

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

## *Expression of Metalloproteinases in Palate Development: Systematic Literature Review*

### Estefanía Cuéllar Rivas

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

### Mario Alejandro Ortiz Salazar

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

### Judy Villavicencio Flórez

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

### RESUMEN

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

### PALABRAS CLAVE

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

### ÁREAS TEMÁTICAS

Biología molecular; desarrollo craneofacial

### ABSTRACT

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

### KEYWORDS

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

### THEMATIC FIELDS

Craniofacial development; molecular biology

### CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

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

doi:10.11144/Javeriana.uo33-71.empp

Recibido para publicación: 22/05/2014

Aceptado para publicación: 12/09/2014

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

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo del paladar en humanos comienza alrededor de la quinta semana y termina en la duodécima semana de desarrollo intrauterino. Embriológicamente, inicia con la formación de dos primordios: el paladar primario y el secundario. El primario se origina por la unión de las prominencias nasales mediales en superficie y profundidad, que conformarán la porción premaxilar del maxilar superior, también llamada *segmento intermaxilar*. Esta porción tiene tres componentes: el labial, que formará el surco nasolabial del labio superior; el maxilar, que corresponderá a la zona anterior del maxilar y formará los cuatro incisivos superiores y su mucosa bucal, y el palatino, que tiene forma triangular con el vértice dirigido hacia la parte posterior y originará el paladar primario (1).

En la sexta semana se establece la comunicación entre las cavidades nasal y oral, debido a la perforación de la membrana buconasal, y se formará la coana primitiva ubicada detrás del paladar primario. El paladar secundario comienza su formación alrededor de la séptima semana de desarrollo intrauterino con dos estructuras mesenquimatosas que se extienden desde las caras internas de las prominencias o maxilares. Estas prolongaciones reciben el nombre de procesos o crestas palatinas laterales y están conformadas en su interior por tejido mesenquimal y exteriormente están rodeadas de epitelio estratificado plano, cuya capa más superficial está formada por células peridérmicas (2).

La morfogénesis del paladar secundario conlleva dos procesos. En primer lugar, se reorientan los procesos palatinos laterales verticales en una posición horizontal por encima de la lengua. Después, se fusionan los procesos palatinos en la línea media (3).

La formación del paladar es de crítica importancia para la separación de la nasofaringe de la orofaringe. Cualquier alteración en los reguladores del desarrollo de este proceso es capaz de producir un paladar fisurado (4). En las últimas décadas se han empleado biomodelos para el estudio de la palatogénesis. Por esta razón, es importante conocer cómo es el proceso de elevación del paladar en el embrión de ratón y de rata (5-8). En el embrión del ratón, el proceso de formación del paladar se da entre los días 12 y 15 de desarrollo, y en la rata se estima que la elevación de los procesos palatinos laterales ocurre aproximadamente entre el día 16 y el 17,5 (9-12). Esta fusión transcurre en un corto tiempo, en el cual el epitelio del borde medial de las crestas se interrumpe para

dar continuidad al mesénquima. La fusión completa del paladar secundario requiere que desaparezca el epitelio de la línea media (también llamado epitelio del borde medial), el cual, como han propuesto varios autores, puede experimentar apoptosis, transformación epitelio-mesenquimal o migración de las células epiteliales hacia la cavidad oral y nasal (2,3).

Se han propuesto varias teorías sobre la elevación y fusión del paladar. Algunas de ellas están relacionadas con el mecanismo de elevación de las crestas palatinas en las cuales se establecen factores extrínsecos. Se pueden mencionar el descenso de la lengua (10,13-15), el levantamiento de la cabeza del pecho que le permite a la lengua caer como resultado de la contracción de los músculos del cuello y el crecimiento en longitud de las vértebras cervicales (16,17). También se han descrito factores intrínsecos que se dan por la interacción de los componentes básicos de células mesenquimales, la matriz extracelular y el epitelio del borde medial. Entre estos factores se encuentra el acortamiento de las fibras elásticas (16,18), la contracción del colágeno sintetizado (19,20) y, por hidratación, la expansión funcional de las matrices (21,22).

La evidencia sobre la reorientación de las crestas palatinas muestra que su expansión es modulada por diferentes componentes de la matriz extracelular, como colágeno (tipos I, II y III), ácido hialurónico y fibronectina, los cuales varían en relación con su composición durante el proceso y se asocian con cambios en su morfología. El colágeno III y la fibronectina desaparecen en porciones de regiones del mesénquima medial y central y el ácido hialurónico se convierte en el componente principal de la matriz extracelular (MEC) en estas regiones. Estos cambios se pueden relacionar con una disminución de la síntesis o un aumento de la degradación de la matriz (23,24). El mantenimiento y la degradación de esta MEC son mediados en parte por metaloproteinasas de matriz (MMP) y sus inhibidores endógenos (TIMP) (25).

### **Metaloproteinasas y su función en el desarrollo palatino**

El remodelado de la matriz extracelular es un evento importante en diversos procesos biológicos, como la migración, la proliferación y la diferenciación celular, además de las interacciones célula-célula y la muerte celular (26). Las proteinasas que degradan la MEC cumplen un papel importante en el remodelado del tejido. Entre estas se encuentran las MMP, una familia de proteinasas secretadas como proenzimas o zimógeno inactivo (27,28).

La actividad proteolítica de las MMP es adquirida por la activación del zimógeno y finamente regulada por los TIMP (29). Estos últimos son proteínas de 20 a 30 kDa que interactúan de manera directa con las MMP al unirse a su sitio activo por medio de un pequeño número de aminoácidos. Un desequilibrio entre la función de las MMP y su regulación por los TIMP puede llevar a condiciones patológicas como destrucción tisular (artritis, cáncer o enfermedad periodontal) (26).

Las MMP se pueden clasificar teniendo en cuenta la especificidad del sustrato, la similitud de la secuencia y la organización del dominio. El primer grupo, las colagenasas intersticiales, degrada colágeno tipos I, II y III. A este grupo pertenecen las MMP-1, -8 y -13. El segundo grupo son las gelatinasas que degradan gelatinas, colágenos no fibrilares IV, V y VII, fibronectina, laminina y elastina. Se incluyen en ese grupo la MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B) (30). El tercer grupo son las estromelinas que degradan tipos variables de componentes de la MEC. Entre ellas se encuentran: fibronectina, laminina, proteoglicanos y colágenos no fibrilares IV, V, IX, y X. Incluyen también la MMP-3, -10 y -11, el grupo de matrilisinas que carece del dominio de hemopexina y al cual pertenecen la MMP-7 y -26 (31,32).

Por otro lado, se encuentran las MMP asociadas a membrana o MT-MMP que tienen una función importante en la activación de progelatinasas como resultado de la degradación de gran cantidad de componentes de la MEC. Por último, existen otras MMP que no han sido clasificadas en ninguna de las categorías anteriores. Comprenden las MMP-12, -19 y -20 (33).

En el grupo de proteasas de matriz extracelular se encuentra una nueva familia que ha sido hallada en mamíferos e invertebrados. Es una desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina (ADAMTS) (34).

Cuatro clases de inhibidores de las MMP están presentes en los espacios extracelulares y en los fluidos corporales. Actualmente, están descritos cuatro TIMP: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Estos poseen la capacidad de inhibir todas las MMP, entre los cuales TIMP-1 es el preferente inhibidor de MMP-9 y TIMP-2 lo es de MMP-2. Los TIMP se encuentran ampliamente expresados en todos los tejidos y se regulan en su mayoría de manera conjunta con las MMP (35).

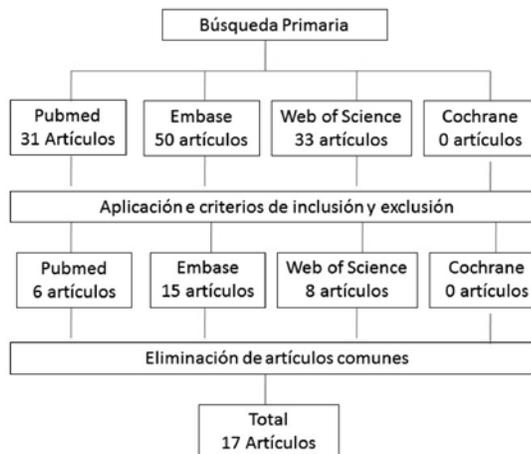
En las últimas décadas se han realizado estudios que evidencian la participación de MMP y TIMP en el desa-

rollo del paladar. Estas investigaciones incluyen estudios en humanos y en murinos (ratas y ratones). Por tal motivo, se consideró necesario conocer cuáles son los moduladores de matriz que intervienen en el desarrollo del paladar. Se plantea qué cambios en la expresión de estos moduladores podrían generar alteraciones en la morfogénesis craneofacial, como ocurre en el caso del labio y paladar fisurado. El objetivo de esta revisión fue clasificar los estudios sobre la palatogénesis que involucraran la participación de MMP y TIMP, y su relación con patologías como labio y paladar fisurado no sindrómico, a través de una revisión sistemática.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La revisión sistemática fue llevada a cabo siguiendo las recomendaciones del *Manual Cochrane de revisión de intervenciones 5.1.0* (<http://www.cochrane.es>). Se realizó una búsqueda computarizada en diferentes bases de datos (PubMed, EMBASE, Web of Science y Cochrane) hasta mayo del 2014, con los términos booleanos paladar (*palate*), desarrollo (*development*), palatogénesis (*palatogénesis*), metaloproteinasas de matriz (*matrix metalloproteinases* [MMP]), inhibidores endógenos (*tissue inhibitors of metalloproteinases* [TIMP]), matriz extracelular (*extracellular matrix*) y labio y paladar fisurado (*cleft lip and palate*). La estrategia de búsqueda de información se muestra en el anexo y el flujograma de manejo de los artículos encontrados se describe en la figura 1. Los estudios *in vivo* se evaluaron por medio de los siguientes criterios: no limitación de idioma, fuente de datos primaria, especies usadas (humanos, ratas, ratones, conejos, perros, gatos o monos), tamaño de la muestra, tipo de muestra, técnica de evaluación usada, datos de la metaloproteinasas. Se eliminaron artículos de revisión, artículos de estudios *in vitro* y artículos repetidos en las bases de datos.

FIGURA 1  
SELECCIÓN DE LOS ARTÍCULOS



## RESULTADOS

En el periodo de búsqueda desde 1996 hasta el 2014, se identificó un total de 114 artículos, de los cuales se seleccionaron 17 que cumplieron con los criterios de inclusión. Se descartaron las revisiones de tema y aquellos que no cumplieran con las especificaciones necesarias para responder con el objetivo de la revisión. De las referencias seleccionadas se obtuvieron 11 de estudios que involucraban modelos animales (ratas y ratones) y 6 realizados en humanos. Los resultados de la revisión de la literatura especializada se presentan en la anexa.

## DISCUSIÓN

### Estudios en animales

Los estudios en murinos han determinado la presencia MMP y sus inhibidores en el desarrollo palatino. En relación con el grupo de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), colagenasas (MMP-13) y estromelinas (MMP-3), autores como Iamaroon y colaboradores (36), Morris y colaboradores (23,24), Mansell y colaboradores (25), Blavier y colaboradores (37), Brown y colaboradores (38), de Oliveira y colaboradores (39), Gkantidis y colaboradores (40) e Hirata y colaboradores (41) han demostrado, al usar diferentes técnicas de laboratorio, su implicación en la palatogénesis en el ratón. Los primeros estudios en paladar empezaron por detectar la presencia de gelatinasas y estromelinas.

Desde 1996, Iamaroon y colaboradores (36) determinaron la presencia de MMP-2 por zimografía en gel e inmunohistoquímica en estadios tempranos. Morris y colaboradores (23,24), en estadios posteriores (E12, E13 y E14), describieron la distribución temporoespacial de MMP-2, MMP-3, MMP-9 y MMP-13 en las crestas palatinas durante el curso de la palatogénesis *in vivo* en el ratón. Los resultados indicaron estas MMP y las TIMP-1 y -2 estaban presentes en el mesénquima palatino 30 horas antes de la reorientación y cierre y su expresión aumentaba en el remodelado de las crestas, en el cierre y la fusión. Estos resultados son similares a los hallados en el 2000 por Mansell y colaboradores (25), quienes encontraron que hay expresión de MMP-2, MMP3, TIMP-1 y -2 en el paladar de ratas Wistar en estadios E15, E16 y E17. Concluyeron que las cantidades de TIMP-1, -2 y MMP-3 se mantenían constantes de E15 a E17; mientras que las de MMP-2 mostraron una elevación significativa de E15 a E17, momento crítico para la elevación y fusión del paladar en ratas. De Oliveira y colaboradores (39) e Hirata y colaboradores (41) confirmaron la presencia de MMP-2 -9 y -3

durante el desarrollo palatino en ratones en estadios E13, E14,5 y E15 en el mesénquima y el epitelio del borde medial.

Con relación al grupo de las colagenasas, se ha detectado la expresión de MMP-13. Blavier y colaboradores (37) realizaron estudios del paladar de ratón en E14,5 y por técnicas de hibridación *in situ* concluyeron que la MMP-13 y la TIMP2 se expresan en el epitelio del borde medial (EBM). Sus resultados indican que la MMP-13 se distribuye tanto en el EBM como en el mesénquima adyacente; mientras que la MMP-2 se encontró en las células mesenquimales alrededor del EBM. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Gkantidis y colaboradores (40) quienes, a través de la misma técnica de hibridación *in situ*, determinaron la presencia de MMP-13 en la línea media del paladar, que coincide con el EBM en el momento de la fusión del paladar y la presencia de MMP-2, la cual estaba distribuida en la región nasal y palatina. Además, estos autores emplearon una técnica de zimografía *in situ* en el estadio E14,5 en el ratón y concluyeron que en la zona de los pliegues epiteliales laterales hay una fuerte actividad gelatinolítica, generada como consecuencia de la elevación del paladar.

Con respecto a la inhibición de las MMP, Brown y colaboradores (38) estudiaron en cultivos de paladares enteros el efecto de un inhibidor sintético de las MMP (BB-3103) sobre la actividad de MMP-2. Estos autores encontraron que en concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  del inhibidor no ocurre la fusión del paladar y no detectaron actividad de MMP-2. Blavier y colaboradores (37) hallaron el mismo efecto del inhibidor sintético pero en menores concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ .

Sobre otros tipos de metaloproteinasas estudiadas en el paladar, se hallaron los estudios publicados en el 2010 por Brown y Nazarali (42) y por Enomoto y colaboradores (43). Los primeros revelaron el papel de la MMP-25 (metaloproteinasa de membrana). Dichos autores concluyen que esta metaloproteinasa se encuentra en todos los estadios de desarrollo del paladar secundario en ratón, con una mayor expresión en el estadio E13,5, y se localiza en el epitelio apical de las crestas palatinas y en el mesénquima adyacente a estas. Por otro lado, Enomoto y colaboradores (43) estudiaron dos metaloproteinasas de la familia ADAMTS, Adamts20 y Adamts9, en la palatogénesis. Los hallazgos sugieren que Adamts20 se expresa en el mesénquima palatino; mientras que Adamts9 se expresa exclusivamente en el endotelio microvascular del paladar.

## Estudios en humanos

Sobre las MMP y TIMP involucradas en el desarrollo palatino humano, los estudios son escasos. Estos se centran en polimorfismos en diferentes genes promotores para metaloproteinasas y la probabilidad de que estas alteraciones puedan llevar a una falla en la fusión o en la aparición de labio y paladar fisurado no sindrómico.

Blanton y colaboradores (44) evidenciaron una asociación entre los individuos con labio y paladar fisurado no sindrómico y translocaciones en los genes de cromosomas ubicados en 10p13, 16p13,3 (MMP25). Estos resultados señalan la importancia de la MMP-25 en el desarrollo palatino, tal como se demostró en el estudio con modelo animal publicado por Brown y colaboradores, en el 2010 (42).

En el 2007, Letra y colaboradores (45) reportaron los polimorfismos en el gen promotor de MMP-9 y su asociación con el labio y paladar fisurado no sindrómico, sin encontrar evidencia de la asociación fenotípica. Estos resultados difieren con los encontrados en el modelo animal reportados por Morris (23,24), Brown y colaboradores (38), de Oliveira y colaboradores (39), Gkantidis y colaboradores (40) y Hirata y colaboradores (41), quienes demostraron la participación de MMP-9 en el desarrollo palatino.

En otro estudio publicado en el 2007, Letra y colaboradores (46) determinaron los polimorfismos en genes promotores de MMP-1 y MMP-3 asociados con el labio y paladar fisurado no sindrómico. Encontraron una asociación entre el polimorfismo en el gen de MMP-3 y el labio y paladar fisurado. Estos resultados coinciden con los encontrados por Morris y colaboradores (23,24), Mansel y colaboradores (25), Brown y colaboradores (38), de Oliveira y colaboradores (39) e Hirata y colaboradores (41), en los cuales se muestra la expresión de MMP-3 en la palatogénesis del ratón y su importancia para la degradación del EBM. La no participación de MMP-1 puede deberse a que, de acuerdo con los estudios previos, no se ha reportado la expresión de MMP-1 en la palatogénesis y su inclusión en el estudio fue debida a que su localizado adyacente al gen de MMP-3 en el cromosoma 11q22,3.

Estos hallazgos fueron corroborados nuevamente en el 2012 por Letra y colaboradores (47), quienes al investigar la asociación de 14 polimorfismos en genes de MMP y TIMP en 494 individuos con fisuras orales y 413 individuos de grupo control, identificaron una

asociación significativa con polimorfismos en MMP-3 y TIMP-2, lo que sugiere que pueden contribuir con un fenotipo de fisura. Estos últimos estudios realizados en humanos reafirman lo encontrado por Morris (23,24), Blavier y colaboradores (37) y Brown y colaboradores (38) en biomodelos murinos, y los hallados por Bueno y colaboradores (48) en cultivo de células madre de pulpa dental de pacientes con labio y paladar fisurado, los cuales detectaron diferentes genes involucrados con los mecanismos de remodelación de MEC y transformación epitelio-mesenquimal del paladar, donde hallaron una relación con la disminución de MMP-3.

Por último, en el 2013, Smane y colaboradores (49) tomaron muestras de tejidos blandos de 30 pacientes, 19 con labio y paladar fisurado sometidos a cirugías correctivas y 11 como grupo control. Las muestras se procesaron para inmunohistoquímica de MMP-2, TIMP-2 y técnica de TUNEL para determinar la apoptosis. Los resultados sugieren que hubo un mayor número de células epiteliales positivas a TUNEL en el grupo control en comparación con el grupo con labio y paladar fisurado. Estos eventos sugieren una asociación con una disminución en la muerte celular programada en las células del EBM. Además, se observó una expresión menor de TIMP-2 en el grupo control al ser comparado con el grupo con labio y paladar fisurado. Estos resultados confirman lo encontrado por Letra y colaboradores (47) con relación a una asociación entre el gen de TIMP-2 y la población con fisuras orales.

## CONCLUSIÓN

En síntesis, los resultados de esta revisión contribuyen a confirmar la importancia de las metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores en el desarrollo del paladar. Ello ha sido evidente en modelos animales y en estudios en seres humanos. Los estudios en ratones demuestran la participación de MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-13 y MMP-25, ADAMTS9, ADAMTS20 y TIMP-1, -2, -3 en diferentes estadios trascendentales para la formación del paladar. Sin embargo, los estudios en seres humanos son escasos y solo se han relacionado los polimorfismos en MMP-3, MMP-25 y TIMP-2 con la presencia de fisuras oropalatinas no sindrómicas. Los futuros estudios deben encaminarse a identificar la asociación de otras MMPy TIMP y su relación con diversas patologías craneofaciales, con el fin de entender más a fondo su mecanismo de acción y función en la morfogénesis craneofacial.

## AGRADECIMIENTOS

Esta revisión de la literatura deriva del proyecto de investigación titulado *Estudio de la palatogénesis en un biomodelo de obesidad materna inducida por dieta de cafetería*, el cual fue financiado con fondos derivados de la convocatoria interna, código interno 1720, de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle, en Cali, Colombia.

## REFERENCIAS

- Gómez de Ferraris M, Campos Muñoz A. Histología y embriología bucodental. 2ª ed. Madrid: Panamericana; 2002.
- Cuevo R, Covarrubias L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogénesis. *Development* [internet]. 2004; 131(1): 15-24. Disponible en: <http://dev.biologists.org/content/131/1/15.long>.
- Montenegro MA, Rojas M. Aspectos moleculares en la formación de la cara y del paladar. *Int J Morphol* [internet]. 2005; 23(2): 185-94. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022005000200014](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022005000200014).
- Chevenix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG. Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet* [internet]. 1992; 51(6): 1377-85. Disponible en: <http://keppel.qimr.edu.au/contents/p/staff/CV123.pdf>.
- Sasaki Y, Taya Y, Saito K, Fujita K, Aoba T, Fujiwara T. Molecular contribution to cleft palate production in cleft lip mice. *Congenit Anom (Kyoto)* [internet]. 2014; 54(2): 94-9. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cga.12038/full>.
- Nakazawa M, Matsunaga K, Asamura S, Kusuhara H, Isogai N, Muragaki Y. Molecular mechanisms of cleft lip formation in CL/Fr mice. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2008; 42(5): 225-32.
- Diewert VM, Wang KY. Recent advances in primary palate and midface morphogenesis research. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1992; 4(1): 111-30.
- Bienengraber V, Malek F, Fanghanel J, Kundt G. Disturbances of palatogenesis and their prophylaxis in animal experiments. *Ann Ant*. 1999; 181(1): 111-5.
- Ferguson MV. Palatal shelf elevation in the Wistar rat fetus. *J Anat*. 1978; 125(Pt3): 555-77.
- Zeiler KB, Weinstein S, Gibson RD. A study of the morphology and the time of closure of the palate in the albino rat. *Arch Oral Biol*. 1964; 9: 545-54.
- Schubach PM, Chamberlain JG, Schroeder HE. Development of the secondary palate in the rat: a scanning electron microscopic study. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1983; 3(2): 159-77.
- Bush JO, Jiang R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development*. 2012; 139(2): 231-43.
- Asling CW, Nelson MM, Dougherty HD, Wright HV, Evans HM. The development of cleft palate resulting from maternal pterylglutamic (folic) acid deficiency during the latter half of gestation in rats. *Surg Gynecol Obstet*. 1960; 111: 19-28.
- Coleman R. Development of the rat palate. *Anat Rec*. 1965; 151(2): 107-17.
- Parada C, Han D, Chai Y. Molecular and cellular regulatory mechanisms of tongue myogenesis. *J Dent Res* [internet]. 2012; 91(6): 528-35. Disponible en: <http://jdr.sagepub.com/content/91/6/528.short>
- Walker BE. Correlation of the embryonic movement with palate closure in mice. *Teratol*. 1969; 2(3): 191-7.
- Ross RB, Lindsay WK. The cervical vertebrae as a factor in etiology of cleft palate. *Cleft Palate J*. 1965; 36: 274-81.
- Walker B, Fraser F. Closure of the secondary palate in three strains of mice. *J Embryol Exp Morph*. 1956; 4(2): 176-89.
- Hassel JR, Orkin RW. Synthesis and distribution of collagen in the rat palate during shelf elevation. *Dev Biol*. 1976; 49(1): 80-8.
- Keith DA. The role of the connective tissue in craniofacial development, function and disease. *Int J Oral Surg*. 1980; 9(5): 321-42.
- Moss ML, Salentijn L. The primary role of functional matrices in facial growth. *Am J Orthod*. 1969; 55(6): 566-77.
- Turley EA, Hollenberg MD, Pratt RM. Effect of epidermal growth factor/urogastrone on glycosaminoglycan synthesis and accumulation in vitro in the developing mouse palate. *Differentiation*. 1985; 28(3): 279-85.
- Morris-Wiman J, Du Y, Brinkley L. Occurrence and temporal variation in matrix metalloproteinases and their inhibitors during murine secondary palate morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1999; 19(4): 201-12.
- Morris-Wiman J, Burch H, Basco E. Temporospatial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl)* [internet]. 2000; 202(2): 129-41. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s004290000098>.
- Mansell JP, Kerrigan J, McGill J, Bailey J, TeKoppele J, Sandy JR. Temporal changes in collagen composition and metabolism during rodent palatogenesis. *Mech Ageing Dev*. 2000; 119(1-2): 49-62.
- Evosimovska B, Velockovski B, Dlmova C, Veleska-Ste-fkowska D. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases). *J Cell Anim Biol*. 2011; 5(7): 113-20.
- Basbaum CB, Werb Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol*. 1996; 8(5): 731-8.
- Werb Z, Chin JR. Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Ann NY Acad Sci*. 1998; 857: 110-8.
- Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka

- EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther.* 1993; 59(3): 329-41.
30. Ortega N, Wang K, Ferrara N, Werb Z, Vu TH. Complementary interplay between matrix metalloproteinase-9, vascular endothelial growth factor and osteoclast function drives endochondral bone formation. *Dis Model Mech.* 2010; 3(3-4): 224-35.
  31. Woessner JF, Woessner AJBDRF. 134-Matrilysin. handbook of the proteolytic enzymes. 2nd ed. London: Academic Press; 2004. pp. 532-7.
  32. Malesud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci.* 2006; 11: 1696-701.
  33. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827-39.
  34. Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7(4): 160-9.
  35. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 878: 388-403.
  36. Iamaroon A, Wallon UM, Overall CM, Diewert VM. Expression of 72-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-2) in the developing mouse craniofacial complex. *Arch Oral Biol.* 1996; 41(12): 1109-19.
  37. Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, DeClerck YA, Kaartinen V. TGF-beta 3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell* [internet]. 2001; 12(5): 1457-66. Disponible en: <http://www.molbiolcell.org/content/12/5/1457.long>.
  38. Brown NL, Yarrama SJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res.* 2002; 81(12): 826-30.
  39. de Oliveira Demarchi AC, Zambuzzi WF, Paiva KB, da Silva-Valenzuela M, Nunes FD, de Cassia Savio Figueira R, Sasahara RM, Demasi MA, Winnischofer SM, Sogayar MC, Granjeiro JM. Development of secondary palate requires strict regulation of ECM remodeling: sequential distribution of RECK, MMP-2, MMP-3, and MMP-9. *Cell Tissue Res.* 2010; 340(1): 61-9.
  40. Gkantidis N, Blumer S, Katsaros C, Graf D, Chiquet M. Site-specific expression of gelatinolytic activity during morphogenesis of the secondary palate in the mouse embryo. *PLoS One.* 2012; 7(10): e47762.
  41. Hirata A, Katayama K, Tsuji T, Natsume N, Sugahara T, Koga Y, Takano K, Otsuki Y, Nakamura H. Heparanase localization during palatogenesis in mice. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 760236.
  42. Brown GD, Nazarali AJ. Matrix metalloproteinase-25 has a functional role in mouse secondary palate development and is a downstream target of TGF-beta3. *BMC Dev Biol.* 2010; 10: 93.
  43. Enomoto H, Nelson CM, Somerville RP, Mielke K, Dixon LJ, Powell K, Apte SS. Cooperation of the two ADAMTS metalloproteinases in closure of the mouse palate identifies a requirement for versican proteolysis in regulating palatal mesenchyme proliferation. *Development.* 2010; 137(23): 4029-38.
  44. Blanton SH, Bertin T, Serna ME, Stal S, Mulliken JB. Association of chromosomal regions 3p21.2, 10p13 and 16p13.3 with nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2004; 125A(1): 23-7.
  45. Letra A, da Silva RA, Menezes R, Souza AP, de Almeida AL, Sogayar MC, Granjeiro JM. Studies with MMP9 gene promoter polymorphism and nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2007; 143(1): 89-91.
  46. Letra A, Silva RA, Menezes R, Astolfi CM, Shinohara A, de Souza AP, Granjeiro JM. MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate : association with MMP3 but not MMP1. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(10): 954-60.
  47. Letra A, Silva RM, Motta LG, Blanton SH, Hecht JT, Granjeiro JM, Vieira AR. Association of MMP3 and TIMP2 promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. *Res A Clin Mol Teratol.* 2012; 94(7): 540-8
  48. Bueno DF, Sunaga DY, Kobayashi GS, Aguenta M, Raposo-Amaral CE, Masotti C, Cruz LA, Pearson PL, Passos-Bueno MR. Human stem cell cultures from cleft lip/palate patients show enrichment of transcripts involved in extracellular matrix modeling by comparison to controls. *Stem Cell Rev.* 2011; 7(2): 446-57.
  49. Smane L, Pilmane M, Akota I. Apoptosis and MMP-2, TIMP-2 expression in cleft lip and palate. *Stomatologija.* 2013; 15(4): 129-34.

## CORRESPONDENCIA

Estefanía Cuéllar Rivas  
[estefania.cuellar@correounivalle.edu.co](mailto:estefania.cuellar@correounivalle.edu.co)

Mario Alejandro Ortiz Salazar  
[mario.ortiz@correounivalle.edu.co](mailto:mario.ortiz@correounivalle.edu.co)

Judy Villavicencio Flórez  
[judy.villavicencio@correounivalle.edu.co](mailto:judy.villavicencio@correounivalle.edu.co)

Autores y año de publicación	Objetivo del estudio	MMP y TIMP estudiada	Especie	Técnica de laboratorio	Resultados
Iamaroon y colaboradores, 1992 (36)	Observar la presencia de enzimas involucradas en la degradación de la matriz extracelular durante la morfogénesis craneofacial	MMP-2	Ratones CD1 estadios E10 y E11	Zimografía en gelatina y por inmunofluorescencia indirecta y directa con microscopía convencional	La MMP-2 se expresó en regiones periféricas de las prominencias nasales y faciales, mandíbula, segundo arco branquial, y la cara alrededor del ojo en desarrollo
Morris y colaboradores, 1999 (23)	Determinar si las MMP y TIMP son regulados temporoespacialmente durante la morfogénesis del paladar murino	MMP-2, 3, 7, 9 y 13 TIMP 1 y 2	Ratones CD1 estadios E12, E13 y E14	Zimografía en gel, con o sin inhibidores, Western Blot	Las MMP y TIMP estudiados están presentes en el curso de remodelado de las crestas palatinas y su expresión es regulada en el tiempo
Morris y colaboradores, 2000 (24)	Examinar la distribución temporoespacial de las MMP y TIMP en las crestas palatinas y determinar los cambios específicos que ocurren en su distribución	MMP-2, 3, 9, 13 TIMP-1, 2, 3	Ratones CD1 estadios E12, E13 y E14	Inmunofluorescencia	Distribución de MMP y TIMP en regiones específicas del mesénquima palatino y la membrana basal epitelial.
Mansell y colaboradores, 2000 (25)	Estudiar la composición y metabolismo del colágeno en la formación del paladar y su relación con la expresión de MMP y TIMP	MMP-2, 3 TIMP-1, 2	Rata Wistar en estadios E15, E16 y E17. Y postnatales de 5 días	Cuantificación de colágeno por análisis de flujo continuo, cromatografía líquida de alta presión, cultivos <i>in vitro</i> de paladar, zimografía en gel, zimografía reversa y ensayo de sustrato fluorogénico	Los niveles de TIMP-1 y 2 y MMP-3 se mantuvieron constantes en E15 a E17. Los niveles de MMP-2 mostraron una elevación significativa de la E15 a E17

<b>Autores y año de publicación</b>	<b>Objetivo del estudio</b>	<b>MMP y TIMP estudiada</b>	<b>Especie</b>	<b>Técnica de laboratorio</b>	<b>Resultados</b>
Blavier y colaboradores, 2001 (37)	Proveer evidencia que las MMP son requeridas para la fusión completa del paladar y su expresión está controlada por TGF-β3	MMP-2, 13, MT1-MMP TIMP-2	Ratones silvestres y mutantes para TGF-β3 estadio E14.5	Histología por H-E, hibridación in situ, cultivo de órganos, ensayos de Northern y Western Blot	MT1-MMP y el TIMP-2 altamente expresadas en el EBM. La MMP-13 se expresó en el mesénquima y el EBM, MMP-2 en las células mesenquimales adyacentes al EBM. El mutante TGF-β3 con paladar secundario fisurado mostró ausencia completa de TIMP-2 en línea media y expresó niveles más bajos de MMP-13 y niveles más reducidos de MMP-2
Brown y colaboradores, 2002 (38)	Examinar el rol potencial de las MMP en el desarrollo del paladar de ratón	MMP-2, -3	Ratones CD1 en estadios E13-15	Cultivos de paladares con un inhibidor de la palatogénesis en el ratón (BB3103), histología, zimografía en gel e inmunohistoquímica	La MMP-3 está involucrada en la TEM y su persistencia puede explicar porque el paladar está fusionado
Blanton y colaboradores, 2004 (44)	Determinar las regiones de translocación cromosómica asociada con labio y paladar no sindrómico, y genes de MMP	MMP-1,2, 3, 7, 8, 10, 12, 13,15, 20,23, 25,	65 familias múltiples con labio y paladar fisurado no sindrómico (206 no afectados y 179 afectados)	Genotipado por los programas ABI Genescan y Genotyper	Sólo se halló asociación de la MMP-25 y la presencia de labio y paladar fisurado no sindrómico
Letra y colaboradores, 2007 (45)	Evaluar si una disminución de los niveles de MMP puede llevar a una falla en la fusión y al labio fisurado y labio y paladar fisurado	MMP-9	Humanos no sindrómicos de labio y paladar fisurado (n = 125) e individuos sanos (control) (n = 173)	PCR-RFLP y electroforesis en gel	No hay asociación genotípica en ninguno de estos grupos

Autores y año de publicación	Objetivo del estudio	MMP y TIMP estudiada	Especie	Técnica de laboratorio	Resultados
Letra y colaboradores, 2007 (46)	Determinar si los polimorfismos en los genes promotores MMP se asocian con labio y paladar fisurado	MMP-1, 3	Humanos no sindrómicos de labio y paladar fisurado (n = 170) e individuos sanos (control) (n = 225)	PCR-RFLP con imprimadores alelo específicos (MMP3 = 333) polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (MMP-1, n = 395)	Se encontraron diferencias significativas para MMP-3 en las frecuencias alélicas con fenotípicas. Hay una asociación entre el polimorfismo del gen de MMP-3 y el labio y paladar fisurado
Brown y colaboradores, 2010 (42)	Determinar la expresión de MMP-25 en el desarrollo del paladar secundario en ratón	MMP-25	Rata Wistar E-12.5-15.5	PCR en tiempo real cuantitativo, hibridación <i>in situ</i> , análisis Western Blot e inmunohistoquímica	Los mRNA de la MMP-25 y la proteína son encontrados en todos los estadios de desarrollo de paladar secundario en ratón, con la más alta expresión en el día E 13,5
Enomoto y colaboradores, 2010 (43)	Obtener evidencia genética de ADAMTS en el cierre del paladar secundario	ADAMTS9, 20	Se utilizaron varias cepas de ratones knockout Adamt9lacZ7+, btbei, Vcanhdf, y alelos nulos de Adamts4, Adamts5 en estadios E7,5, E13,5 y E14,5	Análisis por microtomografía computarizada, microscopía electrónica de barrido, histología, inmunohistoquímica, histoquímica con $\beta$ -galactosidasa e hibridación <i>in situ</i> , y cultivo de paladar	ADAMTS20 se expresa en el mesénquima palatino y ADAMTS9 se expresa en el endotelio microvascular del paladar. El mesénquima de las crestas palatinas de ADAMTS20 tuvo una reducción en la proliferación celular, una menor densidad celular y una disminución del versicano, del proteoglicano de la MEC
de Oliveira y colaboradores, 2010 (39)	Describir la participación de RECK otras MMP durante el desarrollo del paladar	MMP-2, 3, 9	Ratones suizos ( <i>Mus musculus</i> ) en estadios E13, E14, E14,5 y E15	Hibridación <i>in situ</i> , PCR en tiempo real, inmunohistoquímica, zimografía en gel	Los resultados sugieren la participación del gen RECK en la modulación de MMP2 y MMP9, en la palatogénesis

Autores y año de publicación	Objetivo del estudio	MMP y TIMP estudiada	Especie	Técnica de laboratorio	Resultados
Bueno y colaboradores, 2011 (48)	Comparar el transcriptoma de cultivos de células madre dentales de pulpa de pacientes con labio y paladar fisurado no sindrómico con los controles	MMP-1, 3	Individuos con labio y paladar fisurado no sindrómico (n = 6) y controles (n = 6)	Microarray por PCR en tiempo real cuantitativa, cultivo de células madre de pulpa dentales	Las células madre dentales de pulpa de pacientes con labio y paladar fisurado no sindrómico exhiben firmas de expresión genética de genes involucrados con mecanismos de remodelación del paladar y procesos de TEM que difieren de los encontrados por los controles
Gkantidis y colaboradores, 2012 (40)	Determinar el patrón de expresión de MMP en la palatogénesis del ratón	MMP-2, 9, 13, 14	Ratones cepa C57BL/6 y embriones Bmp7 con alelo nulo en estadios E13.5-E14.5-E15.5	Zimografía <i>in situ</i> , inmunofluorescencia e hibridación <i>in situ</i>	Los mRNA de MMP-2 y 14 pero no la MMP-9 y 13 fueron expresados en el mesénquima alrededor de los pliegues epiteliales de las crestas palatinas elevadas. Débil actividad gelatinolítica en la línea media del paladar E14.5 que aumentó durante la fusión en E15,5
Letra y colaboradores, 2012 (47)	Comprobar la asociación de 14 genes de MMP y TIMP como candidatos para la aparición de fisuras orales	MMP-3 TIMP-2	Individuos con labio y paladar fisurado (n = 494) e individuos control (n = 413)	PCR en tiempo real	Los polimorfismos en MMP-3 y en TIMP-2 mostraron una asociación significativa con todos los tipos de fisura y los análisis de interacción entre gen-gen sugieren que en MMP3 y TIMP2 pueden contribuir interactivamente para el desarrollo de un fenotipo de fisura

Autores y año de publicación	Objetivo del estudio	MMP y TIMP estudiada	Especie	Técnica de laboratorio	Resultados
Smane y colaboradores, 2013 (49)	Detectar la aparición y distribución de proteínas de señalización específica y apoptosis en el tejido facial de niños con fisura de labio y paladar bilateral completa (CBCLP)	MMP-2 TIMP-2	Pacientes con labio y paladar fisurado (n = 19) y controles (n = 11)	Inmunohistoquímica y el método TUNEL	Las células del tejido conectivo positivas para TIMP-2 incrementaron en la lámina propia de la mucosa oral probando que la disminución local de la apoptosis en pacientes de labio y paladar fisurado. La expresión prominente de MMP-2 en las fisuras afectó los tejidos blandos indicando un posible incremento del remodelamiento tisular
Hirata y colaboradores, 2013 (41)	Evaluar la distribución de heparanasa en los paladares de ratón en desarrollo	MMP-2, 3, 9	Ratones C57BL/6 en estadios E13.5, E14.5 y E15.5	Histología convencional e inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	La distribución de heparanasa está presente en las células epiteliales de las crestas palatinas elevadas y media la degradación de MEC de las crestas palatinas. Se observó distribución de MMP-2,-9 y-3 en el paladar embrionario en el EBM

EBM: epitelio del borde medial; TEM: transformación epitelio-mesénquima; PCR-RFLP: por sus siglas en inglés: *Restriction Fragment Site Polymorphism*.