. Epidemiol.* 19(4): 226-230.

Olivares, A.B., Ros, G., Bernal, M.J., Martínez, C., Periago, M.J. (2005) Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 55(1): 1-12.

Oyama, K., Sugimura, Y., Murase, T., Uchida, A., Hayasaka, S., Oiso, Y., Murata, Y. (2009) Folic acid prevents congenital malformations in the offspring of diabetic mice. *Endocr. J.* 56(1): 29-37.

P

Padmanabhan, R. (2006) Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects. *Congenit Anom. (Kyoto).* 46: 55-67.

Pearson, C.A., Pearson, D., Shibahara, S., Hofsteenge, J., Chiquet-Ehrismann, R. (1988) Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF- β . *EMBO J.* 7(10): 2977-2982.

Pellis, L., Dommels, Y., Venema, D., Polanen, A., Lips, E., Baykus, H., Kok, F., Kampman, E., Keijer, J. (2008) High folic acid increases cell turnover and lowers differentiation and iron content in human HT29 colon cancer cells. *Br. J. Nutr.* 99(4): 703-708.

- Pelton, R.W.,** Dickinson, M.E., Moses, H.L., Hogan, B.L.M. (1990a) *In situ* hybridization analysis of TGF β 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF β 1 and β 2. *Development*. 110: 609-620.
- Pelton, R.W.,** Hogan, B.L., Miller, D.A., Moses, H.L. (1990b) Differential expression of genes encoding TGFs β 1, β 2, and β 3 during murine palate formation. *Dev. Biol.* 141: 456-460.
- Pelton, R.W.,** Saxena, B., Jones, M., Moses, H.L., Gold, L.I. (1991) Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J. Cell Biol.* 115(4): 1091-1105.
- Piedrahita, J.A.,** Oetama, B., Bennett, G.D., van Waes, J., Kamen, B.A., Richardson, J., Lacey, S.W., Anderson, R.G., Finnell, R.H. (1999) Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nat Genet.* 23(2): 228-232.
- Pita, G. (1998)** Ácido fólico y vitamina B12 en la nutrición humana. *Revista Cubana Aliment. Nutr.* 12(2): 107-119.
- Pitkin, R.M. (2007)** Folate and neural tube defects. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(suppl): 285S–288S.
- Prescott, N.J. y Malcom, S. (2002)** Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac. J.* 39(3): 327-331.
- Proetzel, G.,** Pawlowski, S.A., Wiles, M.V., Yin, M., Boivin, G.P., Howles, P.N., Ding, J., Ferguson, M.W., Doetschman, T. (1995) Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat. Genet.* 11(4): 409-414.
- Purohit, V.,** Abdelmalek, M.F., Barve, S., Benevenga, N.J., Halsted, C.H., Kaplowitz, N., Kharbanda, K.K., Liu, Q.Y., Lu, S.C., McClain, C.J., Swanson, C., Zakhari, S. (2007) Role of S-adenosylmethionine, folate, and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium. *Am. J. Clin. Nutr.* 86(1): 14-24.

R

- Raines, E.W. (2000)** The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 81(3): 173-182.
- Ramírez, N.J.,** Arboleda, G., Arboleda, H. (2007) Reparación del ADN: Una posible relación entre la deficiencia de folato y la muerte neuronal. *Acta biol. Colomb.* 12(2): 135-142.
- Ray, J.G.,** Meier, C., Vermeulen, M.J., Wyatt, P.R., Cole, D.E. (2003) Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. *J. Pediatr.* 143(6): 805-807.
- Reynolds, E. (2002)** Fortification of flour with folic acid. Fortification has several potential risks. *BMJ.* 324(7342): 918.
- Reynolds, P.R.,** Schaalje, G.B., Seeqmilller, R.E. (2003) Combination therapy with folic acid and methionine in the prevention of retinoic acid-induced cleft palate in mice. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol. (Part A)* 67: 168–173.
- Rice, R.,** Spencer-Dene, B., Connor, E.C., Gritli-Linde, A., McMahon, A.P., Dickson, C., Thesleff, I., Rice, D.P. (2004) Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *J. Clin. Invest.* 113: 1692-1700.
- Roberts, A.B.,** Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H. I., Fauci, A.S. (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(12): 4167-4171.
- Robertson, K.D. y Jones, P.A. (2000)** DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis.* 21(3): 461-467.
- Romitti P.A.,** Lidral A.C., Munger R.G., Daack-Hirsch S., Burns T.L., Murray J.C. (1999) Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: Evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology.* 59: 39-50.
- Roncalés, M.,** Achón, M., Manzarbeitia, F., Maestro de las Casas, C., Ramírez, C., Varela-Moreiras G., Pérez-Miguelsanz, J. (2004) Folic acid supplementation for 4 weeks affects liver morphology in aged rats. *J. Nutr.* 134(5): 1130-1133.

Ros, G., Periago, M.J., Iniesta, M.D. (2008) Folatos: Funcionalidad y salud. *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ* . Volumen VI: 11-40.

Rosenquist, T.H., Bennett, G.D., Brauer, P.R., Stewart, M.L., Chaudoin, T.R., Finnell, R.H. (2007) Microarray analysis of homocysteine-responsive genes in cardiac neural crest cells in vitro. *Dev. Dyn.* 236(4): 1044-1054.

Ross, M.E. (2010) Gene–environment interactions, folate metabolism and the embryonic nervous system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2(4): 471-480.

Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kolhouse, J.F., Kamen, B.A., Anderson, R.G. (1990) The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J. Cell Biol.* 110(3): 637-649.

Rothenberg, S.P., da Costa, M.P., Sequeira, J.M., Cracco, J., Roberts, J.L., Jeremy Weedon, J., Quadros, E.V. (2004) Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N. Eng. J. Med.* 350: 134-142.

S

Sadove, A.M., van Aalst, J.A., Culp, J.A. (2004) Cleft palate repair: art and issues. *Clin. Plast. Surg.* 31(2): 231-241.

Said, H.M. y Redha, R. (1987) A carrier-mediated transport for folate in basolateral membrane vesicles of rat small intestine. *Biochem. J.* 247(1): 141-146.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732): 1350-1354.

Saito, T., Cui, X.M., Yamamoto, T., Shiomi, N., Bringas, P. Jr., Shuler, C.F. (2005) Effect of N'-nitrosornicotine (NNN) on murine palatal fusion in vitro. *Toxicology.* 207(3): 475-485.

Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., Doetschman, T. (1997) TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development.* 124(13): 2659-2670.

Sant'Anna, L.B. y Tosello, D.O. (2006) Fetal alcohol syndrome and developing craniofacial and dental structures--a review. *Orthod. Craniofac. Res.* 9(4): 172-185.

- Santini, R.,** Brewster, C., Butterworth, C.E. Jr. (1964) The distribution of folic acid active compounds in individual foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 14: 205-210.
- Santoso, M.I. y Rohman, M.S. (2006)** Decreased TGF-beta1 and IGF-1 protein expression in rat embryo skull bone in folic acid-restricted diet. *J. Nutr. Biochem.* 17(1): 51-56.
- Schmid, P.,** Cox, D., Bilbe, G., Maier, R., McMaster, G.K. (1991) Differential expression of TGF β 1, β 2 and β 3 genes during mouse embryogenesis. *Development.* 111(1): 117-130.
- Schubert, J.,** Schmidt, R., Syska, E. (2002) B group vitamins and cleft lip and cleft palate. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 31(4):410-3.
- Schüpbach, P.M.,** Chamberlain, J.G., Schroeder, H.E. (1983) Development of the secondary palate in the rat: a scanning electron microscopic study. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 3(2): 159-177.
- Shah, N.M.,** Groves, A.K., Anderson, D.J. (1996) Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell.* 85(3): 331-343.
- Shah, R.M. (1990)** Differentiation of cyclophosphamide-treated hamster secondary palate: ultrastructural and biochemical observations. *Am. J. Anat.* 187(1): 1-11.
- Sharma, P.,** Senthilkumar, R.D., Brahmachari, V., Sundaramoorthy, E., Mahajan, A., Sharma, A., Sengupta, S. (2006) Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis.* 5: 1.
- Shaw, G.M.,** Carmichael, S.L., Laurent, C., Rasmussen, S.A. (2006) Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. *Epidemiology.* 17(3): 285-291.
- Shaw, G.M.,** Carmichael, S.L., Laurent, C., Louik, C., Finnell, R.H., Lammer, E.J. (2007) Nutrient intakes in women and risks of anophthalmia and microphthalmia in their offspring. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 79(10): 708-713.
- Shaw, G.M.,** Lammer, E.J., Wasserman, C.R., O'Malley, C.D., Tolarova, M.M. (1995) Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet.* 346(8972): 393-396.
- Sheehy, T.W. (1961)** How much folic acid is safe in pernicious anemia? *Am. J. Clin. Nutr.* 9: 708-714.
- Shojania, A.M. (1980)** Problems in the diagnosis and investigation of megaloblastic anemia. *Can. Med. Assoc. J.* 122(9): 999-1004.

- Shojania, A.M. (1984)** Folic acid and vitamin B12 deficiency in pregnancy and in the neonatal period. *Clin. Perinatol.* 11(2): 433-459.
- Shuler, C.F., Halpern, D.E., Guo, Y., Sank, A.C. (1992)** Medial edge epithelium fate traced by cell lineage analysis during epithelial-mesenchymal transformation in vivo. *Dev. Biol.* 154(2): 318-330.
- Silberstein, G.B., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Daniel, C.W. (1992)** Regulation of mammary morphogenesis: evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by transforming growth factor β -1. *Dev. Biol.* 152(2): 354-362.
- Simmons, C.J., Mosley, B.S., Fulton-Bond, C.A., Hobbs, C.A. (2004)** Birth defects in Arkansas: Is folic acid fortification making a difference? *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 70(9): 559-564.
- Skiba, W.E., Taylor, M.P., Wells, M.S., Mangum, J.H., Awad W.M. Jr. (1982)** Human hepatic methionine biosynthesis. Purification and characterization of betaine: homocysteine S-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 257(24): 14944-14948.
- Spiegelstein, O., Mitchell, L.E., Merriweather, M.Y., Wicker, N.J., Zhang, Q., Lammer, E.J., Finnell, R.H. (2004)** Embryonic development of folate binding protein-1 (folbp1) knockout mice: effects of the chemical form, dose, and timing of maternal folate supplementation. *Dev. Dyn.* 231: 221-231.
- Spina, V., Psillakis, J.M., Lapa, F.S. (1972)** Classificação das fissuras lábio-palatinas: sugestão de modificação. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo.* 27: 5-6.
- Sporn, M.B. y Roberts, A.B. (1990)** TGF- β : problems and prospects. *Cell Regulation.* 1: 875-882.
- Stekol, J.A, Weiss, S., Anderson, E.I., Hsu, P.T., Watjen, A. (1957)** Vitamin B12 and folic acid in relation to methionine synthesis from betaine *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 226(1): 95-102.
- Stokstad, E.L. y Jukes, T.H. (1987)** Sulfonamides and folic acid antagonists: a historical review. *J. Nutr.* 117(7): 1335-1341.
- Stopper, H., Treutlein, A.T., Bahner, U., Schupp, N., Schmid, U., Brink, A., Perna, A., Heidland, A. (2008)** Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23(10): 3272-3279.
- Strong, E.B. y Buckmiller, L.M. (2001)** Management of the cleft palate. *Facial Plast. Surg. Clin. North. Am.* 9(1): 15-25, VII.

Strum, W., Nixon, P.F., Bertino, J.B., Binder, H.J. (1971) Intestinal folate absorption. 1,5-methyltetrahydrofolic acid. *J. Clin. Invest.* 50(9): 1910-1916.

Sun, D., Vanderburg, C.R., Odierna, G.S., Hay, E.D. (1998) TGF- β 3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme *in vitro*. *Development.* 125: 95-105.

T

Takechi, R., Taniguchi, A., Ebara, S., Fukui, T., Watanabe, T. (2008) Biotin deficiency affects the proliferation of human embryonic palatal mesenchymal cells in culture. *J. Nutr.* 138(4): 680-684.

Takigawa, T. y Shiota, K. (2004) Terminal differentiation of palatal medial edge epithelial cells *in vitro* is not necessarily dependent on palatal shelf contact and midline epithelial seam formation. *Int. J. Dev. Biol.* 48(4): 307-317.

Tamura, T. y Picciano, M.F. (2006) Folate and human reproduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 83(5): 993-1016.

Tandon, A., Tovey, J.C.K., Sharma, A., Gupta, R., Mohan, R.R. (2010) Role of transforming growth factor beta in corneal function, biology and pathology. *Curr. Mol. Med.* 10(6): 565-578.

Taneyhill, L.A. y Bronner-Fraser, M. (2006) Recycling signals in the neural crest. *J. Biol.* 4(3): 10.

Tang, L.S. y Finnell, R.H. (2003) Neural and orofacial defects in *Folbp1* knockout mice. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 67(4):209-18. Erratum in: *Birth Defects Res. Part A. Clin. Mol. Teratol.* 67(6): 473.

Tang, L.S., Santillano, D.R., Wlodarczyk, B.J., Miranda, R.C., Finnell, R.H. (2005) Role of *Folbp1* in the regional regulation of apoptosis and cell proliferation in the developing neural tube and craniofacies. *Am J Med Genet Part C (Semin Med Genet).* 135C: 48-58.

Taniguchi, K., Sato, N., Uchiyama, Y. (1995) Apoptosis and heterophagy of medial edge epithelial cells of the secondary palatine shelves during fusion. *Arch. Histol. Cytol.* 58: 191-203.

- Taya, Y., O'Kane, S., Ferguson, M.W. (1999)** Pathogenesis of cleft palate in TGF- β 3 knockout mice. *Development*. 126: 3869-3879.
- Thomas, K.R. y Capecchi, M.R. (1987)** Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51(3): 503-12.
- Thompson, N.L., Flanders, K.C., Smith, J.M., Ellingsworth, L.R., Roberts, A.B., Sporn, M.B. (1989)** Expression of transforming growth factor- β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J. Cell. Biol.* 108(2): 661-9.
- Thomson, D.L. (1947)** The folic acid story. *Can. Med. Assoc. J.* 56(4): 432-435.
- Tolarova, M. y Harris, J. (1995)** Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology*. 51(2): 71-78.
- Trainor, P.A. (2005)** Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16(6): 683-693.
- Tudela, C., Formoso, M.A., Martínez, T., Pérez, R., Aparicio, M., Maestro, C., Del Río, A., Martínez, E., Ferguson, M., Martínez-Alvarez, C. (2002)** TGF- β 3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 333-336.
- Tyagi, N., Kandel, M., Munjal, C., Qipshidze, N., Vacek, J.C., Pushpakumar, S.B., Metreveli, N., Tyagi, S.C. (2011)** Homocysteine mediated decrease in bone blood flow and remodeling: role of folic acid. *J. Orthop. Res.* 29(10): 1511-1516.
- Tyler, M-S- y Pratt, R.M. (1980)** Effect of epidermal growth factor on secondary palatal epithelium in vitro: tissue isolation and recombination studies. *J. Embryo. Exp. Morphol.* 58: 93-106.

U

- Ulrey, C.L., Liu, L., Andrews, L.G., Tollefsbol, TO. (2005)** The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum. Mol. Genet.* 14 Spec No 1: R139-147.

V

- Van der Kolk, C.A. (2000)** Cleft palate. Craniomaxillofacial, left, and pediatric Surgery (plastic surgery: indications, operations and outcomes, vol. 2). *Ed. Mosby. St. Louis (U.S.A.)* 799-807.
- Van Rooij, I.A., Ocké, M.C., Straatman, H., Zielhuis, G.A., Merkus, H.M., Steegers-Theunissen, R.P. (2004)** Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev. Med.* 39(4): 689-694.
- Varela-Moreiras, G. y Alonso-Aperte, E. (1999)** Ácido fólico y salud. *Fundación Española de Nutrición. Serie Informes. N° 10.*
- Varela-Moreiras, G., Escudero, J.M., Alonso-Aperte, E. (2007)** Homocisteína, vitaminas relacionadas y estilos de vida en personas de edad avanzada: estudio SÉNECA. *Nutr. Hosp.* 22(3): 363-370.
- Varela-Moreiras, G., Ruiz-Roso, B., Varela, G. (1991)** Effects of long term administration of acetaminophen on the nutritional utilization of dietary protein. *Ann. Nutr. Metabol.* 35: 303–308.
- Vaziri Sani, F., Hallberg, K., Harfe, B.D., McMahon, A.P., Linde, A., Gritli-Linde, A. (2005)** Fate-mapping of the epithelial seam during palatal fusion rules out epithelial-mesenchymal transformation. *Dev. Biol.* 285(2): 490-495.
- Verkleij-Hagoort, A., Blik, J., Sayed-Tabatabaei, F., Ursem, N., Steegers, E., Steegers-Theunissen, R. (2007)** Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am. J. Med. Genet. A.* 1;143A(9): 952-960.
- Vieira, A.R., Cooper, M.E., Marazita, M.L., Castilla, E.E., Orioli, I.M. (2008)** Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41(8): 689-693.
- Vogel, W.F. (2001)** Collagen-receptor signaling in health and disease. *Eur. J. Dermatol.* 11(6): 506-514.

W

Wald, N.J., Law, M.R., Morris, J.K., Wald, D.S. (2001) Quantifying the effect of folic acid. *Lancet*. 358: 2069-2073.

Weingaertner, J., Fanghaenel, J., Bienengraeber, V., Gundlach, K.K. (2005) Initial findings on teratological and developmental relationships and differences between neural tube defects and facial clefting. First experimental results. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 33: 297–300.

Weingärtner, J., Lotz, K., Fanghänel, J., Gedrange, T., Bienengräber, V., Proff, P. (2007) Induction and prevention of cleft lip, alveolus and palate and neural tube defects with special consideration of B vitamins and the methylation cycle. *J. Orofac. Orthop.* 68(4): 266-277.

Weingärtner, J., Martens, A., Bienengräber, V., Fanghänel, J., Kundt, G. (2004) Do folic acid and thiocyanate have a preventive effect on exogenously induced disturbances of embryonic cranial development? *Clin. Oral Invest.* 8: 161–164.

Werler, M.M., Hayes, C., Louik, C., Shapiro, S., Mitchell, A.A. (1999) Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am. J. Epidemiol.* 150(7): 675-682.

Wilcox, A.J., Lie, R.T., Solvoll, K., Taylor, J., McConnaughey, D.R., Abyholm, F., Vindenes, H., Vollset, S.E., Drevon, C.A. (2007) Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *B.M.J.* 334(7591): 464.

Wilcox, J.N. y **Derynck, R.** (1988) Developmental expression of transforming growth factors alpha and beta in mouse fetus. *Mol. Cell Biol.* 8(8): 3415-3422.

Williams, P.J., Bulmer, J.N., Innes, B.A., Broughton-Pipkin, F. (2011) Possible roles for folic acid in the regulation of trophoblast invasion and placental development in normal early human pregnancy. *Biol. Reprod.* 8

Winkels, R.M., Brouwer, I.A., Siebelink, E., Katan, M.B., Verhoef, P. (2007) Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(2): 456-473.

Wright, A.D., Martin, N., Dodson, P.M. (2008) Homocysteine, folates, and the eye. *Eye.* 22(8): 989-993.

Wu, M.Y. y **Hill, C.S.** (2009) Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev. Cell.* 16(3): 329-343.

X

Xiao, S., Hansen, D.K., Horsley, E.T., Tang, Y.S., Khan, R.A., Stabler, S.P., Jayaram, H.N., Antony, A.C. (2005) Maternal folate deficiency results in selective upregulation of folate receptors and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-E1 associated with multiple subtle aberrations in fetal tissues. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 73(1): 6-28.

Xiao, W.L., Shi, B., Zheng, Q., Zheng, Q., Wang, Y., Huang, L. (2009) MTHFR gene silencing affects mouse embryonic palatal mesenchymal cell proliferation and apoptosis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 18(3): 282-286.

Xiao, W.L., Wu, M., Shi, B. (2006) Folic acid rivals methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene-silencing effect on MEPM cell proliferation and apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 292: 145–154.

Xu, X., Han, J., Ito, Y., Bringas, P. Jr., Urata, M.M., Chai, Y. (2006) Cell autonomous requirement for Tgfb2 in the disappearance of medial edge epithelium during palatal fusion. *Dev. Biol.* 297: 238-248.

Xu, Y., Li, L., Zhang, Z., Li, Y. (2006) Effects of folic acid and Vitamin B12 on ethanol-induced developmental toxicity in Mouse. *Toxicology Letters.* 167: 167–172.

Xu, Z., Shen, M.X., Ma, D.Z., Wang, L.Y., Zha, X.L. (2003) TGF-beta1-promoted epithelial-to-mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF-beta1-enhanced cell migration in SMMC-7721 cells. *Cell. Res.* 13(5): 343-350.

Y

Yang, L.T. y Kaartinen, V. (2007) Tgf-b1 expressed in the Tgfb3 locus partially rescues the cleft palate phenotype of Tgfb3 null mutants. *Dev. Biol.* 312(1): 384-395.

Yao, C., Evans, C.O., Stevens, V.L., Owens, T.R., Oyesiku, N.M. (2009) Folate receptor alpha regulates cell proliferation in mouse gonadotroph alphaT3-1 cells. *Exp. Cell Res.* 315(18): 3125-3132.

Yao, Z., Chen, D., Wang, A., Ding, X., Liu, Z., Ling, L., He, Q., Zhao, T. (2011) Folic acid rescue of ATRA-induced cleft palate by restoring the TGF- β signal and inhibiting apoptosis. *J. Oral Pathol. Med.* 40(5): 433-439.

Yazdy, M.M., Honein, M.A., Xing, J. (2007) Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the U.S. grain supply. *Birth Defects Res. A.Clin. Mol. Teratol.* 79(1): 16-23.

Yoshikawa, H., Kukita, T., Kurisu, K., Tashiro, H. (1987) Effect of retinoic acid on in vitro proliferation activity and glycosaminoglycan synthesis of mesenchymal cells from palatal shelves of mouse foetuses. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 7(1): 45-51.

Yoshino T. (1968) The clinical and experimental studies on the metabolism of folic acid using tritiated folic acid. I. Absorption tests of tritiated folic acid in man. *J. Vitaminol. (Kyoto).* 14(1): 21-34.

Yu, Z., Lin, J., Xiao, Y., Han, J., Zhang, X., Jia, H., Tang, Y., Li, Y. (2005) Induction of cell-cycle arrest by all-trans retinoic acid in mouse embryonic palatal mesenchymal (MEPM) cells. *Toxicol. Sci.* 83: 349-354.

Z

Zaina, S., Lindholm, M.W., Lund, G. (2005) Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia? *J. Nutr.* 135(1): 5-8.

Zakrzewski, S.F., y Sansone, A. (1967) Mechanism of reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate. Studies with 7-methyldihydrofolate as a model compound. *J. Biol. Chem.* 242(24): 5661-5666.

Zeisel, S.H. (2009) Importance of methyl donors during reproduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 89(2): 673S-677S.

Zhang, X., Liu, H., Cong, G., Tian, Z., Ren, D., Wilson, J.X., Huang, G. (2008) Effects of folate on notch signaling and cell proliferation in neural stem cells of neonatal rats in vitro. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 54(5): 353-356.

Zhang, X.M., Huang, G.W., Tian, Z.H., Ren, D.L., Wilson, J. (2009) Folate deficiency induces neural stem cell apoptosis by increasing homocysteine in vitro. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 45(1): 14-19.

Zhu, H., Cabrera, R.M., Wlodarczyk, B.J., Bozinov, D., Wang, D., Schwartz, R.J., Finnell, R.H. (2007) Differentially expressed genes in embryonic cardiac tissues of mice lacking *Folr1* gene activity. *BMC Dev. Biol.* 7:128.

Direcciones electrónicas empleadas:

www.nestle.es

www.nlm.nih.gov/medlineplus

