



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Dinámicas volumétricas tisulares de las crestas palatinas integradas en los procesos maxilares: estudio estereológico durante el periodo embrionario humano

---

Anna M.<sup>a</sup> Cueto-González  
Tesis Doctoral  
2016





UNITAT D'ANATOMIA I D'EMBRIOLOGIA HUMANA  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MORFOLÒGIQUES  
FACULTAT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

# Dinàmicas volumètriques tisulars de las crestas palatines integradas en los procesos maxilares: estudio estereològico durante el periodo embrionario humano

Tesis presentada por: Anna M.<sup>a</sup> Cueto-González

Tesis doctoral para optar al título de Doctora en  
Morfología y Patología Estructural y Molecular

Director de la tesis: Prof. Dr. Josep Nebot-Cegarra

Prof. Dr. Josep Nebot-Cegarra

Anna M.<sup>a</sup> Cueto-González

Bellaterra, julio de 2016



“Porque los sueños pueden hacerse realidad”

A Marc y Albert  
A Jose  
A mis padres  
A mis hermanos



## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es como un iceberg. Yo no dejaré de ser más que el extremo visible como persona que la va a defender, pero debajo de ella está el esfuerzo, paciencia, complicidad, trabajo y cariño de tantas y tantas personas que han aportado muchas cosas a ella. Esta tesis es un poco de todos y es un buen ejemplo de trabajo en equipo, que conste en acta ;)

En primer lugar gracias a mi director de tesis. Josep, muchas gracias por aceptar la propuesta de realizar esta tesis hace muuuuuuchos años y ascender en el estudio del tubo digestivo hasta el paladar, mi "eabezota" objetivo. Gracias por las múltiples horas dedicadas, por "los cólicos del lactante", por ayudarme en esta etapa, por enseñarme tanta embriología y colateralmente también Photoshop® y Excel®. Por los momentos en que intertábamos "cambiar el mundo", por enseñarme a plasmar las ideas pensadas en escritas (aunque esto suponga cambiarlo mil veces), pero siempre con la banda sonora "no pares, sigue, sigue". Gracias por el intercambio de ideas, por las largas "discusiones" que finalmente han dado grandes frutos, aunque en un idioma que pocos entenderían (ej: el pmxd de Re1-27), je, je. Gracias por el espíritu final de leer los cientos de hojas que te iba enviando para revisar continuamente, hasta de madrugada, y por la emocionante firma final.

Gracias a todos los que formáis parte del Departament de Ciències Morfològiques de la Facultat de Medicina de la UAB por haberme dado ánimos en todo momento de este largo camino y sobre todo porque siempre me habéis hecho sentir parte de él, me habéis adoptado. A Manel y Rafa por sus conversaciones y ánimos; a Rosa por dejarme sus libros y por las conversaciones para darme ánimos; a Alfonso por invitarme a algún café bien temprano cuando llegaba con sueño; a Josep por las conversaciones a primera hora comentando las últimas noticias; a Pere Jordi por encontrarme el lado bueno a pesar de ser de Terrassa, hacerme reír y ver que un jueves ya era final de semana. Y como no a mis tres "hicas" a Mar, Silvia y Anna, gracias por los "mimitos" y abrazos de energías en todo momento, por darme ánimos, por ayudarme a resolver cualquier duda sobre plazos, tiempos y departamentos, enseñarme la importancia de un buen rotulador rojo y un "arpesano" negro con separadores y que si el jueves dejaba de ser el día de la tortilla de patatas podía ser el del Frankfurt. Y a Anna por presentarme cibernéticamente a Miguel pudiendo aclarar con él dudas matemáticas, gracias Miguel por tu ayuda.

Gracias a todos los estudiantes del laboratorio de embriología de la facultad que durante todos estos años de alguna manera han formado parte del análisis o captura de estos embriones: Marta, Teresa, Elena, Cristina, Andrea, Judit, Karla, Marta, Inés, Adolfo, Aleix, Joan, Sarai, Aina, Manu, Xènia y al resto de estudiantes que a lo largo de estos años han estado en el laboratorio y han colaborado de alguna forma.

Gracias a todas las maravillosas personas y amigos que forman el Área de Genética Clínica y Molecular del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona). Gracias por adaptaros a los jueves, por entender mis días de nervios, por darme ánimos cuando me desanimaba, por hacerme de psicóloga en mis momentos de desesperación, por vuestros mimos y porque en este espíritu final me habéis ayudado liberándome de algunos compromisos para que pudiera dedicarme a la tesis. Gracias a Isa, Patri, M.<sup>a</sup> Jesús e Isabel por ayudar cambiando agendas y adaptándoos a horarios; a Neus por sus consejos y ánimos; a Chus por su beso y abrazo dulce de cada madrugada en el trabajo cuando ni había salido el sol, su comida, detallitos y ánimos; a Mercè por cuidarme, por sus detalles, por sus ánimos, por vigilar que desayunara y entender que a veces los encargos se me acumulaban; a Irene por sus ánimos en todo momento; a Mar por darme consejos, por sus ánimos y ayudarme enseñándome nuevos programas; a Laia por su terapia de primera hora y ánimos; a Eduardo por animarme, por entender mi



esprint final y ayudarme con la dura traducción a última hora de la tarde; a Fermina porque a pesar de llevar poco ya te he adoptado como una más, gracias por ayudarme en estas últimas semanas liberándome de trabajo y por tus ánimos; a Miguel porque, aunque lejos ahora, también me animaba para acabarla. A Alberto por su enorme paciencia, por escucharme, por sus consejos y ánimos en todo momento, intertado ayudar en todo lo que podía y por presentarme cibernéticamente a su hijo Xavi, el cual resolvió el gran conflicto con Photoshop®, gracias Xavi por la ayuda. A Nolo por ayudarme con dudas sobre los diferentes programas de edición. Y como no a mi gran Teresa, siempre has sido un pilar muy importante en el trabajo y lo sabes, gracias por todo, por la gran paciencia, por ser como eres, por ayudar a organizarme, animarme, por decirme las cosas claramente, por liberarme de trabajo a pesar de en esta última recta debería hacerlo yo a ti y por relativizar todo. Sois fantásticos, no cambiéis.

A Olaya y Pablo por sus consejos sobre como plantear escribir la tesis y por sus ánimos. Porque aunque haga pocos años que nos conocemos han sido personas muy cercanas y queridas, uno buenos amigos. A Sergio por haberme ayudado a resolver otras dudas matemáticas y aclarar conceptos. Y al resto de compañeros y amigos a los que de una forma u otra la tesis me ha hecho quitarles tiempo, por su paciencia.

A mis padres, M.<sup>a</sup> Carmen y Rafael, y hermanos, Laura y Rafa, por ser otro pilar importante, porque sin ellos no sería la persona que soy ni habría conseguido todo lo que he conseguido. Gracias por apoyarme y seguirme en cada nuevo proyecto que me he embarcado, aunque pensarais que era una locura, y por quererme tanto. Vosotros le habéis dedicado muchas horas también. A Rafa por sus aportaciones matemáticas y prácticas tan interesantes, y por sus ánimos. A Laura por sus ánimos, por su ayuda con la traducción, con los peques y con encargos, sobre todo en los últimos momentos de clausura. A mi padre por sus ánimos y consejos. Y a mi madre sin la que esta clausura final delante de un ordenador no hubiera sido posible, gracias por cuidar a los peques, por hacerme comidas con amor, por sus ánimos y -amenazas" y por estar ahí cuando te he necesitado. Sois la mejor familia, os quiero.

Ja,ja, no me quiero olvidar de Nuca por sus lamidas de cariño y por compartir al lado mío las largas madrugadas delante del ordenador mientras el resto dormía.

Y como no a los que más directamente he alterado su día a día, mi otro pilar importante, a mis tres príncipes. A Jose por apoyarme también en todas las locuras a las que me he animado, por entender el último año que saliera de casa cuando ni había salido el sol y me fuera a dormir de madrugada, por hacerme de psicólogo y animarme en los momentos de desesperación, por las largas charlas, por quedarte a mi lado junto al ordenador por las noches, por asumir casi todo en casa en estas últimas semanas de clausura, por entender que no podía ni salir a la calle entreteniéndome a los peques, por ayudarme con fotos editándolas con mucho tesón y cariño y por quererme tanto. Por hacer que estos momentos no fueran tan duros y porque no me sintiera más culpable de lo que me sentía. Y como no gracias a mis dos soles Marc y Albert, por ser lo mejor de esta vida, por vuestra sonrisa, por adaptaros tan bien, por hacerme reír imitándome con portátiles de cartón y llenar la casa de post-it en color rojo como yo hacía con mis borradores de a tesis, por vuestros bailes y canciones, por vuestros besos y miradas dulces cargados de energía y por vuestros maravillosos dibujos hechos con el cariño más grande para -el libro de mamá" que por fin verá la luz. Lo prometido es deuda, la portada es vuestra.

Aunque encerrada en clausura estas últimas semanas, me he dado cuenta de cuan importante puede ser un beso, un abrazo, el sol o un pájaro que viene a cantar a tu lado. Y porque es en estos momentos en los que te das cuenta de quién tienes a tu lado y quien te quiere... y tengo un montón :) Yo también os quiero mucho. Muchas gracias a todos.

Resumen





## RESUMEN

Las fisuras laterales de labio superior y las fisuras de paladar son uno de los defectos congénitos más prevalentes de la edad pediátrica, pudiéndose diagnosticar cada vez en edades de gestación más precoces. La falta de acuerdo sobre cómo se forma el paladar secundario humano nos ha inducido a analizar la formación y elevación de las crestas palatinas pero con un nuevo enfoque metodológico. Se han efectuado composiciones de microfotografías obtenidas de secciones histológicas seriadas de embriones humanos de estadios que comprenden todo el proceso de elevación de las crestas palatinas (estadios Carnegie (EC) 17 a 23). A diferencia de otros estudios previos sobre la palatogénesis en este trabajo de tesis se han analizado los cambios de volumen de las crestas palatinas integradas en el correspondiente proceso maxilar (zona de origen) y en concreto en un segmento de éste (segmento maxilar seleccionado (SMS)). Asimismo se han solventado los posibles errores de cálculo volumétrico que las características de cada ejemplar embrionario pudiera inducir (tamaños diferentes, grados de retracción tisular no homogéneos por el proceso de fijación histológica, cambios postmortem, etc.), al utilizar como variable comparativa entre estadios el porcentaje de ocupación volumétrica de cada una de las partes en que se dividió cada SMS. Los volúmenes se obtuvieron aplicando principios y técnicas estereológicas. Al comparar los porcentajes de ocupación volumétrica entre estadios embrionarios, hemos podido definir la dinámica volumétrica tisular de la zona que contiene mayoritariamente la correspondiente cresta palatina en sí misma (territorio medial) y la de las zonas adyacentes del SMS, y, al compararlas entre sí, deducir posibles relaciones con los mecanismos implicados en el proceso de formación y elevación de las crestas palatinas. Los resultados de este estudio han mostrado que la dinámica de crecimiento porcentual del volumen tisular del territorio medial del SMS (principal zona que integra a la correspondiente cresta palatina) es distinta en cada tercio. En el tercio posterior, el territorio medial crece marcadamente tanto al principio (intervalo (i) EC17-18) como en el medio (iEC19-20) del periodo de elevación de las crestas palatinas, mientras que en el tercio anterior sólo lo hace al final del proceso (iEC22-23). El patrón observado en el tercio medio del territorio medial es intermedio respecto a los otros dos. Este hecho junto con el de ser el tercio más estable de este territorio, permiten interpretar que es una zona de transición y/o de transferencia tisular entre ambos extremos. La comparación de los datos entre los territorios del SMS sugieren que habría un predominio de remodelación al principio (iEC17-18) del proceso de elevación de las crestas palatinas en los tercios posterior y medio, y en este último tercio también en la parte central de este periodo (iEC19-20). El resto de incrementos de porcentajes de volumen parecen responder más a proliferación local del mesénquima que a otros mecanismos, excepto el brusco incremento final (iEC22-23) del tercio anterior que es muy sugestivo que sea debido sobre todo a una elevación de las crestas palatinas por una rotación axial real. La aplicación de porcentajes de ocupación volumétricos de diferentes territorios se ha demostrado una buena herramienta de análisis, ya que relativiza los resultados al desechar el factor decrecimiento global.

Palabras clave: paladar, crestas palatinas, palatogénesis, desarrollo, embriología, embrión humano, estereología.

## ABSTRACT

The lateral fissures upper lip and cleft palates are one of the most prevalent birth defects in pediatric age and increasingly can be diagnosed at ages earliest gestation. The non-consensus that exist about the development and elevation of human palatal shelves led us to study this topic with a new methodological approach. We made microphotography compositions obtained from serial histological sections of human embryonic stages (Carnegie stages (CS) 17 to 23) comprising the entire elevation process of palatal shelves. In contrast with other previous studies about palatogenesis, we focused in volume changes of palatal shelves integrated into the corresponding maxillary process (area of origin) and more specifically we analyzed one of its segments (maxillary segment selected (MSS)). In addition, potential errors from volumetric calculation due to the own characteristics from each embryonic specimen such as different sizes, different grades of non homogeneous tissue retraction by histological fixing process, post-mortem changes were resolved by using the percentage of volume occupation of each part in which each MSS was divided as a comparative variable among stages. The volume was obtained by applying stereological principles and techniques. Analysis of differences in percentages of volumetric occupation between embryonic stages was useful to define the tissue volume dynamics of the area that mostly contains the corresponding palatal shelf itself (medial territory) and adjacent areas of MSS. Further comparisons of each other zones allowed us to deduce possible relations with the mechanisms involved in the formation and elevation of the palatal shelves. The results of this study show that the dynamics of percentage growth of tissue volume of the medial territory of MSS (main area which integrates the corresponding palatal ridge) is different in each third of the palate. In posterior third, the medial territory grows remarkably at the beginning (range (r) CS 17-18) and in the middle (rCS 19-20) period of the palatal elevation, while the anterior third only does at the end of the process (rCS 22-23). The pattern observed in the middle third of the medial territory is intermediate with respect to the other two. Given that this zone is also the most stable third of this territory we speculate that this is a transition zone and/or a tissue transfer between both extremes. The comparison of data between MSS territories suggests that there is a remodelling predominance at the beginning (rCS 17-18) of the elevation process of the palatal shelves in posterior and middle thirds and, in that last third, in the central part (rCS 19-20) of this period too. The remainder observed increases in volume percentages seem to respond more to a local mesenchymal proliferation than to other mechanisms, except for the sharp increase at the end (rCS 22-23) of the elevation period in the posterior third which may suggest that is mainly due to a rise of palatal shelves by a real axial rotation. The application of percentages of volumetric occupation of different territories between embryonic stages has shown good analysis tool and discards the factor of global growth.

Keywords: palate, palatal shelves, palatogenesis, development, embryology, human embryo, stereology.

# Índice





# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	21
INTRODUCCIÓN .....	23
1. DESARROLLO FACIAL Y PALATINO .....	25
1.1. Embriología .....	25
1.1.1. Embriología descriptiva .....	25
1.1.2. Embriología comparada en la palatogénesis .....	29
1.1.3. El proceso de elevación de las crestas palatinas .....	31
1.1.3.1. Hipótesis de mecanismos implicados en la elevación de las crestas palatinas .....	32
1.1.3.2. La contradicción de los datos en la bibliografía .....	33
-Zona donde se produce el inicio de la elevación de las crestas palatinas .....	33
-Factores intrínsecos .....	34
-Factores extrínsecos .....	35
-División de las diferentes regiones del paladar .....	37
1.2. Biología celular y molecular en la palatogénesis .....	38
1.2.1. Implicación de las células de la cresta neural en las crestas palatinas en desarrollo .....	39
1.2.1.1. Eje anteroposterior .....	41
1.2.1.2. Eje mediolateral .....	44
1.3. Fisuras palatinas .....	45
1.3.1. Tipos .....	46
1.3.2. Etiología .....	47
1.3.3. Epidemiología .....	49
1.3.4. Genes implicados en las fisuras orofaciales .....	52
2. CONDICIONANTES DE LOS ESTUDIOS EN EMBRIOLOGÍA .....	55
JU STIFICACIÓN .....	57
HIPÓTESIS .....	61
OBJE TIVOS .....	65
MATERIAL Y MÉTODOS .....	69
3. SELECCIÓN DEL MATERIAL .....	71
3.1. Selección de embriones .....	71
3.2. Selección de cortes embionarios .....	72
4. MICROFOTOGRAFÍAS .....	72
4.1. Obtención de microfotografías .....	72
4.2. Superposición de microfotografías .....	73
4.3. Archivo de imágenes .....	73



5. TRATAMIENTO ASISTIDO POR ORDENADOR DE LAS MICROFOTOGRAFÍAS .....	74
5.1. Orientación de las microfotografías y división derecha/izquierda .....	74
5.2. Reconstrucción de todas las microfotografías de la cabeza de cada embrión estudado .....	74
5.3. Segmento maxilar seleccionado (SMS) .....	75
5.4. Delimitación de la gradilla del SMS .....	78
5.5. Numeración de las celdas de la gradilla del SMS .....	80
5.6. Contraste y agrupación de las celdas de la gradilla del SMS .....	81
5.7. Obtención de imágenes binarias .....	82
5.8. Identificación individual de los grupos de celdas y medición de éstos .....	82
5.9. Edición de los resultados y exportación a un programa de cálculo.....	83
6. ANÁLISIS DE LOS DATOS .....	84
6.1. Volumen del SMS .....	84
6.1.1. División en tercios del SMS .....	84
6.1.2. División del SMS en territorios.....	85
6.1.3. Subdivisión del territorio medial .....	87
6.2. Cálculo volumétrico .....	88
6.3. Cálculo de promedios .....	90
6.3.1. Cálculo de los promedios de los valores estudiados.....	90
7. PERIODO DE CIERRE DE LA HENDIDURA BUCONASOFARINGEA Y SU DIVISIÓN EN INTERVALOS .....	91
8. CÁLCULO DE LAS DIFERENTES VARIABLES .....	92
8.1. Nomenclatura de las fórmulas .....	92
8.2. Volumen del SMS .....	92
8.3. Distribución porcentual del volumen del SMS entre sus territorios .....	93
8.3.1. Diferencias de la distribución porcentual del volumen del SMS en los intervalos del PCH.....	93
8.3.2. Índice de proporcionalidad entre las diferencias del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial y el equivalente de los otros dos territorios del SMS en los intervalos del PCH .....	94
8.3.3. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen de los tercios de los territorios del SMS .....	95
8.3.4. Diferencias de la distribución porcentual por tercios del volumen del SMS durante el PCH.....	95
8.3.5. Porcentajes de ocupación del volumen en las partes del territorio medial .....	96
8.3.6. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen de las partes del territorio medial respecto al SMS .....	97
8.4. Distribución porcentual del volumen de los territorios del SMS entre sus tercios .....	97
8.4.1. Diferencias de la distribución porcentual del volumen de cada territorio del SMS entre sus tercios en los intervalos del PCH .....	97
8.4.2. Índice de proporcionalidad entre las diferencias del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial y el equivalente de los otros dos territorios del SMS en los intervalos del PCH .....	98
8.4.3. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen por tercios respecto al volumen de los diferentes territorios del SMS .....	98
8.4.4. Diferencias de la distribución porcentual por tercios del volumen de los diferentes territorios del SMS durante el PCH .....	98

RESULTADOS .....	101
9. EMBRIOLOGÍA DESCRIPTIVA .....	103
10. VOLUMEN DEL SMS .....	106
11. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL VOLUMEN DEL SMS ENTRE SUS TERRITORIOS .....	108
11.1. Diferencias de la distribución porcentual del volumen del SMS en los intervalos del PCH .....	108
11.2. Índice de proporcionalidad entre las diferencias del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial y el equivalente de los otros territorios del SMS en los intervalos del PCH .....	112
11.3. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen de los tercios de los territorios del SMS .....	115
11.4. Diferencias de la distribución porcentual por tercios del volumen del SMS durante el PCH .....	115
11.5. Porcentajes de ocupación del volumen del SMS en las partes del territorio medial .....	116
11.6. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen de las partes del territorio medial respecto al SMS .....	117
12. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL VOLUMEN DE LOS TERRITORIOS DEL SMS ENTRE SUS TERCIOS .....	120
12.1. Diferencias de la distribución porcentual del volumen de cada territorio del SMS entre sus tercios en los intervalos del PCH .....	120
12.2. Índice de proporcionalidad entre las diferencias del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial y el equivalente de los otros territorios del SMS en los intervalos del PCH .....	122
12.3. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen por tercios respecto el volumen de los diferentes territorios del SMS .....	124
12.4. Diferencias de la distribución porcentual por tercios del volumen de los diferentes territorios del SMS durante el PCH .....	125
DISCUSIÓN.....	127
13. NUESTRO ESTUDIO: UNA ALTERNATIVA A DIVERSOS CONDICIONANTES .....	131
13.1. Características novedosas .....	133
13.2. Distribución porcentual del volumen del SMS .....	134
13.2.1. En el tercio posterior.....	134
13.2.2. En el tercio medio .....	135
13.2.3. En el tercio anterior .....	136
13.2.4. Resumen de los resultados observados en nuestro estudio .....	138
13.3. Distribución porcentual del volumen de los territorios del SMS .....	141
13.4. Relaciones con la biología celular y molecular .....	143
14. SUGERENCIAS DE NUEVAS LÍNEAS DE TRABAJO .....	146
CONCLUSIONES .....	149

BIBLIOGRAFÍA.....	153
ANEXOS .....	165
Anexo 1. TABLAS DE LOS VALORES DEL VOLUMEN DEL SMS .....	167
Anexo 2. MICROFOTOGRAFÍAS DE LOS FRAGMENTOS DE CADA SMS JUNTO CON LAS GRADILLAS DEL SMS DE CADA EMBRIÓN .....	171
EC17 .....	173
EC18 .....	176
EC19 .....	179
EC20 .....	182
EC21 .....	186
EC22 .....	188
EC23 .....	190

# Lista de abreviaturas





---

a	intervalo acumulado (Fig. 27)
ANT	tercio anterior
CLP	fisura lateral de labio superior con o sin fisura de paladar anterior
CP	fisura de paladar posterior aislada
E	edad en días
e	un estadio Carnegie determinado
e-1	estadio anterior a un estadio Carnegie determinado
EC	estadio Carnegie
i	intervalo del PCH (Fig. 27)
IP	índice de proporcionalidad
Inf	territorio inferior
LCR	longitud coronilla-rabadilla
ME	tercio medio
Med	territorio medial
Mt	territorio matriz
NoMed	territorios no medial, es decir, los territorios matriz inferior
P	porcentaje
PCH	periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea (Apartado 7)
pe	primer estadio Carnegie estudiado o estadio umbral
POST	tercio posterior
RNV	recién nacidos vivos
Sd	síndrome
SMS	segmento maxilar seleccionado (Apartado 5.3.)
t	tercio

T	territorio
tSMS	tercio del segmento maxilar seleccionado
tT	tercio del territorio
ue	último estadio Carnegie estudiado
V	volumen

---

Observación:

Cada dos páginas confrontadas, las equivalencias de las abreviaturas que aparecen en el texto se muestran en el pie de la página impar.

# Introducción







## 1. DESARROLLO FACIAL Y PALATINO

Los defectos congénitos craneofaciales son los más prevalentes en la edad pediátrica, pudiendo formar parte o no de diferentes complejos malformativos o entidades sindrómicas. El estudio embriológico de esta región aporta información de un hecho biológico, al tiempo que clínicamente permite conocer de forma precisa cómo es la «ambiente anatomía» craneofacial en cada período del desarrollo, facilitando a obstetras, radiólogos, dismorfólogos, neonatólogos y pediatras la identificación de la edad gestacional así como el diagnóstico de las variaciones respecto al desarrollo normal (Vermeij-Keers et al., 1983; Radlanski, 2003; Stanier y Moore, 2004). Durante los últimos años la resolución de las ecografías prenatales ha mejorado mucho facilitando la mejor definición de los defectos congénitos y con unas semanas de gestación cada vez más precoces (Gillham et al., 2009).

El hecho que estas anomalías sean tan prevalentes en la edad pediátrica provoca que en la práctica clínica habitual encontremos con frecuencia recién nacidos o niños mayores con afectación en este territorio (Bermejo y Martínez-Frías, 2012). Y además que sean muchos los especialistas implicados en su seguimiento clínico y/o tratamiento: cirugía plástica, pediatría, cirugía maxilofacial, otorrinolaringología, foniatría, logopedia, psicología, genética, odontología y enfermería (Mossey et al., 2009).

### 1.1. Embriología

#### 1.1.1. Embriología descriptiva

La región facial deriva de la prominencia frontonasal y de los primeros arcos faríngeos (Cordero et al., 2011; Helms et al., 2005). Éstos se subdividen a ambos lados en los procesos maxilares y mandibulares (Fig. 2). El desarrollo de estos primordios faciales depende de la proliferación de su mesénquima, que proviene esencialmente de células de la cresta neural. Su superficie está formada por un epitelio de origen ectodérmico (Lane y Kaartinen, 2014; Bush y Jiang, 2012; Creuzet et al., 2005; Sadler, 2012; Moore et al., 2015).

Los dos procesos mandibulares se fusionan directamente en la cuarta semana de gestación (Standring, 2005; Moore et al., 2015). La formación del paladar (palatogénesis) sucede entre la quinta y la doceava semana de gestación y determina la división de la cavidad buconasal en la cavidad bucal y las fosas nasales, consiguiendo separar también la boca de la nasofaringe (Moore et al., 2015; Bush y Jiang, 2012; Moxham, 2003; Meng et al., 2009). En la formación del paladar interviene el paladar primario (el cual procede del proceso palatino medio) y el paladar secundario (el cual procede de los procesos palatinos laterales o crestas palatinas) (Sadler, 2012).

Durante la quinta semana de gestación, en el ectodermo de la prominencia frontonasal se forman las placodas nasales (derecha e izquierda). Éstas se invaginan para formar las fositas nasales, en los rebordes de las cuales se forman los procesos nasales, en el lado interno los mediales y en el lado externo los laterales, por proliferación del mesénquima local (Sadler, 2012). Los procesos nasales laterales participan sobre todo en las alas nasales (Sadler, 2012).

Durante la sexta y séptima semana los procesos maxilares continúan creciendo en sentido medial. De éstos se forman los párpados inferiores, los pómulos y parte de las mejillas, encía superior y labio superior (partes laterales), así como el paladar secundario (Cordero et al., 2011; Helms et al., 2005). Los procesos nasales mediales también se desplazan hacia el centro y tras contactar entre sí se fusionan en la línea media. De su zona superior se forma parte de la pirámide nasal mientras que de su extremo inferior crece hacia abajo, interponiéndose entre los procesos maxilares de ambos lados (segmento intermaxilar) (Sadler, 2012; O'Rahilly y Müller, 1992). De éste se forma superficialmente la parte central del labio superior (surco subnasal o *filtrum* y tubérculo del labio superior) y más profundamente la porción gingival que contienen los 4 incisivos superiores y el paladar primario (Fig. 1) (Sadler, 2012; O'Rahilly y Müller, 1992; Cordero et al., 2011; Helms et al., 2005). Durante la séptima semana de gestación el labio superior habrá finalizado su formación con la participación del segmento intermaxilar y de los procesos maxilares (Meng et al., 2009).

En concreto, los procesos nasales mediales entre sí presentan un proceso de *merging*, es decir, un crecimiento subepitelial del mesénquima, sin presentarse fusión ni apoptosis epitelial, en el que no se observan agregados epiteliales

separados por mesénquima en su rafe (Burdi y Faist, 1967; Danescu et al., 2015). Este crecimiento y migración del mesénquima hace que se rellenen los surcos y facilita el cierre (Cox, 2004). A diferencia de lo que sucede entre el proceso nasal medial y el proceso maxilar en el que se produce un proceso de fusión, es decir, se produce la unión de las dos estructuras revestidas por epitelio, degradándose este epitelio y permitiendo que el mesénquima de un lado se desplace al otro lado, formando puentes mesenquimales y dejando en la línea media agregados epiteliales (Burdi y Faist, 1967; Danescu et al., 2015).

Entre finales de la quinta y el inicio de la sexta semana de gestación aparecen unas proyecciones de la región medial de los procesos maxilares: primordios palatinos laterales o crestas palatinas (Fig. 1) (O'Rahilly y Müller, 1992; Standring, 2005; Sadler, 2012; Moore et al., 2015). Inicialmente crecen de forma inferomedial (verticalizada) a ambos lados de la lengua (Sadler, 2012; Carlson, 2014; Moore et al., 2015). Entre la séptima y la octava semana se alargan y en la octava semana ascienden de forma brusca y alcanzan una posición horizontal supralingual (Moore et al., 2015; Standring, 2005). En la octava semana de gestación se inicia la fusión de las crestas palatinas izquierda y derecha (O'Rahilly y Müller, 1992) y en la doceava semana se completa la fusión y formación del paladar (Moore et al., 2015; Bush y Jiang, 2012). En la zona que dará lugar al paladar duro, las crestas palatinas inician su fusión entre sí, presentando también fusión en su porción anterior con el paladar primario (proceso palatino medio) y en su superficie superior con el tabique nasal (que proviene de la proliferación en la línea media y hacia abajo del mesénquima de la prominencia frontonasal) (O'Rahilly y Müller, 1992; Moore et al., 2015; Fergusson, 1978). En la zona que dará lugar al paladar blando (región no osificada, localizada por detrás del tabique nasal), que incluye la úvula (parte posterior del paladar), presenta un proceso de *merging* (O'Rahilly y Müller, 1992; Burdi y Faist, 1967; Gorlin et al., 2001). El inicio de la fusión de las crestas palatinas para formar el paladar secundario se ha descrito que comienza en la zona palatina media y posteriormente continúa simultáneamente hacia delante y hacia atrás, quedando durante este proceso zonas de no contacto inicial (Bush y Jiang, 2012; Smith et al., 2013; Ferguson, 1988; Okano, Suzuki, Shiota, 2006; Jin y Ding, 2006). El rafe palatino medial que se observa postnatalmente indica la línea de fusión de las crestas palatinas.

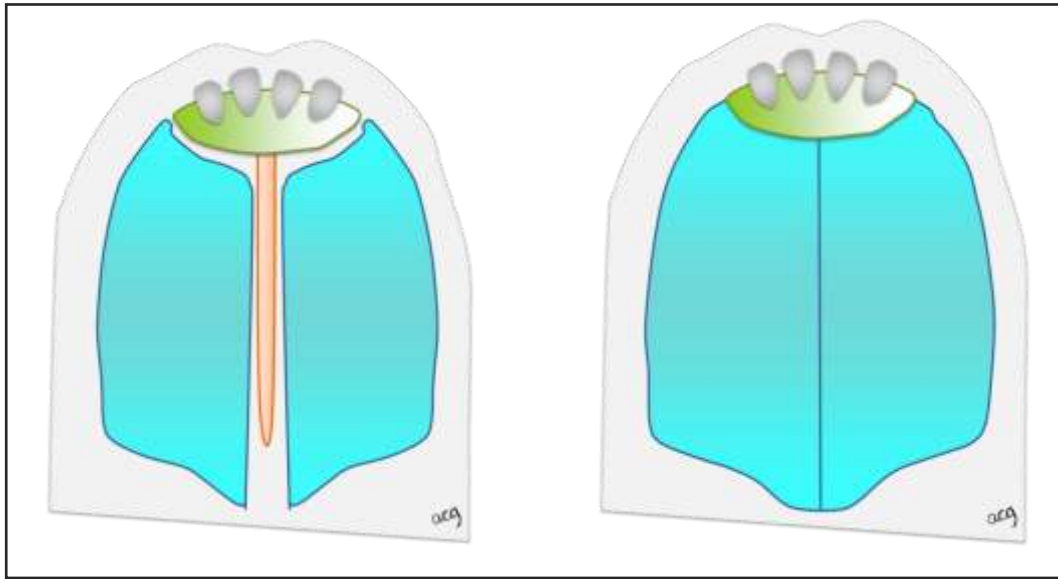


Fig. 1 Es quema de la visión oral del paladar durante la palatogénesis. A la izquierda un estadio embrionario en el que no se han fusionado todavía las crestas palatinas (color azul) entre sí, ni éstas con el paladar primario (color verde) ni con el tabique nasal (color naranja). El paladar primario forma parte del segmento intermaxilar que comprende los cuatro incisivos superiores en su porción gingival. A la derecha vemos un estadio embrionario más avanzado en el que se observa el paladar formado.

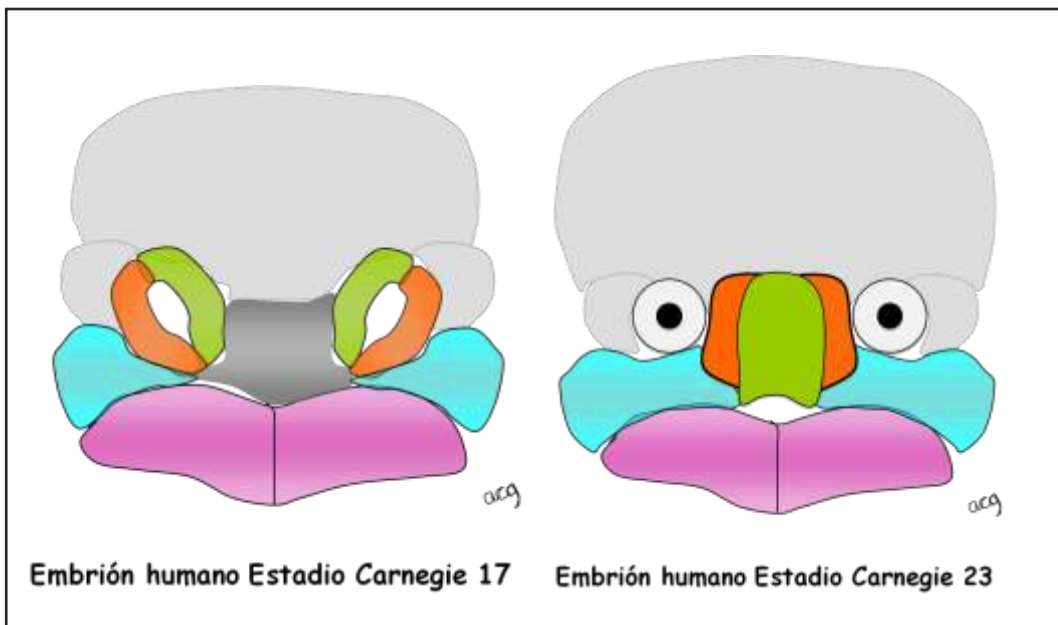


Fig. 2 Esquema de la región facial de los embriones humanos de los estadios Carnegie 17 y 23 en el que se puede observar el desarrollo de los procesos faciales. Comparando ambas imágenes se puede observar el proceso de acercamiento a la línea media de los procesos nasales (medial color verde y lateral color naranja) y maxilares (color azul), así como de las órbitas. Los procesos mandibulares se dibujan en color rosa.

Superficialmente los límites de las prominencias faciales quedan bien delimitados a partir de la sexta semana de gestación, pero por debajo de la capa ectodérmica el mesénquima todavía está indiferenciado sin límites precisos (Corliss, 1979). Cuando las crestas palatiras se han fusionado completamente, se inicia la osificación del mesénquima del paladar en los dos tercios anteriores de éste para formar el paladar duro (Meng et al., 2009). De esta osificación derivan los procesos palatinos de los maxilar y las láminas horizontales de los huesos palatinos (O'Rahilly y Müller, 1992; Carlson, 2014). El tercio posterior no se osifica y dará lugar al paladar blando (Meng et al., 2009). El proceso de la miogénesis del paladar se caracteriza por la aparición de centros de formación a cada lado repartidos en toda la extensión del futuro velo del paladar, desde donde al desarrollarse y expandirse van a ocupar la parte posterior del paladar (Cohen et al., 1993). Los primeros centros premusculares del paladar blando se originan entre la semana 6 y 9, correspondientes los primeros a los músculos tensores del velo del paladar y el segundo a los músculos ázigos de la úvula, pero no se observan fibras musculares hasta la semana 13 de gestación (Cohen et al., 1993).

#### 1.12. Embriología comparada en la palatogénesis

La mayoría de trabajos publicados han estado realizados en modelos animales, principalmente embriones de ratas y ratones, algunos de los cuales hemos comentado anteriormente. Ya habían sugerido que el estudio en otras especies había podido inducir errores a la hora de extrapolar estos datos a humanos (Chou et al., 2004; Yu y Ornitz, 2011). Por ejemplo, Yu y Ornitz (2011) ya comentaron que a pesar del consenso general que la elevación de las crestas palatiras se inicia en la zona anterior o a nivel de la segunda *ruga palatina* en roedores, no se debería generalizar como un proceso común en mamíferos, pues estos resultados se obtuvieron de estudios realizados en ratas y ratones principalmente y según ellos no se corresponden con los observados en humanos.

Y además, también una gran mayoría de estos trabajos han realizado sólo un análisis parcial del paladar, sobre todo en el tercio medio, extrapolarlo posteriormente los resultados obtenidos a todo el paladar secundario, pudiendo llevar a errores (Chou et al., 2004). Este hecho ya había sido apuntado anteriormente por Ferguson (1978) el cual había realizado su estudio en el paladar entero de ratas para evitar errores de extrapolación, pues había

observado muchas conclusiones contradictorias. Recientemente Yu y Ornitz (2011) también destacan que probablemente una de las causas por las que se observan conclusiones contradictorias en la bibliografía relacionada con la palatogénesis sea por la extrapolación de datos, tanto de una región parcial al total, como de una especie animal diferente a la humana extrapolándolo a la humana.

Diversos trabajos morfométricos del grupo de Virginia Diewert han sido publicados, pero o bien los datos volumétricos habían sido parciales (Diewert y Lozanoff, 1993b) o bien aportaban solamente distancias y/o áreas (Diewert, 1983; Diewert y Shiota, 1990; Wang y Diewert, 1992; Diewert y Lozanoff, 1993a,b; Diewert et al., 1993; Diewert, Wang y Tait, 1993; Young et al. 2007). Burdiy Faist (1967) delimitaron en embriones y fetos humanos la región anterior y posterior del paladar mediante el órgano vomeronasal de Jacobson, por lo que diferenciaban el paladar primario del secundario sin realizar una división de regiones dentro de cada una. Ellos observaron como en los embriones de la séptima semana de gestación (18-24 mm longitud coronilla-rabadilla (LCR)) las crestas palatiras de la región anterior eran gruesas y con forma triangular y en la región posterior eran alargadas y con posición vertical. En la octava semana (26-29 mm LCR) las crestas palatiras en la región anterior estaban orientadas horizontalmente creciendo por encima de la lengua hacia la línea media y en la región posterior permanecían delgadas y orientadas verticalmente a la lengua. Comentan que a partir de la octava semana (mayor de 34 mm) se inicia la fusión en la zona anterior, no detallando la zona posterior en que orden se elevan. Observaron que en el paladar duro se producía un proceso de "fusión" (observando remanentes epiteliales) y en el paladar blando y úvula se producía un proceso de "merging" (no observando en esta región remanentes epiteliales) (véase apartado 1.1.). Más tarde, Vermeij-Keers et al. (1983) realizaron un estudio en embriones de ratón y embriones y fetos humanos, tanto normales como con anomalías del desarrollo de cerebro, ojos y cráneo, mediante cortes histológicos y observación directa macroscópica y compararon también varios valores en cráneos humanos, pero no delimitaron diferentes regiones ni puntos de referencia a analizar. Estos autores realizaron una descripción del desarrollo de los diferentes primordios faciales, las placodas, los ojos, el mesodermo, ectodermo y neuroectodermo y analizaron la continuidad epitelial, sin metodología reproducible ni una clara delimitación de las zonas analizadas. Burdick et al. (1988) estudiaron el desarrollo facial precoz en cortes histológicos de

embriones y fetos humanos, entre las 7 y las 26 semanas de gestación, en ellas analizaron la región mediofacial dividiendo los cortes coronales en tres zonas a cada lado de la línea media. Las zonas se dividían por tres puntos de referencia: el punto más interno de la órbita, el punto más lateral del hueso frontal y el punto superior de la sutura zigomático-maxilar. Estos puntos de referencia no son reproducibles en embriones más jóvenes y además no delimita específicamente el paladar a lo largo del eje anteroposterior de las crestas palatinas en desarrollo. Radlanski (2003) realizó reconstrucciones 3D de imágenes histológicas de embriones y fetos humanos de las diferentes estructuras de la región orofacial. Este trabajo pretendía valorar las interacciones de las diferentes estructuras y tejidos durante el desarrollo, pues éstas muchas veces no son valorables en 2D. Más tarde Radlanski et al. (2004) realizaron un estudio de reconstrucción 3D de imágenes histológicas de embriones y fetos humanos para estudiar la localización del canal incisivo y de los nervios y vasos nasopalatinos en humanos. En este trabajo determinaron que los datos anteriormente publicados respecto a la localización del canal incisivo y del nervio y arteria nasopalatina no se correspondían con los detallados anteriormente. Yoon et al. (2000) analizaron el desarrollo de los labios y del paladar en embriones y fetos humanos (de la 4 a la 12 semana de gestación), analizando el desarrollo a nivel superficial en la mayoría de ellos y en algunos de los embriones y fetos analizando sus cortes histológicos. En este estudio no se describen límites específicos dentro del paladar, sino que lo describen globalmente los cambios en él. Observan como las crestas palatinas aparecen en el estadio Carnegie (EC) 17, crecen en dirección vertical y se elevan quedando en posición horizontal durante el EC 23, iniciando la fusión a partir de la octava semana de gestación; pero sin diferenciar estos sucesos según las diferentes regiones del paladar a lo largo de su eje anteroposterior de las crestas palatinas en desarrollo, si no como un ente único.

### 1.13. El proceso de elevación de las crestas palatinas

Los tratados de embriología y varios estudios destacan una elevación brusca de las crestas palatinas durante el último estadio embrionario en humanos (EC 23) (Sadler, 2012; Carlson, 2014; O'Rahilly y Müller, 1992; Moore et al., 2015; Standring, 2005).

---

*Lista de abreviaturas:* EC, estadio Carnegie; LCR, longitud coronilla-rabadilla.



### 1.13.1. HIPÓTESIS DE MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ELEVACIÓN DE LAS CRESTAS PALATINAS

Existen varias hipótesis sobre el proceso de elevación de las crestas palatinas entre las que destacan dos (remodelación y rotación) (Fig. 3):

- 1) La rotación de las crestas palatinas . Un ascenso de éstas respecto a un eje imaginario que estaría localizado en la zona lateral. Dentro de esta hipótesis están implicados factores intrínsecos a las crestas palatinas en desarrollo y extrínsecos a éstas (Yu y Ornitz, 2011; Ferguson, 1978; Wragg et al., 1972; Diewert, 1985; Greene y Pratt, 1976; Walker y Fraser, 1956; Brinkley et al., 1978; Chou et al., 2004; Coleman, 1965).
- 2) La remodelación de las crestas palatinas. Un proceso que consiste en la regresión de la porción distal de éstas, acompañándose a la vez de un crecimiento de la región medial de éstas (Walker y Fraser, 1956; Coleman, 1965; Ferguson, 1978; Yu y Ornitz, 2011; Yasuda y Fujimoto, 1986; Chou et al., 2004).
- 3) La proliferación tisular en la zona medial de las crestas palatinas (Walker y Fraser, 1956; Coleman, 1965; Schüpbach et al., (1983); Ferguson, 1978).

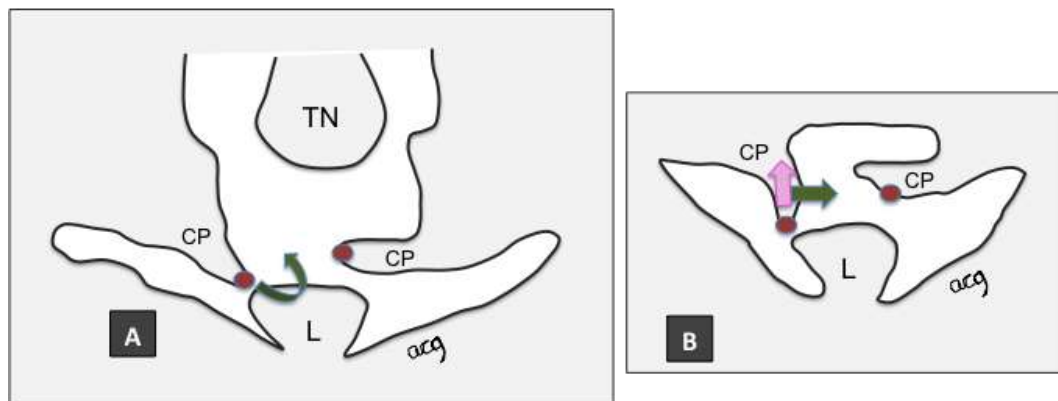


Fig. 3 Esquemas de cortes frontales representativos de las hipótesis de elevación de las crestas palatinas durante el periodo embrionario. A) Rotación de las crestas palatinas respecto a un eje en la zona lateral a éstas, quedando el vértice de la cresta (punto rojo) en el extremo medial; B) Remodelación de las crestas palatinas, la zona medial crece (flecha verde) y la zona distal retrocede (flecha rosa), quedando el vértice de la cresta inicial (punto rojo) en una zona lateralizada (Figura basada en la publicación de Walker y Fraser (1956) y Bush y Jiang (2012)). Abreviaturas: L: lengua, TN: tabique nasal; CP: cresta palatina.

### 1.1.3.2. LA CONTRADICCIÓN DE LOS DATOS EN LA BIBLIOGRAFÍA

En la literatura existen muchos estudios histomorfológicos en diferentes especies animales sobre dónde y cuándo se inicia la elevación de las crestas palatinas a lo largo del eje anteroposterior, presentando varias conclusiones contradictorias. Entre ellas destacamos:

#### Zona dónde se produce el inicio de la elevación de las crestas palatinas

Walker y Fraser (1956) observaron en embriones de ratones que la elevación de las crestas palatinas se producía por un proceso de remodelación –protrusión medial de las crestas palatinas a nivel del dorso de la lengua acompañado por la regresión de la superficie distal de éstas–, excepto en su región posterior que desde un inicio presentaba un crecimiento horizontal, y especificando esta elevación de la zona posterior después avanzada hacia la zona anterior con un movimiento ondulante (como una ola). Coleman (1965) observó en embriones de ratas que la elevación de las crestas palatinas ocurre en la zona anterior por rotación mientras que la zona media y posterior por remodelación, similar a lo observado por Walker y Fraser (1956); pero, a diferencia de ellos, comentaba que se iniciaba en la zona anterior y proseguía en dirección posterior. Wragg et al. (1972) observaron en ratas como desde un inicio la zona anterior presentaba un crecimiento horizontal. Más tarde, Ferguson (1978) describió en embriones de ratas un crecimiento en dirección horizontal desde un inicio en el 1/5 posterior de las crestas palatinas (situado a nivel del futuro paladar blando), similar a lo observado por Walker y Fraser (1956); presentando en el resto de crestas palatinas un inicio de esta elevación en la región anterior con progresión posterior, similar al descrito anteriormente por Coleman (1965). Schüpbach et al. (1983) realizaron un estudio en embriones de ratas de los días (E) 15.3 (equivalente en humanos al EC18-19 (Hill, 2016)) a E21.3 (equivalente en humanos periodo fetal (Hill, 2016)), analizando cortes de microscopía electrónica de todo el paladar secundario y dividió los cortes histológicos en tres regiones: anterior, media y posterior (la posterior acogería al futuro paladar blando). Observaron que en E15.3 (aproximadamente en humanos a EC18-19 (Hill, 2016)) las porciones anterior y media presentaba una posición vertical y la zona posterior horizontal desde un inicio. Entre E16.2-16.5 (aproximadamente en

---

*Abreviaturas del texto:* E, edad en días; EC, estadio Carnegie.

humanos a EC20-21 (Hill, 2016) en la zona media interpretaron que había un proceso de remodelación cambiando su posición a horizontal. Posteriormente comentan que la zona anterior presenta un proceso de elevación. Yasuda y Fujimoto (1986) realizan su estudio en embriones de ratones mediante la incisión en el cuarto anterior de la zona distal de las crestas palatinas, analizando su posición una vez completada la elevación de estas, y observan como la zona anterior presentaba un proceso de remodelación, discrepando con los estudios anteriores. Chou y colaboradores (2004) implantaron moléculas de carbono en la zona distal de las crestas palatinas de embriones de ratones y observaron como la zona anterior, al igual que Yasuda y Fujimoto (1986), y posterior, al igual que Walker y Fraser (1956), presentaba un proceso de remodelación, mientras que en la zona media había rotación. No fue hasta el año 2011 que Yu y Ornitz (2011) publicaron un estudio en embriones de ratones en el que analizaban cinco cortes histológicos coronales (nombrando I el más posterior y V el más anterior); dos de ellos se corresponden aproximadamente por localización con los descritos anteriormente por Walker y Fraser (1956) (concretamente el II y el V). Analizando dichos cortes se observaron que la elevación de las crestas palatinas sucedía antes detrás (zona II) que delante (zona V), excepto en la región más posterior (I) la cual retrasaba su elevación hasta que no se había completado la elevación de la zona más anterior (V). Con estos datos histomorfológicos sugirieron que la elevación de las crestas palatinas mediante el mecanismo de remodelación, que se había sido descrito con anterioridad en los estudios previos de Walker y Fraser (1956), sucedía en los planos intermedios (II, III y IV) pero no en los extremos (I y V); siendo los mecanismos de elevación de las crestas palatinas dinámicos y diferentes según las regiones de las crestas a lo largo del eje anteroposterior. Aunque estos autores comentan que las regiones posteriores (II y III y en alguna ocasión el plano IV, que se correspondería a uno medio) presentaban remodelación, pero no los planos más extremos I y V.

### Factores intrínsecos

En cuanto a los factores intrínsecos, Walker y Fraser (1956) comentaron que las crestas palatinas se movían mediante una "fuerza interna" la cual es lo suficientemente fuerte como para ayudar a elevar las crestas por encima de la lengua y sugirieron que ésta podría corresponderse con una "red de fibras

elásticas del tejido conectivo“ de las crestas palatinas. Más tarde, Ferguson (1978) comentó como el gradual aumento de mucopolisacáridos, principalmente ácido hialurónico, sobre todo en la zona anterior de las crestas palatinas de los embriones de rata entre E 14-16.3 (equivalentes a EC16-21 aproximadamente en humanos (Hill, 2016)), se cree que aumentan la fuerza intrínseca para que se eleven las crestas palatinas, por la turgencia asociada a las características hidrofílicas que presenta. Presentando después una elevación de forma muy rápida en un preciso estadio del desarrollo, E16.52-16.79 (correspondencia con humanos a EC21-22 (Hill, 2016)), a pesar de la resistencia que ofrece la lengua. En relación con las implicaciones que tendría la red de fibras elásticas del tejido conectivo“ (descrito por Walker y Fraser (1956)) en el ascenso de las crestas palatinas, Brinkley y Vickerman (1979) realizaron un estudio en embriones de ratones entre E13 (equivalente en humanos a EC17 (Hill, 2016)) y E14 (equivalente en humanos a EC19 (Hill, 2016)) en el que a una cresta le realizaban cortes a diferentes alturas de la zona distal de la cresta palatina y la cresta contralateral la dejaban intacta, como control (sin tener en cuenta la asimetría como un proceso fisiológico). Comprobaron que la elevación de los dos tercios anteriores (el futuro paladar duro) no dependía de la elevación del tercio distal (futuro paladar blando), observación que iría en contra de la elevación por una fuerza intrínseca como una ola“ que había definido anteriormente Walker y Fraser (1956); pero sin embargo el tercio posterior dependía su elevación de la estabilidad morfológica de los dos tercios anteriores. También se describe un aumento de la sustancia intercelular, inmediatamente antes y durante el cierre del paladar, con incremento de sulfomucopolisacáridos y proteoglicanos, como el ácido hialurónico, los cuales al hidratarse aumentan el volumen de las crestas palatinas (Brinkley et al., 1978; Chou et al., 2004). En concreto Brinkley y Morris-Wiman (1987) describen acumulación de glucosaminoglicanos, sobre todo ácido hialurónico, más en la región anterior del paladar que en la posterior.

### Factores extrínsecos

En cuanto a los factores extrínsecos también existen discrepancias. Unos estudios otorgaban un papel importante para el ascenso de las crestas palatinas al crecimiento y descenso de la mandíbula y de la lengua, los movimientos musculares de la lengua y los cambios en la morfología de la lengua (Yu y

---

*Abreviaturas del texto:* E, edad en días; EC, estadio Carnegie.

Ornitz, 2011; Ferguson, 1978; Wragg et al., 1972; Diewert, 1985; Greene y Pratt, 1976 y otros, en cambio, decían haber demostrado que no existía relación espacio-temporal entre el desarrollo de la lengua y las crestas palatinas (Young et al., 1991). Al estar realizados la mayoría de los estudios en embriones de ratones y ratas, Wragg et al. (1970) realizaron un estudio mediante técnicas cefalométricas en embriones humanos y de ratas para intentar explicar si varios de los factores extrínsecos descritos anteriormente podían extrapolarse del embrión de ratón al humano. Destacaron que varias de las conclusiones extraídas en roedores no podrían atribuirse al desarrollo en humanos. Así en embriones humanos no existía extensión de la cabeza sobre el cuello, no existía protrusión de la lengua fuera de la cavidad oral pues presentaba un prognatismo antes de cierre del paladar y la boca alojaba a la lengua. Más tarde Ferguson (1978) comparaba algunos hallazgos previamente descritos en la bibliografía *versus* los datos objetivados tras su trabajo en embriones de rata: comentaba que Wragg et al. (1970) observaron la protrusión de la lengua tras la elevación de las crestas palatinas al igual que él; Diewert (1974) en embriones de rata observó que la protrusión lingual sucedía un día antes de la elevación de las crestas palatinas, pero Ferguson (1978) no lo observó en su serie de 217 embriones-fetos de ratas analizados. Aunque posteriormente estudios morfométricos en embriones humanos de Diewert (1983; 1985) describió un rápido crecimiento de la región facial inferior, acompañado por cambios en la posición de la lengua y una extensión de la cabeza respecto al cuerpo, por este mayor crecimiento de la porción inferior facial.

En esta línea, varios estudios en ratones, basados en la manipulación de las crestas palatinas y/o en ausencia de la lengua y/o de otras regiones craneofaciales, han demostrado que la elevación de las crestas palatinas es un movimiento activo y que incluso se puede alcanzar en ausencia de la lengua (Brinkley et al., 1978; Zimmerman et al., 1983; Shiota et al., 1990). Ferguson (1978) comentó en su estudio en embriones de ratas que los movimientos de la lengua son pasivos, a pesar de que en los tratados embrionarios y algunos estudios como el de Green y Pratt (1976) se había propuesto que el movimiento de la lengua era un factor muy importante. Y también hizo referencia a varios estudios anteriores de Jacobs et al. (1970; 1971) en los que se intentó inducir fisuras de paladar mediante dosis elevadas de inhibidores neuromusculares y no consiguió objetivar fisuras de paladar en ellos, por lo que el autor comentó que parecía bastante claro que la actividad neuromuscular no era un factor principal

en el desarrollo del paladar (Ferguson, 1978).

Las causas que producen estos cambios tan rápidos en las crestas palatinas en cuanto a posición y forma no quedan claros del todo y aunque existen varias hipótesis, ninguna de ellas ofrece una explicación completa (Bush y Jiang, 2012).

#### División de las diferentes regiones del paladar

También han habido diferentes metodologías a la hora de dividir en zonas el paladar a lo largo del eje anteroposterior, además de haber sido en diferentes especies. Por este motivo, la comparación entre estudios por estos aspectos también se ha visto dificultada.

Algunos autores no especificaban dónde ponían la línea divisoria entre la región anterior y posterior, por ejemplo Yasuda y Fujimoto (1986) en embriones de ratón realizaron una incisión entre el primer y segundo cuarto del paladar, pero al hablar de la elevación lo referían a la zona anterior en la que se encuentra la incisión sin un límite preciso. Otros describían los resultados en la zona anterior y posterior sin límites exactos entre ellas como el estudio en embriones de ratón de Walker y Fraser (1956) y también el estudio de Coleman (1965) en embriones de rata. Otros realizaron la división respecto todo el paladar: los dos tercios anteriores (que posteriormente darán lugar al paladar duro) los dividían a su vez en las regiones anterior, media y posterior; y el tercio posterior (que posteriormente dará lugar al paladar blando). Esta última metodología de división había sido empleada por Diewert (1978) en embriones de rata, por Brinkley y Vickerman (1979) en embriones de ratón y por Okano et al. (2006) en la revisión de los estudios en embriones de ratón que habían publicados hasta el momento. Schüpbach et al. (1983) realizaron un estudio en embriones de rata en cortes de microscopía electrónica y dividieron las secciones histológicas en tres regiones: anterior, media y posterior (la posterior acogía al futuro paladar blando). Más recientemente Yu y Ornitz (2011) intentaron realizar una nueva metodología dividiendo seis planos coronales a lo largo del eje anteroposterior (nombrando los planos de I a V de más posterior al más anterior y un corte adicional en el extremo posterior final del paladar). Estos planos I-V respecto el eje anteroposterior se correlacionaban con la morfología de la lengua a lo largo de este eje. El límite anterior estaba delimitado por el órgano vomeronasal.

## 1.2. Biología celular y molecular en la palatogénesis

Durante los últimos años ha habido muchos avances relacionados con los diferentes mecanismos morfogénicos y moleculares (factores de transcripción, factores de crecimiento, señales moleculares, manipulación de diferentes genes en ratones y ratas (*knock out*), genes implicados en ratones y en humanos, interacciones recíprocas mesénquima versus epitelio, epigenética, transcriptomas, proteomas, neurotransmisores...) implicados en la palatogénesis, el conocimiento de los cuales permiten entender y relacionar en la palatogénesis diversos aspectos genéticos con la clínica (fisuras de labio con o sin fisura de paladar, así como en las fisuras de paladar aisladas) (Dixon et al., 2011; Gritli-Linde et al., 2007; Meng et al., 2009; Thyagarajan et al., 2003; Okano et al., 2006; Cox, 2004; Bush y Jiang, 2012; Lan et al., 2015; Kohli y Kohli, 2012; Lane y Kaartinen, 2014; Seelan et al., 2012; Twigg y Wilkie, 2015).

Estos factores moleculares presentan una heterogeneidad genética a lo largo de su eje anteroposterior (Bush y Jiang, 2012; Hilliard et al., 2005; Li y Ding, 2007; Smith et al., 2013), así como respecto al eje mediolateral (Bush y Jiang 2012; Gao et al., 2009; Lan et al., 2004; Lan et al., 2015; Smith et al., 2013). Aunque todavía son muchas las incógnitas que quedan sobre la función que cada uno de ellos tiene durante la palatogénesis. Pero además de ser poco conocidos los genes y factores moleculares implicados en la palatogénesis Lane y Kaartinen (2014) apuntaron una observación ampliamente extendida ya en los estudios genéticos (revisión extensa realizada por Emmert-Streib y Glazko (2011)), se trata de la creencia que no existe una vía de interacción lineal entre los diferentes genes y factores moleculares, si no una red (*network*) de interacciones no lineales, hecho que dificulta aún más el conocimiento de todas estas vías.

Varios autores han realizado una extensa revisión de las novedades que en la palatogénesis se había producido a nivel molecular y morfogénico en ratones durante los últimos años (Bush y Jiang, 2012; Lan et al., 2015; Lane y Kaartinen, 2014; Funato et al., 2015; Levi et al., 2011; Potter y Potter, 2015; Okano et al., 2006). A lo largo del eje anteroposterior de las crestas palatinas existe una heterogeneidad muy marcada a nivel molecular desde estadios muy precoces del desarrollo (Gritli-Linde, 2007). Se han descrito múltiples factores de transcripción y éstos se expresan de una forma diferenciada a lo largo del eje

anteroposterior de las crestas palatinas, demostrándose su implicación en ratones *knock out*. Por ejemplo: los genes *Msx1* y *Shox2* se expresan en la región anterior de las crestas palatinas, mientras que *Meox2* y *Tbx22* se expresan en la región posterior de éstas. Además de presentar estas diferencias a lo largo del eje anteroposterior, también se han evidenciado que existe una a lo largo del eje vertical de la cresta palatina, es decir, entre la cara medial (que posteriormente se corresponderá con la que esté en contacto con la cavidad nasal) y la lateral (que posteriormente estará en contacto con la cavidad oral) (Bush y Jiang, 2012; Hilliard et al., 2005; Lan et al., 2015).

### 1.2.1. Implicación de las células de la cresta neural en las crestas palatinas en desarrollo

Varios estudios recientes han demostrado las constantes y recíprocas interacciones entre el epitelio del paladar y las células mesenquimales derivadas de las células de la cresta neural entre otras, siendo esta heterogeneidad genética a lo largo del eje anteroposterior y mediolateral crucial para el desarrollo normal del paladar (Murray y Schutte, 2004; Chai y Maxson, 2006).

Las células de la cresta neural son una población celular de precursores pluripotenciales con una elevada capacidad migratoria que se originan de la zona de transición entre el neuroepitelio y el ectodermo somático (Gammill y Bronner-Fraser, 2003; Cordero et al., 2011; Helms et al., 2005; Milet y Monsoro-Burq, 2012), se separan del epitelio, adoptan un carácter mesenquimal y empiezan el proceso de migración (Helms et al., 2005). Para la migración de las células de la cresta neural es necesaria la transición epitelio-mesénquima (Cordero et al., 2011; Noden y Trainor, 2005; Cox, 2004). Las células de la cresta neural cefálica siguen unas vías bien definidas desde su origen adyacente al neuroectodermo hasta su destino en la región craneofacial (Cordero et al., 2011; Noden y Trainor, 2005; Cox, 2004). Todos estos procesos están regulados por una red de genes, de los cuales hasta el momento sólo se conocen algunos y también algunas de sus interacciones (Betancur et al., 2010; Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008).

Una vez las células de la cresta neural llegan a los primordios faciales, éstas proliferan y las estructuras faciales empiezan a adquirir forma (Cordero et al., 2011). Las células de la cresta neural rodean a las células mesodérmicas



(núcleo central) de los primordios faciales y éstos están cubiertos en la cara externa por el ectodermo y por la cara interna por el endodermo (Cordero et al., 2011; Graham, 2003; Cox, 2004). Por lo que células de diferentes orígenes forman una misma estructura y a su vez células que inicialmente provenían de un mismo origen finalmente se localizan en territorios muy distantes entre ellos, como resultado de un proceso de migración celular (campo de desarrollo) (Helms et al., 2005).

Entre los factores que han descrito como inductores de la cresta neural en aves, peces y anfibios están las familias de reguladores como las proteínas de señalización WNT (WNTs), las proteínas morfogénicas óseas (bone morphogenetic protein: BMPs) y el factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factors: FGFs); esta evidencia no queda tan clara en mamíferos, sin saber en éstos quienes son los precursores principales (Bhatt et al., 2013). Los genes que se encuentran expresados en los precursores de la cresta neural son entre otros: *Msx1*, *Msx2*, *Sox10*, *Twist* (Gammill y Bronner-Fraser, 2003). En concreto *Msx1* y *Msx2* están fuertemente expresados en las células de la cresta neural migratorias y su expresión continua durante la colonización de las prominencias faciales y los arcos faríngeos (Doshi y Patil, 2012; Bhatt et al., 2013). También se han descritos genes como *Shh* en el epitelio de los primordios faciales (Doshi y Patil, 2012).

Durante el desarrollo del paladar en mamíferos existen interacciones entre el ectodermo faríngeo (epitelio) y el mesénquima derivado de las células de la cresta neural craneal (Li et al., 2011; Doshi y Patil, 2012; Bush y Jiang, 2012; Chai y Maxson, 2006). Dentro de estas interacciones están incluidas moléculas de señalización y factores de crecimiento como SHH, miembros de la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta (transforming growth factor beta: TGFβ): BMPs, FGFs, sus receptores y efectores (Doshi y Patil, 2012). Por ejemplo, TGFβ2 está implicado en la proliferación de las células mesenquimales de las crestas palatinas derivadas de la cresta neural (Ito et al., 2003) y TGFβ3 está implicado en la fusión de las crestas palatinas (Ito et al., 2003; Martínez-Elvárez et al., 2000; Martínez-Elvárez et al., 2004).

### 1.2.1.1. EJE ANTEROPOSTERIOR

Las crestas palatiras en desarrollo están formadas por mesénquima derivado de la cresta neural (Ito et al., 2003) entre otros orígenes. Durante la palatogénesis muchos genes presentan heterogeneidad a nivel celular y molecular a lo largo del eje antero-posterior de las crestas palatiras en desarrollo (Li et al., 2011; Hilliard et al., 2005; Okano et al., 2006; Gritli-Linde, 2007; Zhang et al., 2002; Murray y Schutte, 2004; Bush y Ji an, 2012; Hilliard et al., 2005; Li y Ding, 2007; Zhou et al., 2013). En la proliferación de las células de la cresta palatira las proteínas Sonic Hedgehog (SHH) y WNTs son uno de los factores importantes implicados en este proceso (Cordero et al., 2011). Muchos de los estudios diferencian la zona anterior de la zona posterior de las crestas palatiras mediante el límite que forma la primera ruga palatina en embriones de roedores (Bush y Ji an, 2012; Hilliard et al., 2005; Yu et al., 2005). En el mesénquima de las crestas palatiras de la zona anterior se expresan preferentemente los genes *Shox2*, *Msx1* y *Fgf10* y en la zona posterior de éste se expresan preferentemente los genes *Barx1*, *Mn1*, *Meox2* y *Tbx22* (Zhou et al., 2013; Hilliard et al., 2005). Por lo que el mesénquima de las crestas palatiras en desarrollo anterior y posterior tendrá una respuesta diferente a las señales que provienen del epitelio (Zhou et al., 2013; Hilliard et al., 2005).

Por ejemplo, en la zona anterior del mesénquima de las crestas palatinas en desarrollo se encuentra el gen *Msx1* el cual estimula y es estimulado por el gen *Bmp4* situado en este mismo mesénquima anterior, no presentándose ni *Msx1* ni *Bmp4* en la región posterior de éstas (Li et al., 2011; Hilliard et al., 2005; Zhou et al., 2013). A su vez *Bmp4* estimula la expresión del gen *Shh*, situado en el epitelio de las crestas palatiras en desarrollo. *Shh* desde el epitelio de éstas estimula la expresión del gen *Bmp2* en el mesénquima produciendo la proliferación del mesénquima de la zona anterior de las crestas palatiras en desarrollo (Zhang et al., 2002; Hilliard et al., 2005) (Fig. 4). Los genes *Shh*, *Msx1*, *Bmp4* y *Bmp2* se encuentran en fases iniciales del desarrollo del paladar anterior, sin diferencias en éstos entre la cara oral y nasal (Smith et al., 2013).

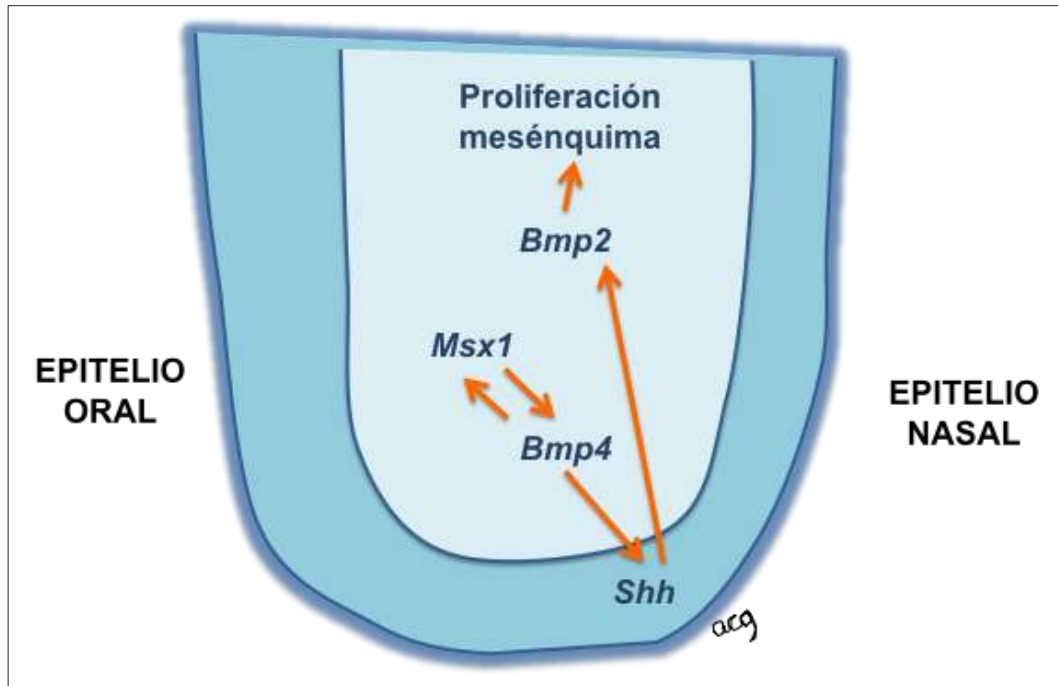


Fig. 4 Esquema de la interacción epitelio-mesénquima en la zona anterior de las crestas palatinas en desarrollo, respecto al eje antero-posterior. Los genes *Shh*, *Msx1*, *Bmp4* y *Bmp2* se encuentran en fases iniciales del desarrollo del paladar anterior, sin diferencias en éstos entre la cara oral y nasal. Basado en los esquemas de Zhang et al. (2012) y Smith et al. (2013).

Se ha investigado sobre la proliferación celular en las crestas palatinas en desarrollo del embrión de ratón, observando que los ratios de proliferación celular son similares en las regiones anterior y posterior de las crestas palatinas en E13.5 (se corresponde en humanos con el EC18) (Hill, 2016). Por ejemplo Li y Ding (2007) realizaron un estudio en embriones de ratón en el que observaron que la expresión de los genes *Shox2* y *Meox2* era dinámica; pero ésta era diferente a lo largo del eje anteroposterior durante el desarrollo de la cresta palatina. En E12.5 (se corresponde en humanos con el EC16 (Hill, 2016)) la expresión del gen *Shox2* estaba localizada en la región anterior de las crestas palatinas, cubriendo menos del 25% de toda la extensión total de las crestas palatinas en desarrollo, expandiéndose progresivamente su expresión en dirección posterior cubriendo más del 60% de la cresta total en E14.5 (se corresponde en humanos con EC20 (Hill, 2016)). Sin embargo, en E12.5 la expresión de *Meox2* tiene una expresión de más del 70% de la cresta palatina total, en región posterior y medial; presentando en E14.5 (se corresponde en humanos con EC20 (Hill, 2016)) una regresión a la región posterior, ocupando solamente un 25% en este estado, coincidiendo con el futuro paladar blando (Fig. 5). Todos estos datos sugieren que el mesénquima de las crestas palatinas presenta un patrón de migración celular a lo largo del eje antero-posterior (Bush

y Jiang 2012; Li y Ding, 2007), aunque comentan que se deben realizar más estudios para profundizar al respecto.

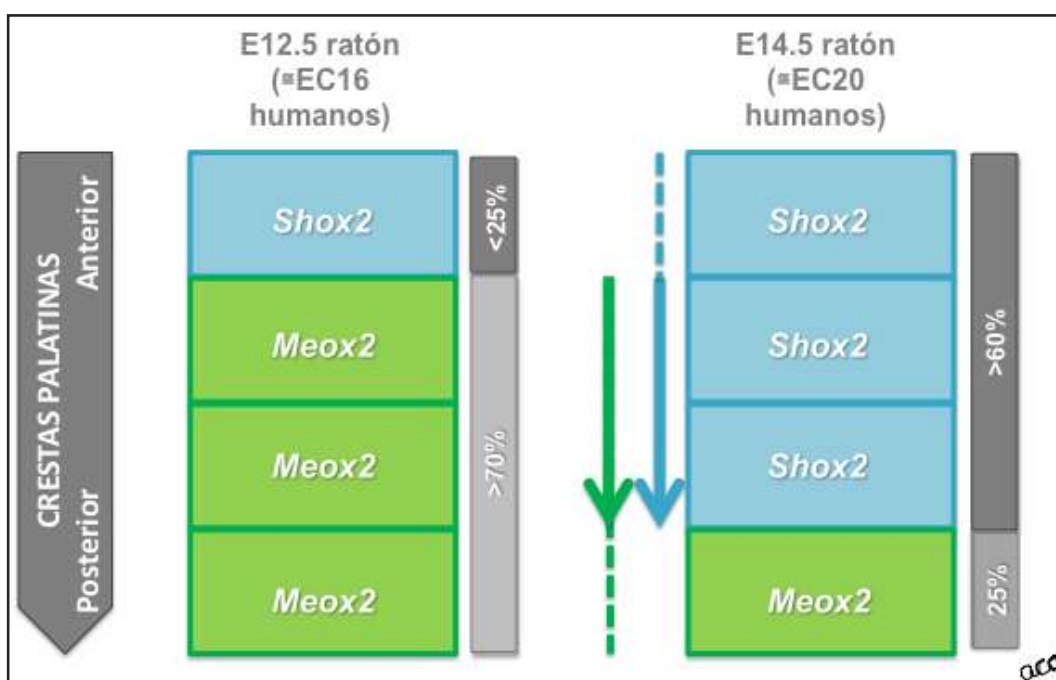


Fig. 5 Esquema del mesénquima de las crestas palatinas en desarrollo de ratón, divididas en cuartos a lo largo del eje anteroposterior. En la columna de la izquierda se observa el correspondiente al día 12.5 en ratón (equivalente en humanos EC16 (Hill, 2016), donde sólo se ve expresado el gen *Shox2* en menos del 25% de la zona más anterior, mientras que el gen *Meox2* ocupa el restante. En la columna de la derecha se observa el correspondiente al día 14.5 en ratón (equivalente en humanos EC 20 (Hill, 2016), en el que se ha incrementado a expresión del gen *Shox2* hacia zonas posteriores, ocupando más del 60% de la región anterior y media de las crestas (línea azul), mientras el gen *Meox2* regresa en este estadio a un 25% localizándose en la zona posterior (línea verde). Sugiriendo estos datos que este mesénquima presenta un patrón de migración celular a lo largo del eje anteroposterior. Basado en los resultados del estudio de Li y Ding (2007).

También en la zona anterior del mesénquima de las crestas palatinas la señalización de BMP, en concreto *Bmpr1a*, es necesaria para la expresión del gen *Shox2*, cuya inactivación causa un tipo raro de fisura anterior del paladar secundario en embriones de ratón, pues el gen *Shox2* sólo se expresa en el mesénquima del paladar anterior en desarrollo, tal y como hemos comentado anteriormente (Li et al., 2011; Yu et al., 2005).

A lo largo del eje anteroposterior también se ha observado que en la zona anterior de las crestas palatinas, en las que Ferguson (1978) había descrito como mecanismo principal la elevación de las crestas palatinas por acúmulo e hidratación de glucosaminoglicanos, principalmente ácido hialurónico, éste no era el mecanismo principal, pues no se reducía la presencia de

Abreviaturas del texto: E, edad en días; EC, estadio Carnegie.

glucosaminoglicanos en embriones de ratón *knock out* para los genes *Fgfr1<sup>cko</sup>* y *Fgfr1/2<sup>dko</sup>*, aunque en estos ratones quedaba abolida la elevación de las crestas palatiras en su zona anterior. Este estudio sugería que otros factores reguladores del mesénquima, principalmente *Fgfr1* tienen un importante papel en la elevación de la zona anterior de las crestas palatiras (Yu et al., 2015).

#### 1.2.1.2. EJE MEDIOLATERAL

También se ha observado heterogeneidad molecular mediolateral, durante el periodo de elevación de las crestas palatiras, siendo la cara lateral la que finalmente estaría en contacto con la región oral y la cara medial con la región nasal (Zhou et al., 2013; Bush y Jiang, 2012). Respecto a este eje la expresión del gen *Shh* quedaría delimitada al epitelio de la región lateral en la zona media y posterior de las crestas palatiras en desarrollo (respecto al eje anteroposterior). Dentro del mesénquima derivado de la cresta neural del tercio medio y posterior de las crestas palatiras en desarrollo, la expresión del gen *Osr1* está localizado en la zona lateral sólo y el gen *Osr2* con un gradiente mayor en la zona lateral que en la zona medial (Bush y Jiang 2012; Gao et al., 2009; Lan, 2004; Gritti-Linde, 2007). Por lo que el gen *Osr2* colabora con el crecimiento y ascenso del tercio medio y posterior de éstas (Zhou et al., 2013). Diversos autores observaron en embriones de ratón *knock out* para el gen *Osr2* una reducción de la proliferación celular en la región medial de las crestas palatiras en desarrollo pero no en su región lateral (con expresión normal de *Osr1*), presentado dichos embriones fisura de paladar. Al reponer la secuencia codificante de *Osr2* en estos ratones se rescataba la fisura de paladar (Bush y Jiang 2012; Gao et al., 2009; Gritti-Linde, 2007; Lan et al., 2004; Chai y Maxson, 2006)(Fig. 6).

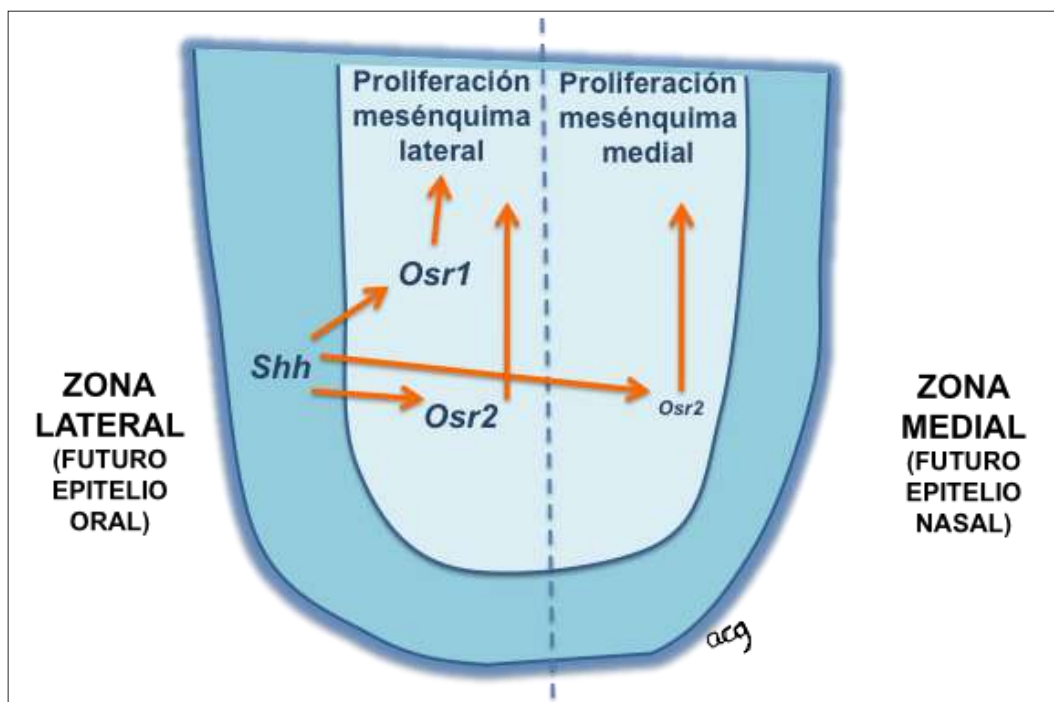


Fig. 6 Esquema de la interacción epitelio-mesénquima durante el periodo de elevación de las crestas palatinas en desarrollo, respecto al eje mediolateral. En el epitelio de la región lateral en la zona media y posterior de las crestas palatinas en desarrollo (respecto al eje anteroposterior) se expresa el gen *Shh*. Dentro del mesénquima derivado de la cresta neural del tercio medio y posterior de las crestas palatinas en desarrollo, la expresión del gen *Osr1* está localizada en la zona lateral sólo y el gen *Osr2* con un gradiente mayor en la zona lateral que en la zona medial. Basado en las gráficas de los estudios de Bush y Jiang (2012) y Lan et al. (2015).

### 1.3. Fisuras palatinas

La palatogénesis es un proceso de múltiples mecanismos entre los cuales se encuentra la proliferación celular, movimiento tisular, adhesión celular, interacción epitelio-mesénquima y muerte celular programada (Ferguson, 1988; Yu y Ornitz, 2011).

Defectos en cualquier estadio de la palatogénesis (crecimiento, elevación y/o fusión de las crestas palatinas) puede producir una fisura palatina y una separación incompleta de la cavidad oral y nasal (Vermeij-Keers et al., 1983; Meng et al., 2009; Yu y Ornitz, 2011). Se ha estimado que el 90% aproximadamente de las fisuras de paladar aisladas son producidas por defectos en la elevación de las crestas palatinas (Yu y Ornitz, 2011).

### 1.3.1. Tipos

Se define como fisura de paladar posterior el defecto congénito que se produce por falta de fusión de las crestas palatiras, por definición es central y única, aunque en la práctica clínica en ocasiones pueda parecer lateralizada si una de las crestas ha entrado en contacto con el tabique nasal y la otra no. De aquí que la mayoría de tratados de embriología presenten la fisura de paladar posterior (paladar secundario) como única y central (Sadler, 2012; Carlson, 2014), pero Moore et al. (2015) describan la posibilidad de la fisura de paladar posterior (paladar secundario) como unilateral o bilateral. Pudiendo ser éstas completas (cuando afectan a todo el paladar secundario) o incompletas (cuando sólo afectan parcialmente).

La fisura lateral de labio superior se produce por el fallo en la fusión de los procesos maxilares y la prominencia nasal medial, tal y como hemos comentado anteriormente, y puede ser unilateral y/o bilateral y, a su vez, completas o incompletas. Las completas afectan al surco nasofaríngeo, labio superior, encía y paladar primario (Sadler, 2012; Gorlin et al., 2001; Moore et al., 2015).

La fisura media de labio superior se produce por un fallo en el *merging* de los procesos nasales mediales (Burdick Faist, 1967; Danescu et al., 2015). Siendo esta completa, afectando también a la porción gingival, o incompleta.

También existen fisuras palatiras submucosas que se caracterizan por defectos en las estructuras internas del paladar cubiertas por la mucosa ya fusionada. Se deben a defectos en la fusión en la línea media sobre todo entre los músculos del paladar blando durante la palatogénesis (Reiter et al., 2011). Entre ellas se diferencian tres tipos: la úvula bífida, la diástasis del músculo elevador del velo del paladar (visualización de una zona translúcida en la zona media del paladar blando) y la ausencia de la espina nasal posterior (dejando una pequeña fisura en la zona posterior y media del paladar duro) (Reiter et al., 2011).

Una vez formado el paladar, los movimientos de la lengua y mandíbula influirán en su morfología. En la práctica clínica es habitual observar como en pacientes que presentan desde período embrionario alteraciones del sistema nervioso central grave, sobre todo con hipotonía y defectos de succión graves, presentan con más frecuencia un paladar ojival con unas crestas palatiras engrosadas y

prominentes, a pesar de haber completado la fusión y la palatogénesis con éxito (Jones et al., 2013; Gorlin et al., 2001).

### 1.3.2. Etiología

Las regiones de paladar primario y secundario se reconocen como entidades embriológicamente diferentes, con distintos factores genéticos implicados en su desarrollo (Fraser, 1970; Diewert y Wang, 1992; Carinci, 2007). Por lo que la fisura lateral de labio superior y fisura palatina anterior tiene una etiología genética y embriológica diferente a la fisura de paladar posterior aislada. Aunque en ocasiones pueden aparecer los dos fenotipos en una misma familia (Fraser, 1970; Gorlin et al., 2001). Dentro de una misma familia pueden haber personas con formas leves o más difíciles de diagnosticar (como la úvula bifida, "forma frustrada" de fisura lateral de labio superior o fisura lateral de labio superior "reparada intraútero" y la fisura de paladar submucosa), que pudieran pasar desapercibidas si no se exploraran con detalle, pudiendo llevar a error, pues personas sintomáticas podrán ser clasificadas erróneamente como asintomáticas. Estas observaciones quedan reforzadas cuando en una misma familia con factores genéticos conocidos, existen personas con fisuras objetivables a simple vista y otras con formas leves que pasan desapercibidas si no se realiza una exploración exhaustiva, por lo que probablemente algunas publicaciones anteriores podrían haber obtenido datos no del todo ajustados (Jugessur et al., 2009).

Respecto a los factores genéticos relacionados, la fisura lateral de labio superior con o sin fisura palatina anterior es una característica clínica descrita en más de 200 síndromes genéticos específicos y la fisura de paladar posterior aislada en más de 400 síndromes genéticos específicos (Wong y Hägg, 2004; OMIM, 2010). La proporción de fisuras orofaciales asociadas a síndromes genéticos específicos se sitúa entre un 5 y un 7%. Se estima que el 70% de las fisuras laterales de labio superior con o sin fisura palatina anterior y el 50% de las fisuras de paladar posterior aisladas son casos aislados y no relacionados con otras anomalías congénitas ni discapacidad intelectual (no sindrómica) (Dixon et al., 2011; Marazita, 2012; Cobourne, 2004; Wong y Hägg, 2004; Tolarova y Cervenka, 1998). Al resto se las considera sindrómicas, al estar asociadas a otras anomalías congénitas y/o discapacidad intelectual.



El elevado porcentaje de fisuras laterales de labio superior con o sin fisura de paladar anterior no sindrónicas refleja que su etiología es compleja y que probablemente existan varios factores ambientales y genéticos que influyen (herencia multifactorial) (Fig. 7) (Fraser, 1980; Fraser, 1970; Gorlin et al., 2001; Murray, 2002). También se cree que estas estructuras son más sensibles a estos factores debido a la rápida proliferación y la numerosa coordinación de diferentes sucesos que ocurren durante la formación de la región mediofacial (Cox, 2004). La evidencia que existen factores genéticos que influyen en ellas se describió hace años al existir una prevalencia 30 veces superior en gemelos respecto al resto de población (a pesar de haber descartado formas sindrónicas); siendo en gemelos monozigotos del 25-60% y en gemelos dizigotos del 3-6%. La alta concordancia en gemelos monozigotos sin llegar a ser completa, demuestra que los factores ambientales tienen importancia en su etiología (Cobourne, 2004; Gorlin et al., 2001; Jegessur et al., 2009; Fraser, 1970; Dixon et al., 2011; Wong y Hägg, 2004). Recientemente también han habido estudios de revisión que han analizado los diferentes factores (genéticos sindrónicos y no sindrónicos, ambientales y *loci* de predisposición) respecto las fisuras laterales de labio superior con o sin fisura de paladar anterior (Kohli y Kohli, 2012; Murray, 2002) y sobre las fisuras de paladar posterior aisladas (Murray y Schutte, 2004).

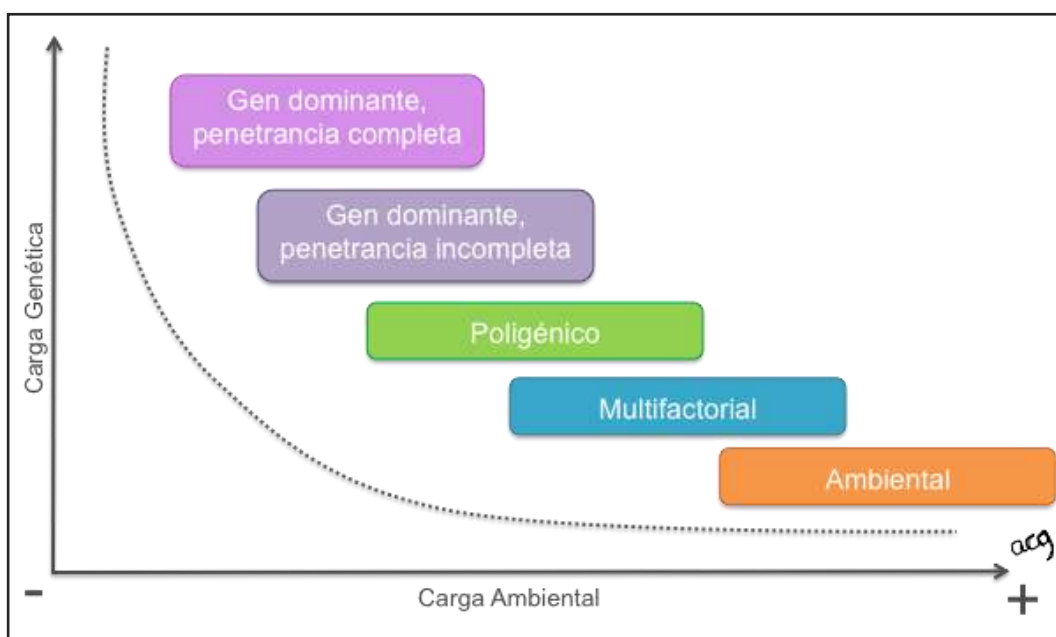


Fig. 7 Espectro de las posibles causas de los defectos congénitos craneofaciales. En un extremo (lila) están los genes con penetrancia completa (donde existe una gran carga genética y mínima ambiental) y en el extremo contrario (naranja) están los teratógenos (donde la carga ambiental es muy importante y la genética es mínima). Pero se debe tener en cuenta que no existen enfermedades completamente libres de la influencia ambiental y genética, lo único que en diferente medida. Figura basada en la publicación de Bomprezzi et al. (2003).

### 1.3.3. Epidemiología

Los defectos congénitos craneofaciales son aquellos que afectan a la cabeza, la cara y/o el cuello (Martínez-Frías, 2010). Dentro de éstos, las fisuras orofaciales son uno de los defectos congénitos más frecuentes en todas las poblaciones del mundo, estimándose entre un caso por cada 500-550 recién nacidos vivos (RNV) (Tolarová y Cervenka, 1998) y 1/700RNV (Mossey et al., 2009). Dentro de este grupo una de las que con más frecuencia observamos en la práctica clínica y que mayores consecuencias tiene, tanto a nivel de alimentación, lenguaje y habla, desarrollo dentario, infecciones óticas y psicológicas (tanto paternas como del propio paciente), son las fisuras laterales de labio superior con o sin fisura de paladar anterior y las fisuras de paladar posterior aisladas (Chai y Maxson, 2006; Dixon et al., 2011; Juggessur et al., 2009). Se caracterizan por una separación incompleta de las cavidades bucal y nasal desde el periodo embrionario (Mossey, 2007; Mossey et al., 2009; Marazita, 2012). De éstas las fisuras laterales de labio superior con o sin fisura de paladar anterior son las más frecuentes en humanos, con una prevalencia de 1 en 700 RNV (Dixon et al.,

Abreviaturas del texto: RNV, recién nacidos vivos.

2011; Danescu et al., 2015; Diewert y Wang, 1992). La prevalencia de la fisura submucosa de paladar se estimó de 1 en 1200 y las fisuras de úvula total (úvula bífida) es mucho más común, de 1 en 100 a 1 en 300, en la mayoría de casos sin defectos funcionales (Danescu et al., 2015; Gorlin et al., 2001). Existe una gran variabilidad según las diferentes regiones geográficas, raciales y étnicas, así como con diferente afectación por factores ambientales y diferente evolución postnatal según el nivel socioeconómico (Dixon et al., 2011; Marazita, 2012).

Si analizamos estas prevalencias a nivel mundial pero diferenciadas por regiones geográficas, las fisuras laterales de labio superior con o sin fisura de paladar anterior tienen la mayor prevalencia en población asiática e indios americanos 1 en 500 RNV, una prevalencia intermedia en población europea a 1-1.7 en 1.000 RNV y la menor prevalencia en población africana 1 en 2500 RNV; sugiriendo que existe diferentes genes de susceptibilidad según el país de origen (Diewert y Wang, 1992; Dixon et al., 2011; Mossey et al., 2009; Mossey y Castila, 2003; Bermejo y Martínez-Frías, 2001; Ricks et al., 2002; Gorlin et al., 2001). Respecto las fisuras de paladar posterior aisladas en población caucásica la prevalencia es de 1 en 1000 (Coburne, 2004). La fisura total de la úvula es aproximadamente de 1 en 100 a 1 en 300, aunque en algunas regiones es más elevada esta prevalencia: en indios americanos de 1/9 a 1/14 en asiáticos de 1/10 a 1/25 y en caucásicos 1/80 (Gorlin et al., 2001; Danescu et al., 2015). Respecto la fisura submucosa de paladar, en la que existe un defecto sobre todo en la fusión de la capa muscular pero no de la superficie mucosa, la incidencia se estima aproximadamente de 1 en 1200 a 1 en 2000 recién nacidos (Gorlin et al., 2001; Stewart et al., 1971).

La prevalencia en la actualidad de alguna de estas anomalías en España, según los datos del boletín del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC) publicados en 2012, son: la fisura lateral de labio superior con o sin fisura de paladar anterior 3,11/10.000 RNV y la fisura de paladar posterior aislada 3,69/10.000 RNV (Bermejo y Martínez-Frías, 2012).

También se ha descrito diferente predisposición según el sexo. El cierre de las crestas palatinas sucede siete días antes en los embriones masculinos que en los embriones femeninos (Burdi y Silvey, 1969; Yoon et al., 2000; Standing, 2009), por este motivo se cree que las fisuras de paladar posterior aisladas en mujeres son más frecuentes. Las fisuras laterales de labio superior con o sin

fisura de paladar anterior son más frecuente en hombres (Dixon et al., 2011; Fraser, 1970) y con defectos más graves (Mossey et al., 2009; Gorlin et al., 2001). Un 80-85% de las fisuras laterales de labio superior son unilaterales, siendo la fisura lateral de labio superior izquierda (70%) más prevalente que la derecha (Gorlin et al., 2001; Fraser, 1970), manteniéndose esta predisposición en los diferentes grupos étnicos estudiados (Gorlin et al., 2001). Aproximadamente un 85-86% de los casos de fisura lateral de labio superior bilateral y un 68-70% de los casos de fisura de labio superior unilateral están asociadas con fisura de paladar anterior (Fraser, 1970; Gorlin et al., 2001). Las fisuras laterales de labio superior pueden ser completas o incompletas (Gorlin et al., 2001). La fisura de paladar posterior aislada es más frecuente en mujeres (Mossey et al., 2009; Dixon et al., 2011), pero esta predisposición sucede en las que afectan al paladar duro y blando (completa) (ratio 2:1 mujer:hombre), a diferencia de las que sólo afectan al paladar blando en las que no hay prácticamente preferencia de género (ratio 1,2:1 mujer:hombre) (Gorlin et al., 2001). Sin embargo, la predisposición en hombres o mujeres disminuye cuando existen asociadas otras malformaciones en otros aparatos y sistemas (formas sindrómicas) (Mossey et al., 2009; Mossey y Castilla, 2003; Gorlin et al., 2001).

Se ha descrito en las fisuras faciales una asociación con otros defectos congénitos entre un 44 y un 64%. Si se analiza esta asociación respecto los diferentes tipos de fisuras: la fisura de paladar posterior aislada (entre las que se encuentra la fisura de paladar blando) se asocia en un 13-50%, la fisura lateral de labio superior en un 7-13% y la fisura lateral de labio superior con o sin fisura de paladar anterior en un 2-11% (Shprintzen et al., 1985; Gorlin et al., 2001; Fraser, 1970). También se han asociado más defectos congénitos en los pacientes con fisura lateral de labio superior bilateral con o sin fisura de paladar anterior que en la fisura de labio superior unilateral (Shprintzen et al., 1985; Gorlin et al., 2001; Fraser, 1970). También se han descrito más anomalías asociadas en los pacientes sin historia familiar previa que en los pacientes con antecedentes familiares (Shprintzen et al., 1985; Gorlin et al., 2001; Fraser, 1970). En este sentido se ha realizado alguna revisión extensa sobre las fisuras laterales de labio superior con o sin fisura de paladar anterior y la asociación con otros defectos congénitos (Setó-Salvia y Stainer, 2014).

---

*Abreviaturas del texto:* RNV, recién nacidos vivos.

Hasta mayo de 2016, al realizar una búsqueda en Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, 2016), con los términos “left palate” y “left lip” existían unas 1110 entradas (las dos introducidas por separado) y por “left lip palate” unas 363. En esta base de datos se describen las enfermedades conocidas con un componente genético (OMIM, 2016). Pero se debe tener en cuenta que se cree que las fisuras laterales de labio superior con o sin fisura de paladar anterior y las fisuras de paladar posterior aisladas tienen una herencia multifactorial, es decir, además de factores genéticos, también existen factores ambientales, teratógenos, *loci* de predisposición, *etc.* como factores etiológicos (Fraser, 1980; Kohli y Kohli, 2012; Wong y Hägg, 2004; O’Rahilly y Müller, 1992; Romitt et al., 1999; Shiota, 2009).

Algunos ejemplos de la interacción entre los factores genéticos y ambientales son:

- El factor de crecimiento alfa (*TGFA*), en concreto su variante *TaqI C2*, y el tabaquismo materno incrementaban el riesgo de:
  - o fisura de paladar posterior aislada en 6-8 veces y
  - o fisura lateral de labio superior con o sin fisura de paladar el doble.
- el factor de crecimiento alfa (*TGFA*), en concreto su variante *TaqI C2*, sin ingesta multivitamínica materna durante el primer trimestre de gestación, incrementaban el riesgo de presentar la fisura lateral de labio superior con o sin fisura de paladar anterior en 3-8 veces.
- Ciertas variantes alélicas en los genes *TGFB3* y *MSX1* y el tabaquismo materno elevaban el riesgo de presentar fisura de paladar posterior aislada en su descendencia. (Kohli y Kohli, 2012; Gorlin et al., 2001; Romitt et al., 1999).
- También ciertas variantes alélicas en el gen *MSX1* y la ingesta materna de alcohol elevaban el riesgo de presentar fisura lateral de labio superior con o sin fisura palatina anterior (Kohli y Kohli, 2012; Gorlin et al., 2001; Romitt et al., 1999).

#### 1.3.4. Genes implicados en las fisuras orofaciales

Se ha observado que sólo en un tercio de las mutaciones que en ratones se asocian a defectos craneofaciales se pueden asociar con genes homólogos en humanos que produzca una dismorfogénesis similar (Wilkie y Morriss-Hay, 2011) (Tablas 1 y 2). Estos genes han sido de gran utilidad a la hora de entender

diferentes aspectos clínicos y genéticos relacionados con la clínica que presentan los pacientes con alteraciones en estas regiones (Dixon et al., 2011; Cox, 2004; Bush y Jiang, 2012; Thyagarajan et al. 2003; Levi et al., 2011). Los otros dos tercios de estas mutaciones producen letalidad embrionaria precoz (Wilkie y Morriss-Hay, 2011). Pero no son genes exclusivos del desarrollo craniofacial, por ejemplo el gen *Shh* está relacionado con el desarrollo craniofacial y el de las extremidades (Chai y Maxson, 2006).

Han sido descritos genes en síndromes que presentan fisura lateral de labio superior con o sin fisura de paladar anterior (Dixon et al., 2011; Wilkie y Morriss-Kay, 2001; Marazita, 2012), genes relacionados con fisura de paladar posterior aislada (Murray y Schutte, 2004; Marazita, 2012) y genes relacionados con fisuras orofaciales (Je gessur et al., 2009; Wong y Hägg, 2004; Marazita, 2012), entre otros.

Tabla 1 Genes asociados a fisuras orofaciales no sindrómicas en humanos

Genes	Fisuras orofaciales no sindrómicas
<b><i>BMP4</i></b>	CLP
<b><i>FGF8</i></b>	CLP
<b><i>FGFR2</i></b>	CLP
<b><i>FOXE1</i></b>	CLP, CP
<b><i>IRF6</i></b>	CLP, CP
<b><i>MSX1</i></b>	CLP, CP
<b><i>PDGFC</i></b>	CLP
<b><i>SATB2</i></b>	CP
<b><i>SUMO1</i></b>	CLP
<b><i>TBX22</i></b>	CP
<b><i>TGFβ3</i></b>	CLP, CP

Abreviaturas: CLP, fisura lateral de labio superior con o sin fisura de paladar anterior; CP, fisura de paladar posterior aislada. Basada en los estudios de Dixon et al. (2011), Cox (2004) y Bush y Ornitz (2012).

Tabla 2 Genes asociados a fisuras orofaciales sindrómicas en humanos

Genes	Fisuras orofaciales sindrómicas	Tipo fisura
<b>BCOR</b>	Sd Oculo-facio-cardio-dental	CP
<b>CDH1</b>	Cáncer gástrico y CLP	CLP
<b>CHD7</b>	Asociación CHARGE	CP
<b>CHRNA</b>	Sd pterigium múltiple letal tipo Es cobar	CP
<b>COL2A1</b>	Sd Stickler tipo 1	CP
<b>COL11A1</b>	Sd Stickler tipo 2	CP
<b>COL11A2</b>	Sd Stickler tipo 3	CP
<b>DHCR7</b>	Sd Smith-Lemli-Opitz	CP
<b>DHCR24</b>	Sd demosterolosis	CP
<b>DHODH</b>	Sd Miller	CP
<b>EFNB1</b>	Sd craneo-fronto-nasal	CLP, CP
<b>FGFR1</b>	Sd Kallman	CP
<b>FGFR2</b>	Sd Crouzon, Sd Apert	CP
<b>FLNA</b>	Sd oto-palato-digital tipos 1 y 2	CP
<b>FLNB</b>	Sd Larsen; Atelosteogénesis	CP
<b>FOXC2</b>	Sd linfedema hereditario oedistiquiasis	CP
<b>FOXE1</b>	Sd Bamforth-Lazarus	CP
<b>GLI2</b>	Holoprosencefalia	CLP
<b>GLI3</b>	Sd oro-facio-digital , Sd Greig	CLP, CP
<b>IRF6</b>	Sd Van der Woude, Sd pterigium políteo	CLP, CP
<b>KCNJ2</b>	Sd Andersen	CP
<b>MID1</b>	Sd Opitz g/BBB	ML
<b>MLL2</b>	Sd Kabuki	CP
<b>NIPBL</b>	Sd Cornelia de Lange	CP
<b>OFD1</b>	Sd Oro-facio-digital tipo 1	ML
<b>PHF8</b>	Retraso mental ligado al X y CLP	CLP
<b>PQBP1</b>	Retraso mental ligado al X	CP
<b>P63 (TP63)</b>	Sd displasia ectodérmica-ectrodactilia	CLP, CP
<b>SATB2</b>	Hendidura de paladar aislada	CP
<b>SLC26A2</b>	Displasia diastrófica	CP
<b>SOX9</b>	Displasia campomélica, Sd Pierre-Robin	CP
<b>TBX1</b>	Sd de microdelección 22q11.2 (en el que se engloba: Sd DiGeorge, Sd velo-cardio-facial y Sd defecto conotruncal y de la cara)	CP
<b>TBX22</b>	Sd anquiloglosia con fisura del paladar ligado al X	CP

<b>TCOF1</b>	Sd Treacher Collins	CP
<b>TGFBR1</b>	Sd Loeyes-Dietz	CP
<b>TGFBR2</b>	Sd Loeyes-Dietz	CP
<b>TWIST1</b>	Sd Saethre-Chotzen	CP

Abreviaturas: CLP, fisura lateral de labio superior con o sin fisura de paladar anterior; CP, fisura de paladar posterior aislada; ML: fisura de labio media; Sd: Síndrome. Basada en los estudios de Dixon et al. (2011), Cox (2004) y Bush y Orntz (2012).

## 2. CONDICIONANTES DE LOS ESTUDIOS EN EMBRIOLOGÍA

Yu y Orntz (2011) puntualizan que al valorar los embriones antes de su estudio y poder clasificarlos como sanos o con anomalías, se debería tener en cuenta que una variante de la normalidad es la variabilidad que puede observarse entre las diferentes regiones del embrión, pudiendo observarse diferentes morfologías, siendo todas ellas normales. Además se debe tener en cuenta que dentro del desarrollo normal embrionario existe una asimetría fisiológica entre los diferentes embriones. Se había descrito que la elevación de las crestas palatinas sucedía de una forma desincronizada, es decir, una de las crestas palatinas podría ascender antes o después de la otra, no necesariamente a la vez (Walker y Fraser, 1956; Yu y Orntz, 2011). Si no se tiene en cuenta podrán rechazarse algunos embriones normales (Yu y Orntz, 2011).

La variabilidad entre embriones de una misma especie es un hecho conocido (Dickey y Gasser, 1993). Los embriones humanos son los que presentan una mayor variabilidad (Dickey y Gasser, 1993). Varias hipótesis al respecto han sido descritas: el periodo de gestación es más largo en primates que en otras especies de animales de laboratorio estudiadas, por lo que el desarrollo prenatal es más lento; la mayor heterogeneidad genética de los humanos respecto otras especies de animales de laboratorio; la dificultad en determinar exactamente la fecha de concepción en humanos (pues se calcula respecto la fecha de la última menstruación) entre otros (Shiota, 2009). Un estudio realizado mediante ecografía transvaginal en embarazos humanos con fecha de concepción conocida (al ser mediante técnicas de reproducción asistida) mostró una amplia variabilidad tanto en las LCRs de los embriones como en el diámetro del saco amniótico (Dickey y Gasser, 1993).

---

*Abreviaturas del texto:* LCR, longitud coronilla-rabadilla.



La heterogeneidad propia de la embriología humana y las dificultades para obtener datos objetivos de ejemplares procesados histológicamente, ha inducido en nuestro grupo de investigación a aplicar criterios de comparación de ejemplares que no fueran dependientes de las características singulares de cada uno (Macarulla-Sanz et al., 1996; Nebot-Cegarra et al., 1999; Nebot-Cegarra et al., 2001; Nebot-Cegarra et al., 2005).

Justificación

\_\_\_\_\_



Las discrepancias sobre cómo se forma el paladar secundario humano a partir del crecimiento y elevación de las crestas palatinas, nos ha inducido a estudiar estos procesos a partir de un nuevo enfoque metodológico basado en cuatro objetivos principales:

1. Analizar cada cresta palatina integrada dentro del proceso maxilar al que pertenece. Utilizando como parámetro el volumen de las diferentes zonas en las que se puede dividir la región (una de las cuales incluye mayoritariamente a las crestas palatinas).
2. Aplicar estas medidas a secciones histológicas seriadas de embriones humanos pertenecientes al período que discurre entre el inicio de la formación de las crestas palatinas y su elevación completa (iEC 17-23).
3. Solventar los posibles errores en el cálculo del volumen de cada ejemplar embrionario inducidos por una serie de factores propios (tamaño del espécimen, grado de retracción tisular por el proceso de fijación histológico, cambios postmortem, etc.) calculando en cada zona analizada qué porcentaje del total representa su volumen, relativizando los datos y haciendo que éstos sean comparables entre sí.
4. Definir las dinámicas de ocupación volumétrica tisular de las zonas de la región y sus partes durante el período estudiado.



Hipótesis





El crecimiento y elevación de las crestas palatiras depende de dinámicas tisulares de la parte medial de cada procesomaxilar, las cuales no son totalmente independientes de los cambios producidos en zonas adyacentes de este proceso.





# Objetivos





## OBJETIVO GENERAL

Conocer la participación de las crestas palatinas, integradas en el correspondiente procesomaxilar del que derivan, durante su proceso de elevación en humanos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Obtener por estereología los volúmenes que ocupan, en el correspondiente proceso maxilar, la zona que incluye mayoritariamente a las crestas palatinas, así como otras zonas adyacentes.

b) Obtener por estereología los volúmenes que ocupan, en el correspondiente proceso maxilar, las partes de cada zona que incluye mayoritariamente a las crestas palatinas, así como las de otras zonas adyacentes.

c) Conocer en cada estadio embrionario qué valor porcentual del total analizado representa cada volumen de las zonas o de sus partes, definido en los objetivos anteriores.

d) Comparar entre estadios embrionarios los cambios de los valores porcentuales definidos en el objetivo anterior.

e) Analizar a partir de los datos derivados del objetivo anterior la dinámica volumétrica tisular de la zona que contiene mayoritariamente la correspondiente cresta palatina en sí misma y en relación a los cambios de las zonas adyacentes del proceso maxilar.

f) Deducir posibles relaciones de las dinámicas definidas en el objetivo anterior con mecanismos implicados en el proceso de formación y elevación de las crestas palatinas.



# Material y métodos





### 3. SELECCIÓN DEL MATERIAL

Este estudio se ha centrado en el periodo embrionario humano, concretamente en el periodo comprendido entre el inicio del desarrollo de las crestas palatinas (procesos palatinos laterales) hasta que se produce la elevación de las mismas.

#### 3.1. Selección de embriones

Los embriones humanos seleccionados pertenecen a la Colección Bellaterra (Profesor Doménech-Mateu) de la Unitat d'Anatomia i d'Embridologia Humana, Departament de Ciències Morfològiques, Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona. Dichos embriones están clasificados en EC según los criterios de O'Rahilly y Müller (1987), descartándose que alguno estuviera afectado de alguno defecto congénito.

Los embriones fueron fijados en fomal tamporado al 10%, incluidos en parafina y seccionados transversalmente, siendo montados en los portaobjetos de forma seriada (Fig. 8). En la Tabla 3 se muestran los datos de los embriones humanos, así como la información de los cortes histológicos.

Tabla 3 Datos de desarrollo de los embriones humanos estudiados en el presente estudio e información de los cortes histológicos estudiados

Datos de los embriones estudiados				Datos de los cortes histológicos		
Nombre <sup>1</sup>	EC <sup>1</sup>	EPO <sup>1</sup> (días)	LCR <sup>1</sup> (mm)	Grosor medio <sup>2</sup> (µm)	Tinción	Selección secuencial
RE1	17	41	15	8	H -E	1 de 2
FU20	18	45	16	9,5	H -E	1 de 4
DU8	19	49	18	7,8	H & oE	1 de 4
VAL1	20	52	20	8,9	H -E	1 de 4
PLA 3	21	52	21	10	H & oE	1 de 4
G13	22	55	26	9,6	H & oE	1 de 4
SAM	23	58	30	10,2	B	1 de 8

<sup>1</sup> Datos del catálogo de la Colección Bellaterra (Prof. Doménech-Mateu). <sup>2</sup> Promedio del grosor de los cortes histológicos medido con el micrómetro DMX-1 (Mitutoyo®, Tokio, J apan). Abreviaturas: EC: estadio Carnegie; EPO: edad postovulatoria; H-E: tinción hematoxilina-eosina; B: tinción Bielschosky; LCR: longitud coronilla-rabadilla.



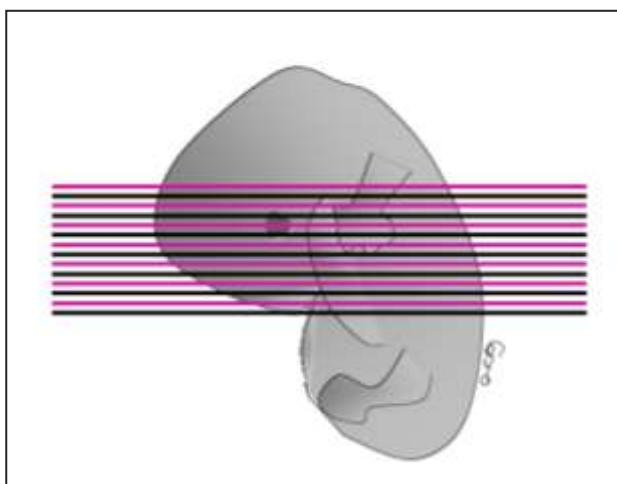


Fig. 8 Esquema de un embrión y de las secciones histológicas seleccionadas que contienen el SMS. Los cortes marcados en violeta serían los estudiados con una selección secuencial 1:2 a partir de una sección escogida al azar

### 3.2. Selección de cortes embrionarios

De cada embrión, primero se determinaron qué secciones histológicas incluían el macizo facial. De éstas, se seleccionaron (selección secuencial) sólo aquellas que se encontraban separadas entre sí por un número constante de secciones para cada ejemplar, en función de su estado de desarrollo (Tabla 3, selección secuencial), contadas a partir de una sección escogida al azar (Fig. 8).

## 4. MICROFOTOGRAFÍAS

### 4.1. Obtención de microfotografías

De los cortes histológicos seleccionados se capturaron imágenes digitales mediante la cámara fotográfica Infinity X® (DeltaPix®, Denmark), dotada de una lente 0'63x, utilizando el objetivo 3'2x del microscopio Jenalumar® (Carlss Zeis Jena®, Jena, Germany). Esta cámara estaba conectada a un ordenador que disponía del programa adecuado. Posteriormente se almacenaron digitalmente las imágenes (formato .tiff) en archivos separados para cada corte y agrupados según los diferentes embriones.

## 4.2. Superposición de microfotografías

De cada sección histológica embrionaria se obtuvieron distintas imágenes (microfotografías parceladas) que contenían fragmentos comunes, que permitieron una ajustada superposición de las mismas, mediante el programa Hugin D.7-beta 3® (Canadá). De la superposición de éstas se obtuvo una imagen que contenía la totalidad de las estructuras a estudiar, pero sin pérdida de resolución, microfotografía de la sección histológica (Fig. 9).

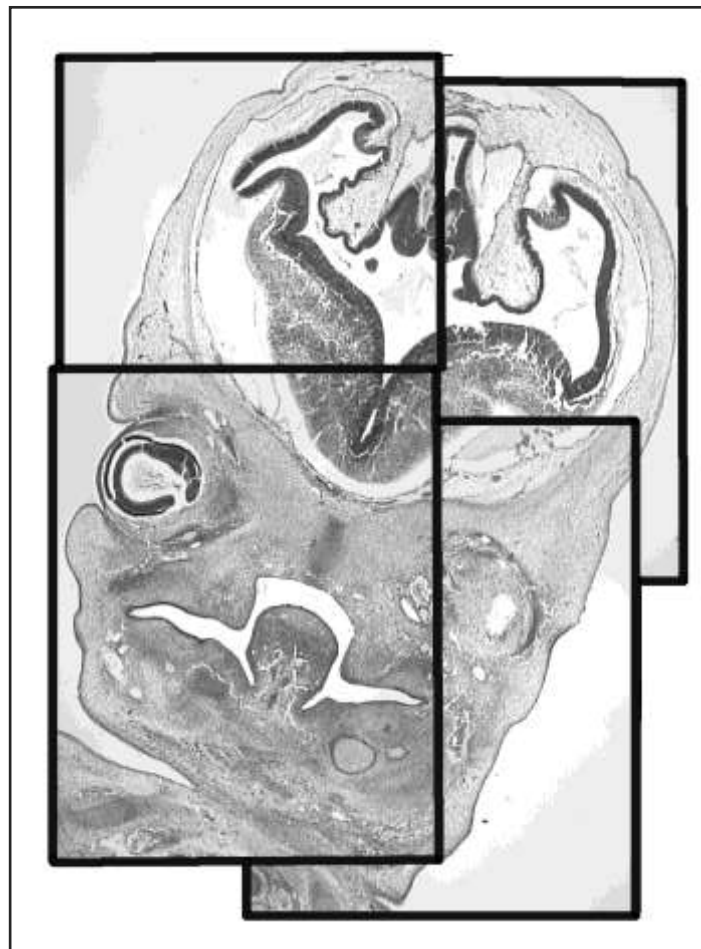


Fig. 9 Microfotografías (objetivo 3'2x) de un corte frontal de la cabeza del embrión EC18 (sección histológica FU20-29). Estas microfotografías están superpuestas entre sí con perfecta alineación de los fragmentos comunes; obteniendo de este modo una imagen final sin pérdida de resolución. Abreviatura: EC, estadio Carnegie.

## 4.3. Archivo de imágenes

Las microfotografías se archivaron agrupadas bajo el nombre de los embriones estudiados y el número de sección histológica del embrión.

## 5. TRATAMIENTO ASISTIDO POR ORDENADOR DE LAS MICROFOTOGRAFÍAS

### 5.1. Orientación de las microfotografías y división derecha/izquierda

Con la ayuda de Adobe® Photoshop® versión CS4 (San José, California, USA) se procedió inicialmente a orientar las microfotografías respecto a un plano vertical que correspondía con el plano mediosagital entre estructuras simétricas. Este plano se reflejaba sobre la microfotografías mediante una línea que marcaba la división derecha/izquierda (plano mediosagital) (Fig. 12).

### 5.2. Reconstrucción de todas las microfotografías de la cabeza de cada embrión estudiado

Una vez orientadas las microfotografías respecto el plano mediosagital se realizó una reconstrucción de todas las correspondientes a la cabeza para cada embrión (Fig. 10). Esta reconstrucción se realizó superponiendo ordenadamente las secciones histológicas, de este modo se facilitaba la interpretación de éstas, permitiendo tener una visión global de la cabeza de cada embrión (Fig. 28). Se obtuvieron con la ayuda de Adobe® Photoshop® versión CS4 (San José, California, USA), creando archivos en los que se mantuvieron las capas que contenían las distintas microfotografías de cada embrión. Estos archivos se guardaron con el nombre del embrión (.tif). La operativa para poder ocultar a demanda algunas capas favoreció enormemente el proceso de interpretación embriológica.

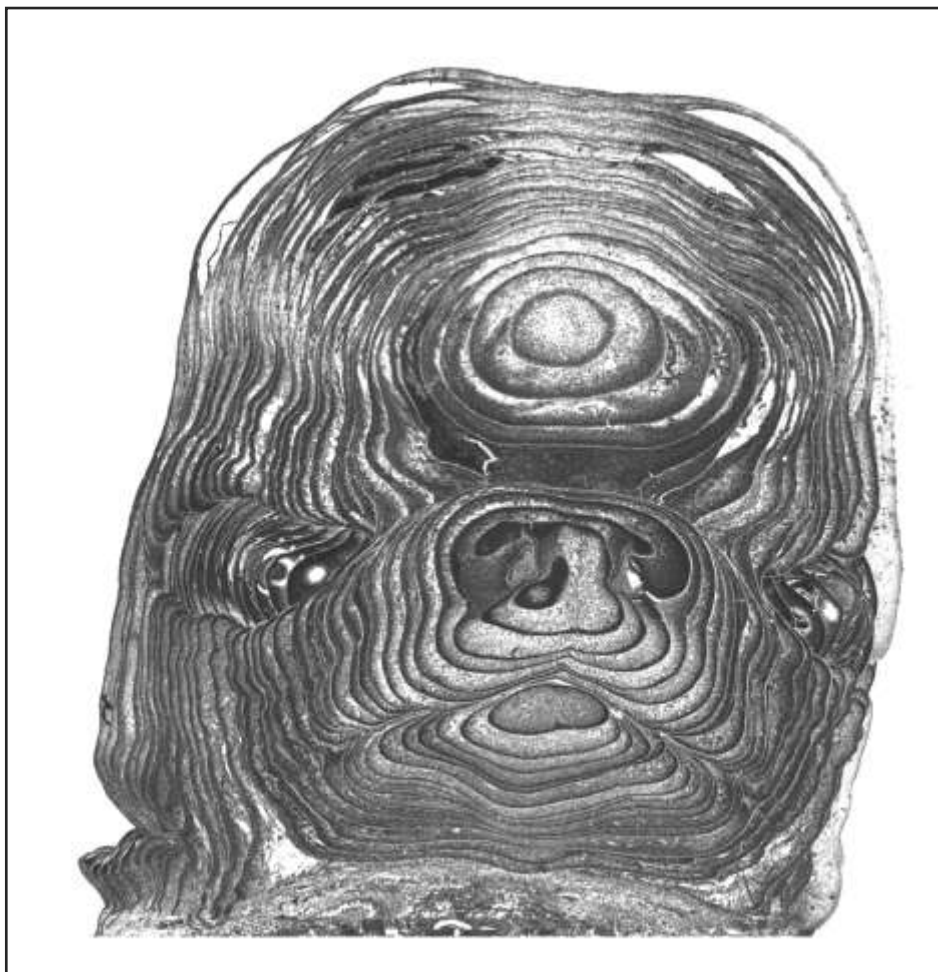


Fig. 10 Reconstrucción con todas las microfotografías (objetivo 3'2x) de la cabeza del embrión EC22 (G13). Abreviaturas: EC, estadio Carnegie.

### 5.3. Segmento maxilar seleccionado (SMS)

De las microfotografías de las secciones referidas en el apartado 3.2. se utilizaron para el estudio cuantitativo aquellas que contenían fragmentos del SMS (Tabla 4). El SMS se correspondía, en cada lado (derecho e izquierdo), con la zona del proceso maxilar relacionada con la cresta palatina (proceso palatino lateral) -una vez iniciada su formación- o su presunto lugar de origen.

Tabla 4 Datos de la sección histológica inicial y final (derecha e/izquierda) seleccionada, que incluye el segmento maxilar seleccionado

EMBRIONES	EC	SMS DERECHO		SMS IZQUIERDO	
		SECCIÓN INICIAL	SECCIÓN FINAL	SECCIÓN INICIAL	SECCIÓN FINAL
RE1	EC17	19	36	19	36
FU20	EC18	20	35	19	32
DU8	EC19	8	27	8	27
VAL1	EC20	22	42	23	45
PLA3	EC21	20	39	19	37
GI3	EC22	17	33	18	35
SAM	EC23	17	44	17	44

Abreviaturas: EC, estadio Carnegie; SMS, segmento maxilar seleccionado

Siguiendo a Yu y Ornit (2011) localizamos el límite entre el paladar primario y el paladar secundario a la altura de los órganos vomeronasales de Jacobson, que están situados en el tabique nasal a nivel del canal incisivo (Radlanski et al., 2004; Standring, 2005). El límite posterior era el último corte en el que se observaban las crestas palatinas (EC18-23) o su presunto origen (EC17).

Los contornos del contorno del SMS se dibujaron con la ayuda de Adobe® Photoshop® versión CS4 (San José, California, USA) independientemente su lado derecho e izquierdo (Fig.13).

La división en secciones histológicas hace que en cada una se observe un fragmento (derecho e/izquierdo) del SMS. Por tanto un SMS comprende la suma de los fragmentos del SMS de cada lado que en cada sección histológica estudiada queda entre la línea maxilar y las líneas superior y lateral (Fig. 12 y 13):

- a) La línea maxilar era la línea que separaba, dependiendo del estado embrionario, el fragmento del SMS de un lado de las cavidades de la boca, fosas nasales o faringe. Su extremo superior correspondía al punto de unión con la cara lateral de la fosa nasal o de la faringe y su extremo inferior al punto donde se continuaba con el proceso mandibular. Para obtener imágenes de las líneas maxilares derecha e izquierda de cada embrión, se han marcado sobre ella una serie de puntos, con la ayuda de Adobe® Photoshop® versión CS4 (San José, California, USA), cuyas coordenadas han permitido crear gráficos mediante Excel (Microsoft® Excel® 2008 (Redmond, Washington, USA) (Fig. 11).

- b) La línea superior era la línea perpendicular al plano mediosagital que pasaba por el extremo superior de la línea maxilar.
- c) La línea lateral era la línea paralela al plano mediosagital que pasaba por el extremo inferior de la línea maxilar.

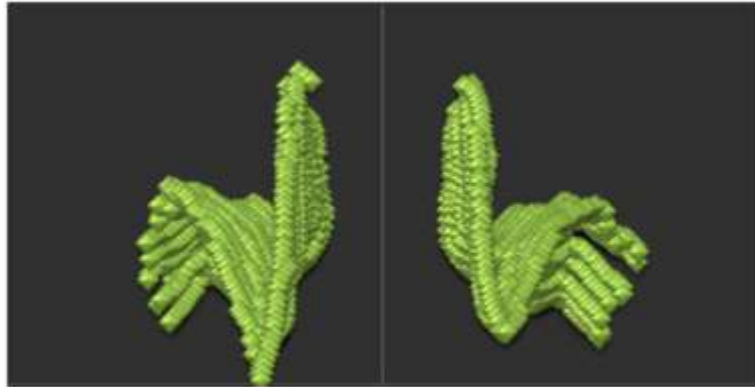


Fig. 11 Líneas maxilares superpuestas del embrión PLA3 (EC21). Permite apreciar la hendidura buconasofaríngea y, en parte, las crestas palatinas. El plano mediosagital se ha representado en el centro de cada imagen. Abreviatura: EC, estadio Carnegie.

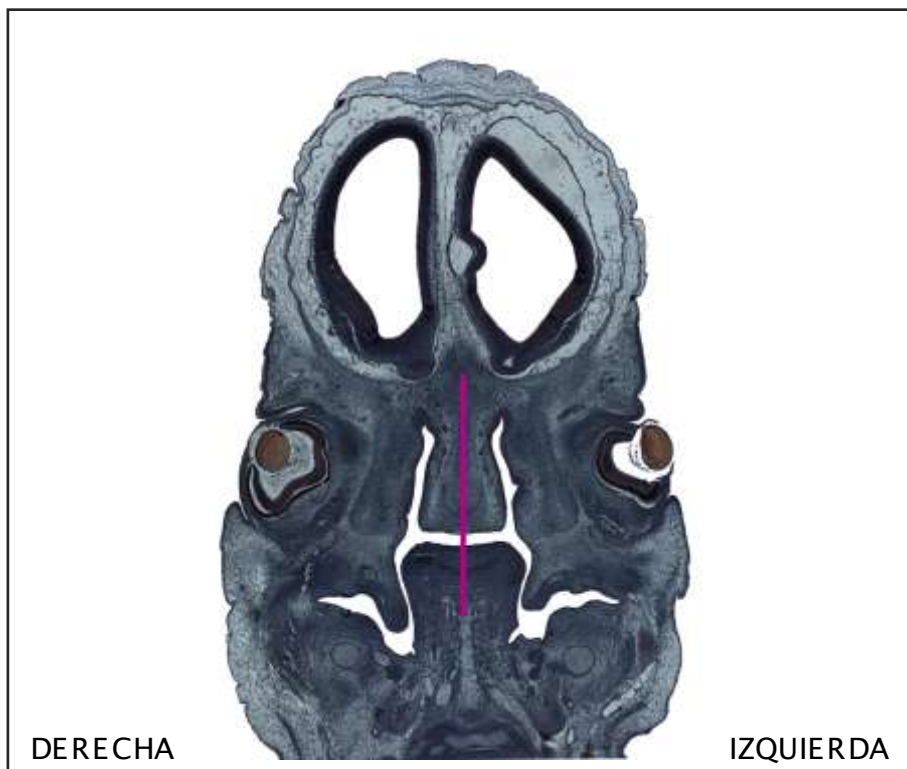


Fig. 12 Microfotografía (objetivo 3'2x) de un corte frontal de la cabeza del embrión EC20 (sección histológica VAL1-37) en la que se ha dibujado el plano mediosagital (línea de color violeta). Abreviatura: EC, estadio Carnegie.

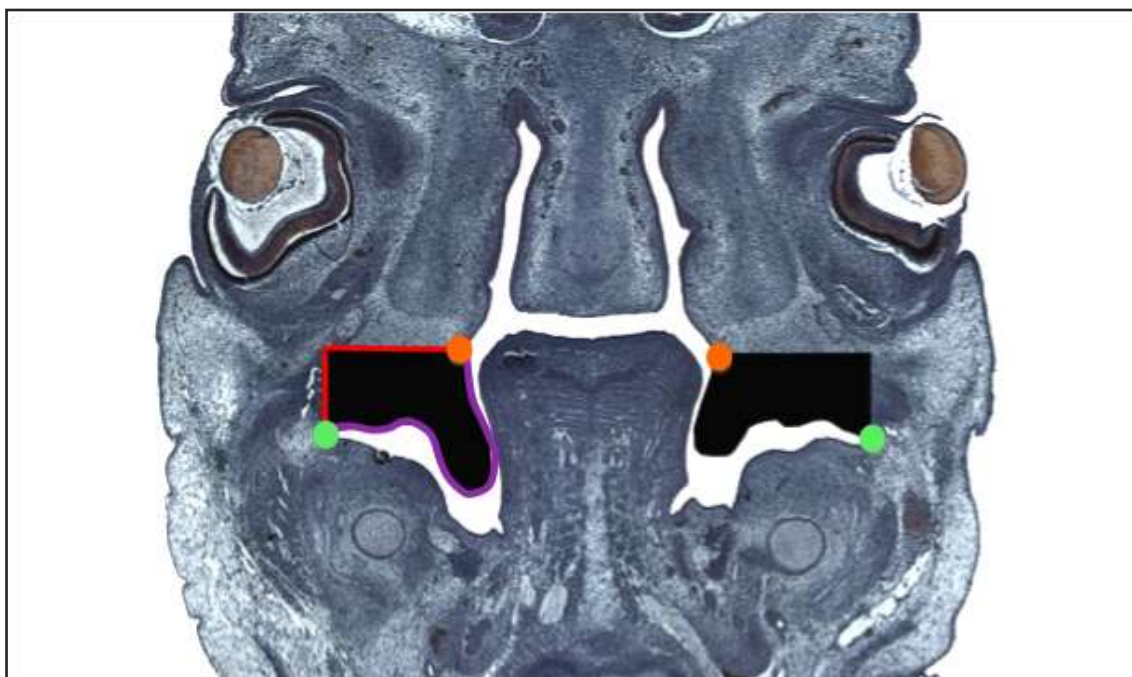


Fig. 13 Microfotografía (objetivo 3'2x) de un corte frontal de la cabeza del embrión EC20 (sección histológica VAL1-37). En ella está dibujado el SMS (territorio relleno de color negro), la línea maxilar (línea de color morado), el extremo superior de la línea maxilar (punto de color naranja), el extremo inferior de la línea maxilar (punto de color verde) y los límites superior y lateral del SMS (líneas de color rojo). Abreviatura: EC, estadio Carnegie; SMS, segmento maxilar seleccionado.

#### 5.4. Delimitación de la gradilla del SMS

Cada fragmento del SMS ha sido dibujado sobre cada lado de la microfotografía correspondiente y se ha parcelado mediante un sistema de celdas homogéneas que hemos denominado gradilla del SMS.

Para dibujar la gradilla en cada fragmento del SMS, definíamos un cuadrante cuyas cuatro caras estaban delimitadas por (Fig. 14):

- a) Un límite superior. Era la línea perpendicular al plano mediosagital que pasaba por el extremo superior de la línea maxilar.
- b) Un límite inferior. Era la línea perpendicular al plano mediosagital que pasaba por el extremo inferior de la línea maxilar.
- c) Un límite lateral. Era la línea paralela al plano mediosagital que pasaba por el extremo inferior de la línea maxilar.
- d) Un límite medial. Era la línea paralela al plano mediosagital que pasaba por el extremo superior de la línea maxilar.



Una vez habíamos delimitado el cuadrante, anteriormente detallado, lo dividíamos en celdas con las mismas medidas (homogéneas). El método utilizado consistía en subdividir en tres partes iguales el espacio horizontal comprendido entre el punto superior de la línea maxilar y el punto de intersección entre las líneas superior y lateral delimitadoras del fragmento del SMS. Asimismo se procedía con la distancia vertical entre el citado punto de intersección y el punto inferior de la línea maxilar, dividiéndola, en este caso, en dos partes iguales. Por cada uno de los puntos de división horizontal se trazaron líneas paralelas al plano mediosagital y por los puntos de división vertical líneas perpendiculares a ese plano. De la intersección de las citadas líneas se delimitaron seis celdas homogéneas de la gradilla del SMS, todas con la misma área. En el caso que hubiera parte del fragmento del SMS, derecho e izquierdo, que se encontrara fuera de estas seis celdas, la gradilla del SMS se amplaba, preservando las mismas dimensiones de la celda para cada fragmento del SMS, derecho e izquierdo independientemente, hasta incluir la totalidad de dicho fragmento (Figs. 14 y 15). Se debe remarcar que cada gradilla era exclusiva de cada fragmento del SMS (derecho e izquierdo). Todas estas divisiones se dibujaron con la ayuda de Adobe® Photoshop® versión CS4 (San José, California, USA).

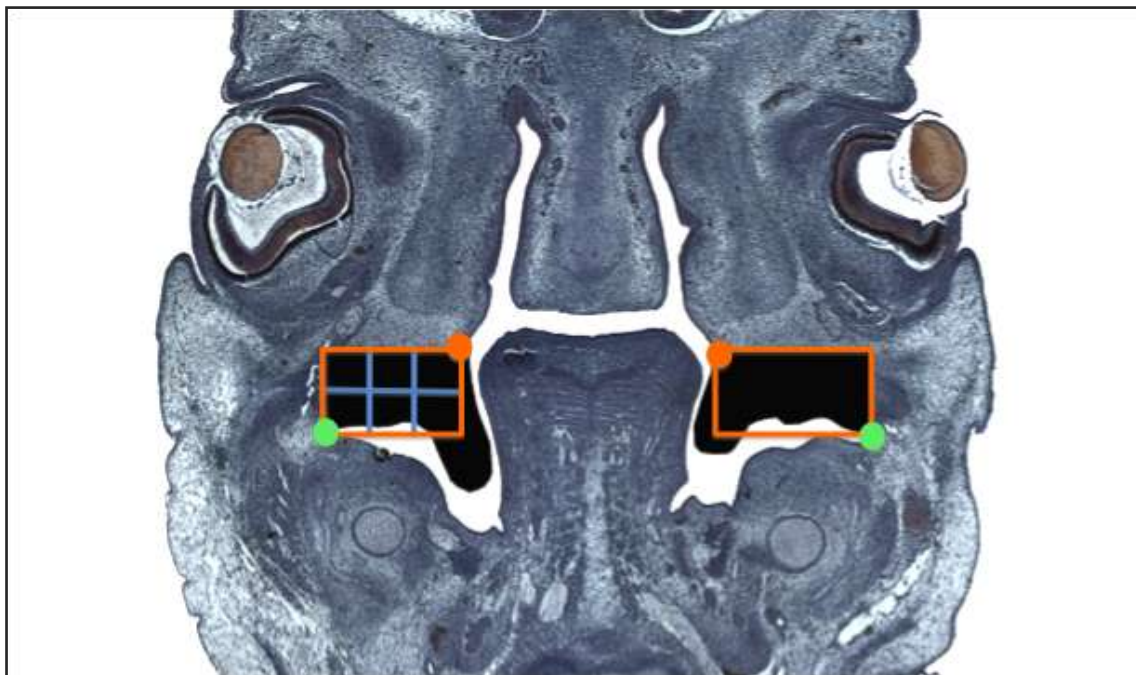


Fig. 14 Microfotografía (objetivo 3'2x) de un corte frontal de la cabeza del embrión EC20 (sección histológica VAL1-37). En ella está dibujado el SMS en color negro, el extremo superior de la línea maxilar (punto de color naranja) y el extremo inferior de la línea maxilar (punto de color verde). También se puede observar a la derecha el cuadrante (color naranja) que servía de base para crear la gradilla del SMS. La gradilla del SMS (a la izquierda, cuadrante color naranja con líneas en color azul en su interior). Abreviatura: EC, estadio Carnegie; SMS, segmento maxilar seleccionado.

*Abreviaturas del texto:* SMS, segmento maxilar seleccionado.



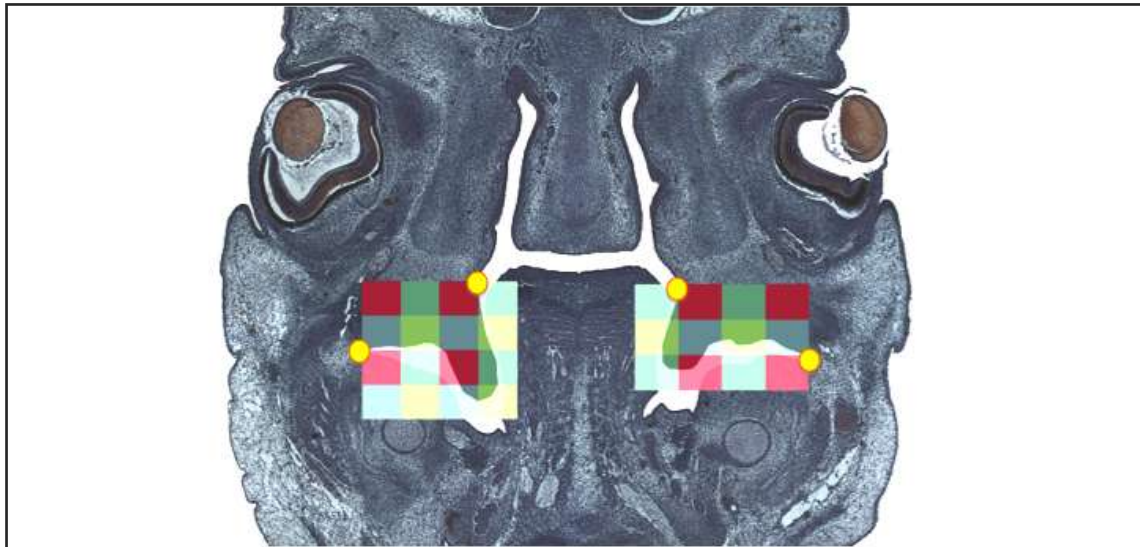


Fig. 15 Microfotografía (objetivo 3'2x) de un corte frontal de la cabeza del embrión EC20 (sección histológica VAL1-37). En ella se observa la gradilla del SMS derecha e izquierda, que delimita celdas homogéneas e incluye totalmente cada fragmento del SMS. Abreviatura: EC, estadio Carnegie; SMS, segmento maxilar seleccionado.

### 5.5. Numeración de las celdas de la gradilla del SMS

Las columnas de la gradilla del SMS se nombraron por letras en mayúsculas (A, B, C, etc.) empezando por el cuadrante superior externo y las filas se nombraron con números (1, 2, 3, etc.) empezando también por el cuadrante superior externo. De este modo, cada celda tenía un nombre compuesto por la letra de la columna y el número de la fila (por ejemplo: la celda superior externa es A1) (Fig. 16).

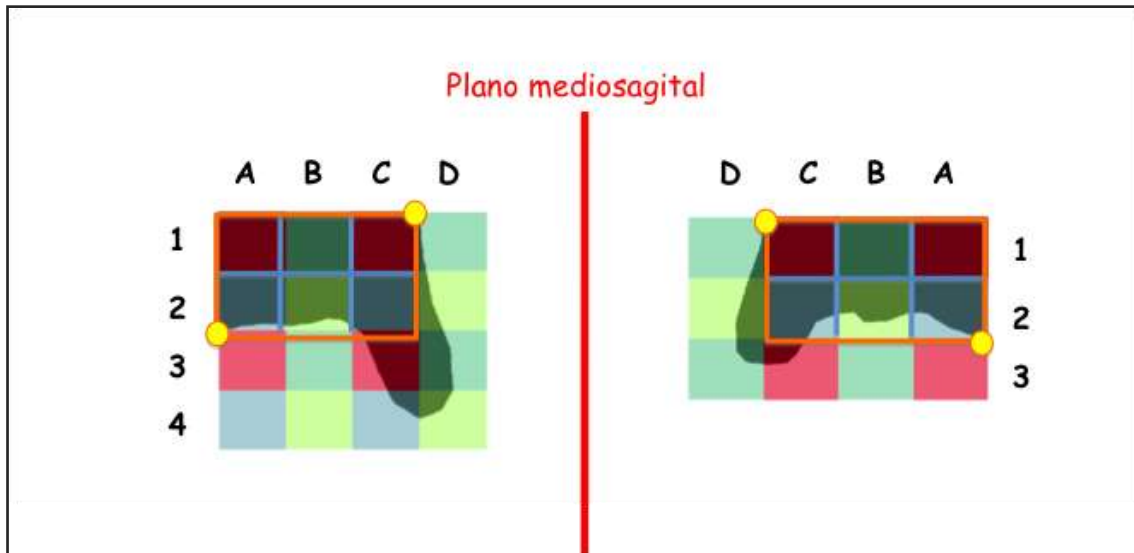


Fig. 16 Microfotografía (objetivo 3'2x) de un corte frontal de la cabeza del embrión EC20 (sección histológica VAL1-37). En ella se observa la rotulación de las celdas de la gradilla del SMS de cada fragmento del SMS, derecho e izquierdo. En las columnas mediante letras en mayúsculas (A, B, etc.) empezando por el cuadrante superior externo y las filas con números (1, 2, etc.) empezando por el mismo cuadrante. La línea mediosagital de la sección histológica es la que está representada en color rojo. Abreviatura: EC, estadio Carnegie; SMS, segmento maxilar seleccionado.

## 5.6. Contraste y agrupación de las celdas de la gradilla del SMS

Una vez delimitadas las diferentes celdas sobre cada fragmento del SMS, se acoplaron las imágenes de los diferentes fragmentos del SMS con las de la gradilla del SMS, mediante Adobe® Photoshop® versión CS4 (San José, California, USA). Después se creó un documento nuevo (.tif), con el mismo programa, el cual se archivó con el nombre del embrión estudiado (por ejemplo: VAL1). Dentro de éste se crearon tantas capas como celdas tenía la gradilla del SMS. Cada capa se nombraba con el lado analizado (-d" para las celdas del lado derecho y -e" para las celdas del lado izquierdo (del catalán -esquerre")) y la celda estudiada (por ejemplo: d-A1). En cada capa se copiaban las partes de las celdas ocupadas por tejido (grupo celular (por celda)) que daban nombre a la capa (por ejemplo: d-A1), ordenándose estas imágenes dentro de cada capa de arriba abajo y de izquierda a derecha, por orden, desde la primera hasta la última sección histológica analizada. Después estos grupos celulares se contrastaron en blanco sobre un fondo negro, también con la ayuda de Adobe® Photoshop® versión CS4 (San José, California, USA) (Fig. 17). Finalmente, sin destruir el archivo original, cada capa se acoplaba y guardaba en un nuevo archivo (.tif), dentro de una nueva carpeta, con el nombre del embrión analizado, el lado del fragmento del SMS y la celda de la gradilla del SMS analizada en dicha capa (por

Abreviaturas del texto: SMS, segmento maxilar seleccionado.

ejempb: VAL1-d-A1). Creando un nuevo archivo para cada capa. Como no todas las secciones histológicas de un mismo embrión presentaban todas las celdas, realizábambs un registro para cada capa de los grupos celulares incluidos en ella por orden, anotandb el lado y nombre del fragmento del SMS incluido (teniendo un registro exacto de cada grupo celular presente en una capa determinada a qué sección histológica y lado del fragmento del SMS se correspondía).

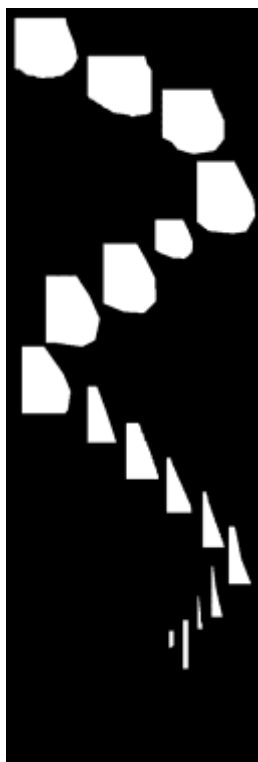


Fig. 17 Imagen del archivo "VAL1-d-D2" que se corresponde con los grupos de las celdas D2 del lado derecho del embrión EC20 (VAL1), realizada mediante Adobe® Photoshop® versión CS4 (San José, California, USA). En ella la imagen ha sido acoplada, estando el tejido presente en las celdas con color blanco sobre un fondo negro. Abreviatura: EC, estadio Carnegie.

### 5.7. Obtención de imágenes binarias

Cada archivo acoplado y contrastado con los grupos celulares de una misma celda para cada lado y embrión, se exportó al analizador de imágenes Visilog® 5.1.Noesis® (Les Ulis œCourtaboeuf, Paris, France). Como primer paso se realizó la binarización de todos los segmentos (Fig. 18A).

### 5.8. Identificación individual de los grupos de celdas y medición de éstos

El siguiente paso fue identificar, con el mismo analizador de imágenes, los diferentes grupos celulares mediante un código de colores diferente (Fig. 18B). Después, en todas ellas, se calcularon las áreas y el baricentro. Los resultados de los cálculos detallados anteriormente eran mostrados en una tabla dentro del programa Visilog® 5.1.Noesis® (Les Ulis œCourtaboeuf, Paris, France) (Fig. 18C).

### 5.9. Edición de los resultados y exportación a un programa de cálculo

Los valores calculados por el analizador de imágenes Visilog® 5.1. Noesis® (Les Ulis œ Courtaboeuf, Paris, France) eran exportados al programa de cálculo de datos Microsoft® Excel® 2008 (Redmond, Washington, USA). Estos archivos se guardaban en un archivo de Excel® con el nombre del embrión y del corte histológico (.xlsx). Dentro de este archivo se crearon diferentes pestañas, las cuales se correspondían con un grupo de celdas determinado (diferenciando los lados derecho e izquierdo) (Fig. 18D).

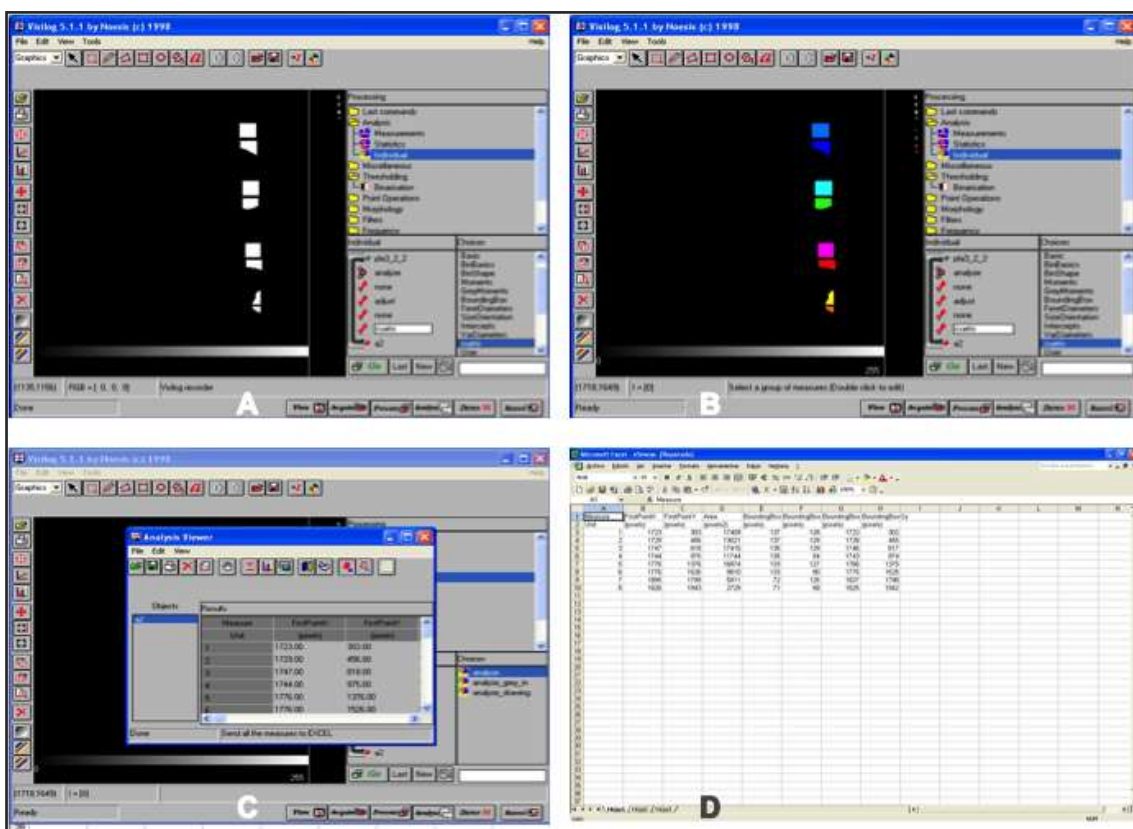


Fig. 18 Cuatro imágenes del proceso de análisis del grupo de celdas del lado izquierdo C2 del embrión EC21 (PLA3-e-C2), las imágenes de la A a la C se corresponden a las realizadas con el analizador de imágenes Visilog® 5.1. Noesis® (Les Ulis œ Courtaboeuf, Paris, France) y la imagen D con el programa de cálculo Microsoft® Excel® 2008 (Redmond, Washington, USA). A) Binarización de la imagen. B) Identificación individual de los grupos de celdas (mediante un código de colores diferente). C) Resultados de los cálculos realizados. D) Exportación de los datos al programa de cálculo. Abreviatura: EC, estadio Carnegie.

## 6. ANÁLISIS DE LOS DATOS

### 6.1. Volumen del SMS

A partir de las áreas calculadas, se ha determinado el volumen del total y de las diferentes partes del SMS tal y como se describe a continuación.

#### 6.1.1 División en tercios del SMS

Las microfotografías de cada embrión se agruparon en tres grupos, según su posición a lo largo del eje anteroposterior. De este modo se definieron los tercios anterior, medio y posterior de cada SMS (Figs. 19 y 20). Si el número total de microfotografías a repartir en los tercios era múltiplo de 3, cada uno contenía idéntico número que los otros tercios; si no lo era, los tercios se incrementaban con más microfotografías de forma equivalente entre ellos, hasta haber conseguido distribuirlos todos (se repartían por orden del tercio anterior al posterior hasta repartir todas). En este último caso el tercio anterior tenía asegurado el incremento, el tercio medio sólo después del anterior y el tercio posterior únicamente cuando el reparto repercutía antes sobre los otros dos (Tabla 5 y Fig. 20).

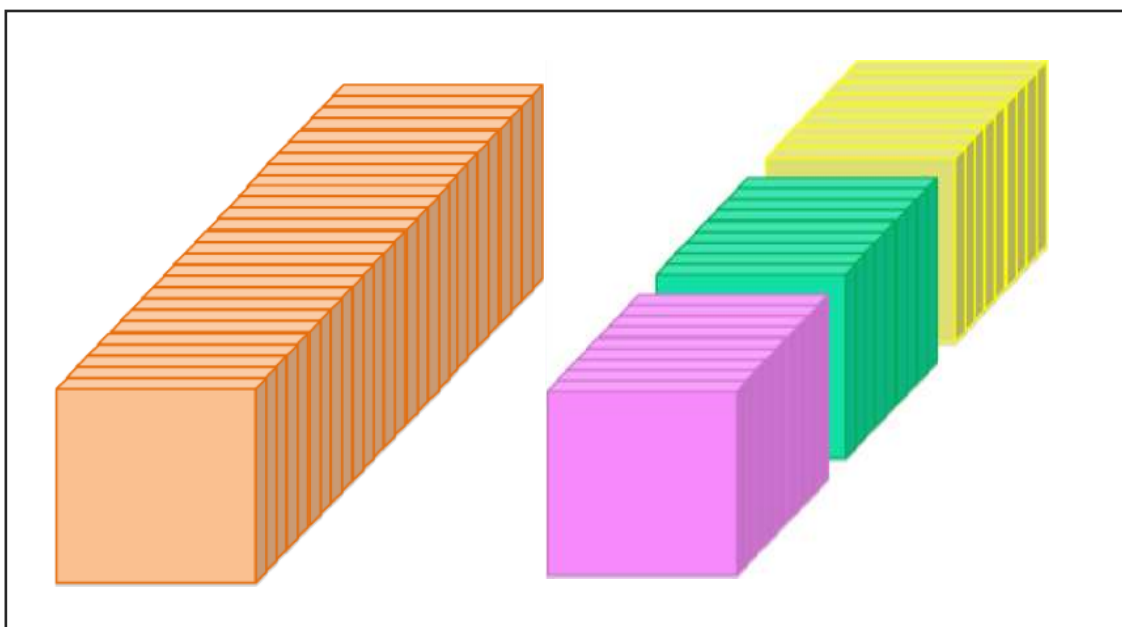


Fig. 19 Representación esquemática de las secciones histológicas que formarían el volumen total del SMS (en la izquierda de color naranja). Su división en los tercios anterior (color rosa), medio (color verde) y posterior (color amarillo) se muestran en el lado derecho.

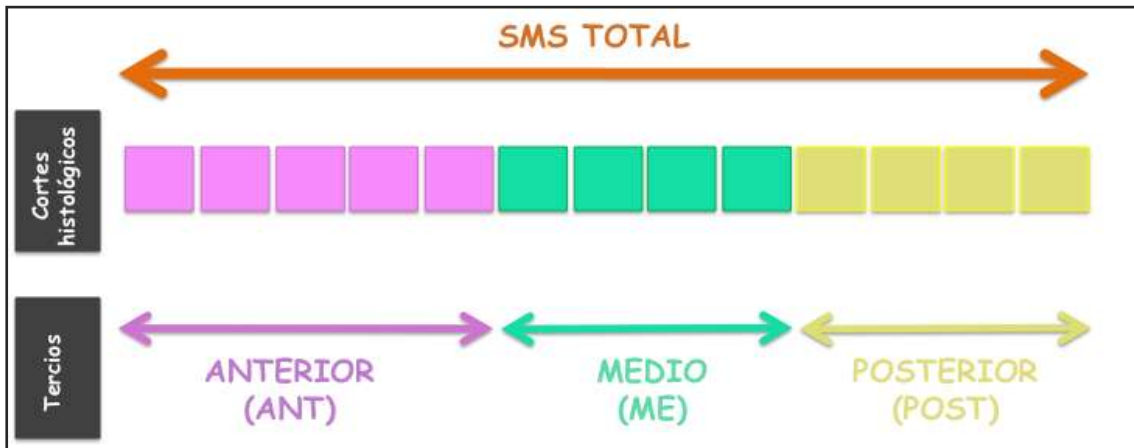


Fig. 20 Representación esquemática de la división en tercios de las secciones histológicas que incluyen al SMS. El número de secciones en este ejemplo no es múltiplo de tres (véase detalles del reparto en el texto anterior).

Tabla 5 Identificación de la sección histológica inicial y final (derecha e/ izquierda) para cada tercio del SMS

		EMBRIÓN													
		EC17		EC18		EC19		EC20		EC21		EC22		EC23	
		DER	IZQ	DER	IZQ	DER	IZQ	DER	IZQ	DER	IZQ	DER	IZQ	DER	IZQ
TERCIOS	ANTERIOR	19-24	19-24	20-25	19-23	27-21	27-21	22-28	23-30	20-26	19-25	17-22	18-24	44-35	44-35
	MEDIO	25-30	25-30	26-30	24-28	20-15	20-15	29-35	31-38	27-33	26-31	23-28	25-30	34-26	34-26
	POSTERIOR	31-36	31-36	31-35	29-32	14-8	14-8	36-42	39-45	34-39	32-37	29-33	31-35	25-17	25-17

Abreviaturas: EC, estadio Carnegie; DER, lado derecho del fragmento del SMS; IZQ, lado izquierdo del fragmento del SMS.

### 6.1.2 División del SMS en territorios

En el SMS se diferenciaron tres territorios (Figs. 21 y 22):

- El territoriomatriz era el comprendido en las celdas A1 y B1.
- El territoriomedial era el comprendido en las celdas incluidas en la columna C y, si era el caso, en las siguientes (D, E, etc.).
- El territorio inferior era el comprendido en las celdas de las columnas A y B, exceptuando las celdas A1 y B1.

Los territorios medial e inferior incluían, según el estado, la totalidad o gran parte de las crestas palatiras en desarrollo. El territoriomatriz correspondía a las celdas que en todos los ejemplares estaban 100% ocupadas por tejido del SMS, tanto en el lado

Abreviaturas del texto: SMS, segmento maxilar seleccionado.

derecho como izquierdo. Recibía el nombre de matriz por ser, presumiblemente, desde donde excéntricamente se produciría el crecimiento de los otros territorios (Fig. 22).

También estos territorios fueron divididos en tercios, con los mismos criterios de división que habíamos utilizado para dividir el SMS (Fig. 23).

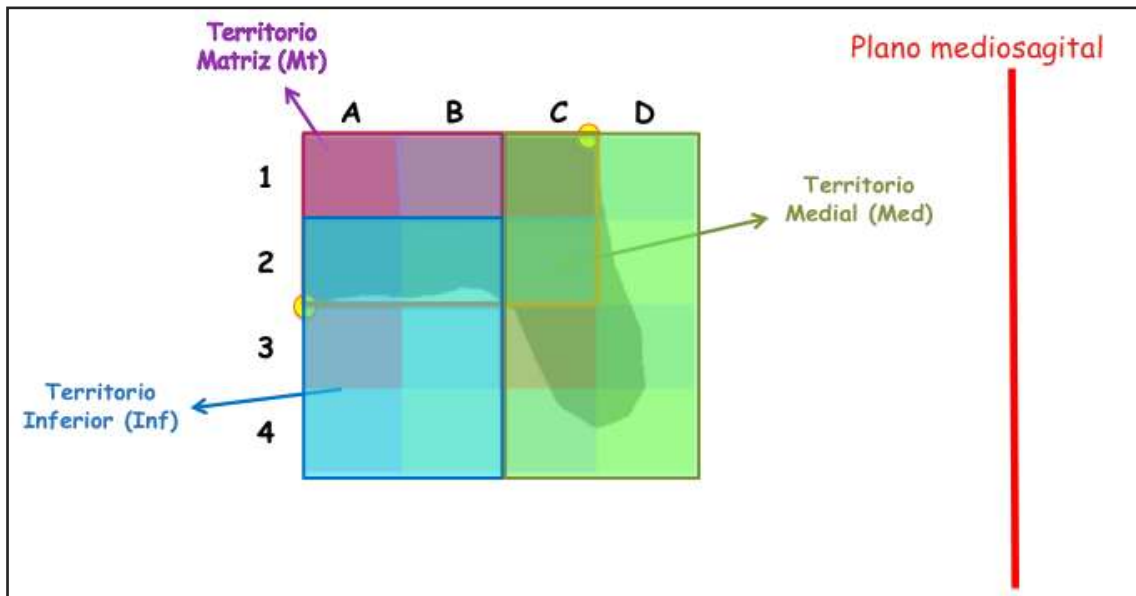


Fig. 21 Microfotografía (objetivo 3'2x) de un corte frontal de la cabeza del embrión EC20 (sección histológica VAL1-37). En ella se observa la gradilla del SMS del fragmento del SMS derecho y sobre ella delimitados los diferentes territorios estudiados: matriz (color violeta), medial (color verde) e inferior (color azul). Abreviatura: EC, estadio Carnegie.

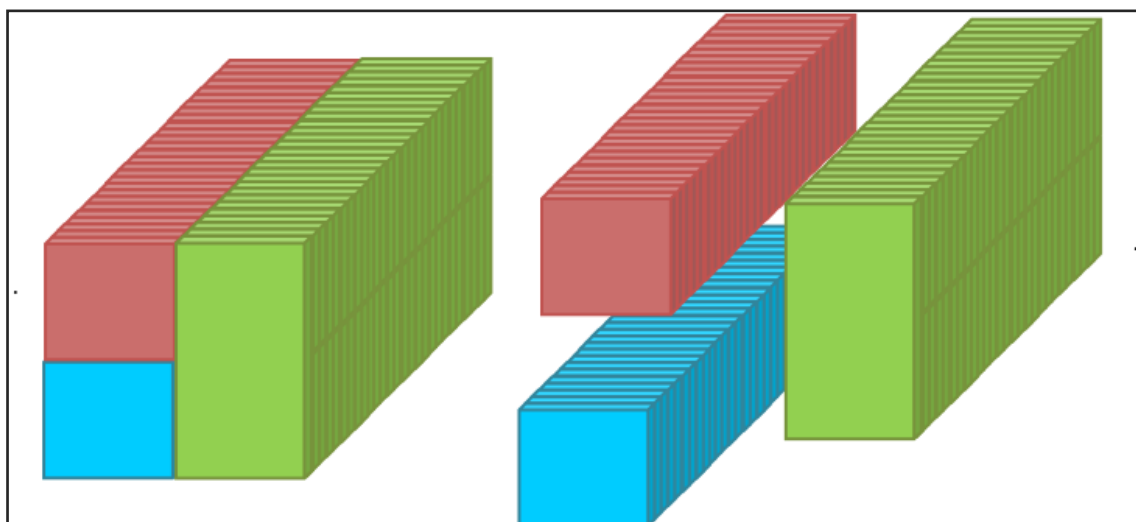


Fig. 22 Esquema de la división del SMS por territorios: territorio medial (color verde), territorio matriz (rojo) y territorio inferior (azul). En la izquierda de la imagen se observa el SMS total dividido por territorios y en la imagen de la derecha separados sus tres territorios.

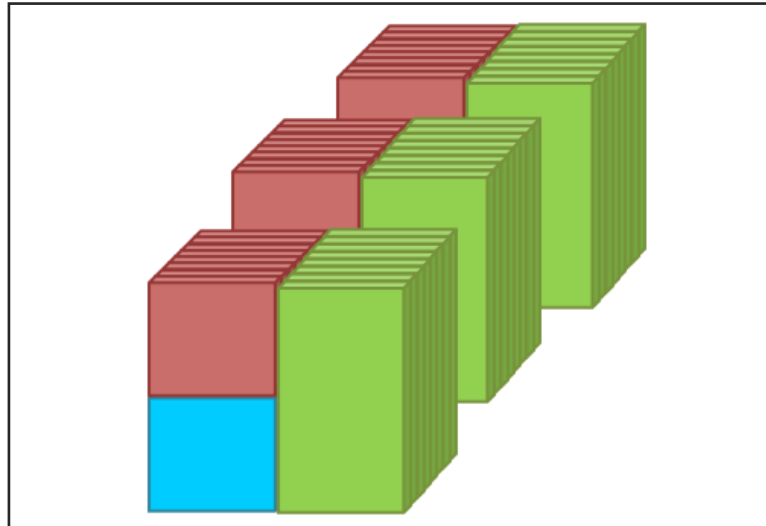


Fig. 23 Esquema de la división del SMS por territorios: territorio medial (color verde), territorio matriz (rojo) y territorio inferior (azul) y tercios: anterior, medio y posterior.

### 6.1.3 Subdivisión del territorio medial

Se ha dividido el territorio medial en dos zonas (Fig. 24):

- La zona medial externa es la comprendida en las celdas de la columna C. Se corresponde con la zona más lateral del territorio medial y por tanto más próxima al territorio matriz.
- La zona medial interna es la comprendida en las celdas a partir de la columna D (incluida) en adelante. Se corresponde con la zona del territorio medial más cercana al plano mediosagital.

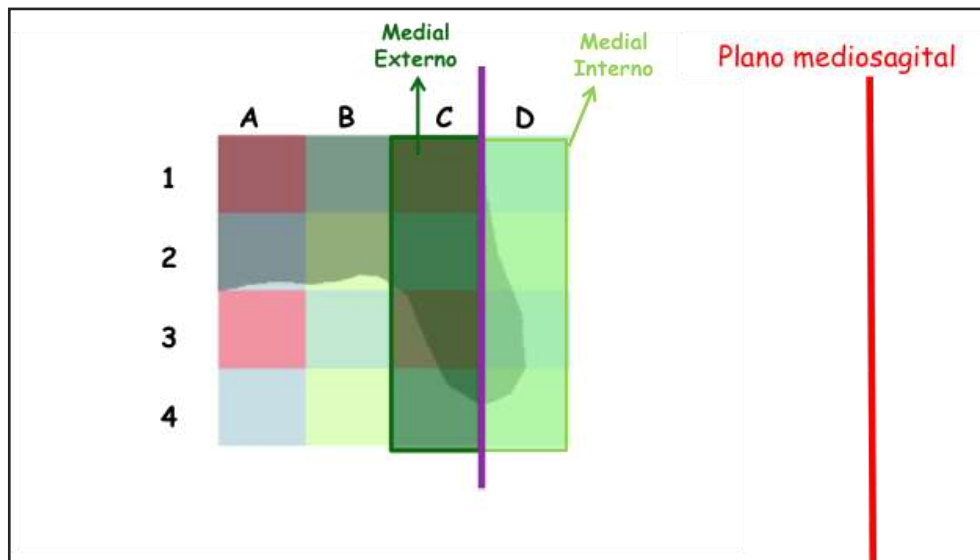


Fig. 24 Microfotografía (objetivo 3'2x) de un corte frontal de la cabeza del embrión EC20 (sección histológica VAL1-37). En ella se observa la gradilla del SMS del fragmento del SMS derecho y sobre ella delimitada la división del territorio medial: la zona medial externa (verde oscuro) y la zona medial interna (verde claro). Abreviatura: EC, estadio Carnegie; SMS, segmento maxilar seleccionado.

*Abreviaturas del texto:* SMS, segmento maxilar seleccionado.



Esta delimitación por cuadrantes y territorios permite poder realizar un análisis espacial de los cambios que suceden en el SMS a lo largo del periodo embrionario estudiado.

## 6.2. Cálculo volumétrico

A partir de las áreas de la parte ocupada por tejido de cada celda (grupo celular) de cada fragmento del SMS, se ha calculado el volumen de las diferentes variables de cada lado por separado. Para el cálculo del volumen ( $\mu\text{m}^3$ ) se ha aplicado el *principio de Cavalieri*.

El *principio de Cavalieri* es una ley geométrica que permite el cálculo eficaz de objetos irregulares y no simétricos cotados mediante secciones paralelas y de igual grosor.

Según este principio matemático –si dos cuerpos tienen la misma altura y bases de igual área, y al cortarlos por cualquier plano paralelo a las bases el área de las secciones es la misma, ambos tienen igual volumen“ (Wikipedia, 2016) (Fig. 25).

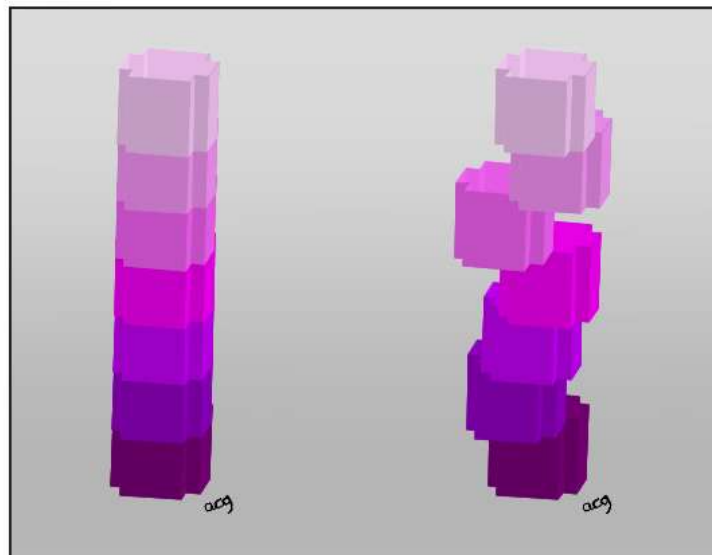


Fig. 25 Esquema ilustrativo del *principio de Cavalieri*. Basado en la imagen [https://es.wikipedia.org/wiki/Principio\\_de\\_Cavalieri](https://es.wikipedia.org/wiki/Principio_de_Cavalieri)

El volumen calculado mediante el *principio de Cavalieri* sería:

$$V = d \times \sum \text{áreas} \times IC$$

donde  $V$  sería el volumen en micras cúbicas ( $\mu\text{m}^3$ ),  $d$  el grosor medio de las secciones histológicas ( $\mu\text{m}$ ),  $\Sigma \text{áreas}$  el sumatorio de las áreas de las secciones histológicas analizadas ( $\mu\text{m}^2$ ) e  $IC$  el intervalo entre las secciones histológicas (selección secuencial).

El grosor de los cortes histológicos se obtuvo mediante la medida de la distancia interfocal desde el nivel focal más superficial hasta el más profundo. Esta medición fue posible por la incorporación al microscopio del microcontrolador (micrómetro) de desplazamiento en el eje z DMX-1 (Mitutoyo®, Tokio, Japan). Una vez obtenida una amplia muestra en distintos cortes histológicos se calculó el valor promedio de un mismo embrión, que fue utilizado posteriormente como grosor medio de ese embrión para los cálculos del volumen (Tabla 3).

Un ejemplo podrá ser el representado en la Figura 26.

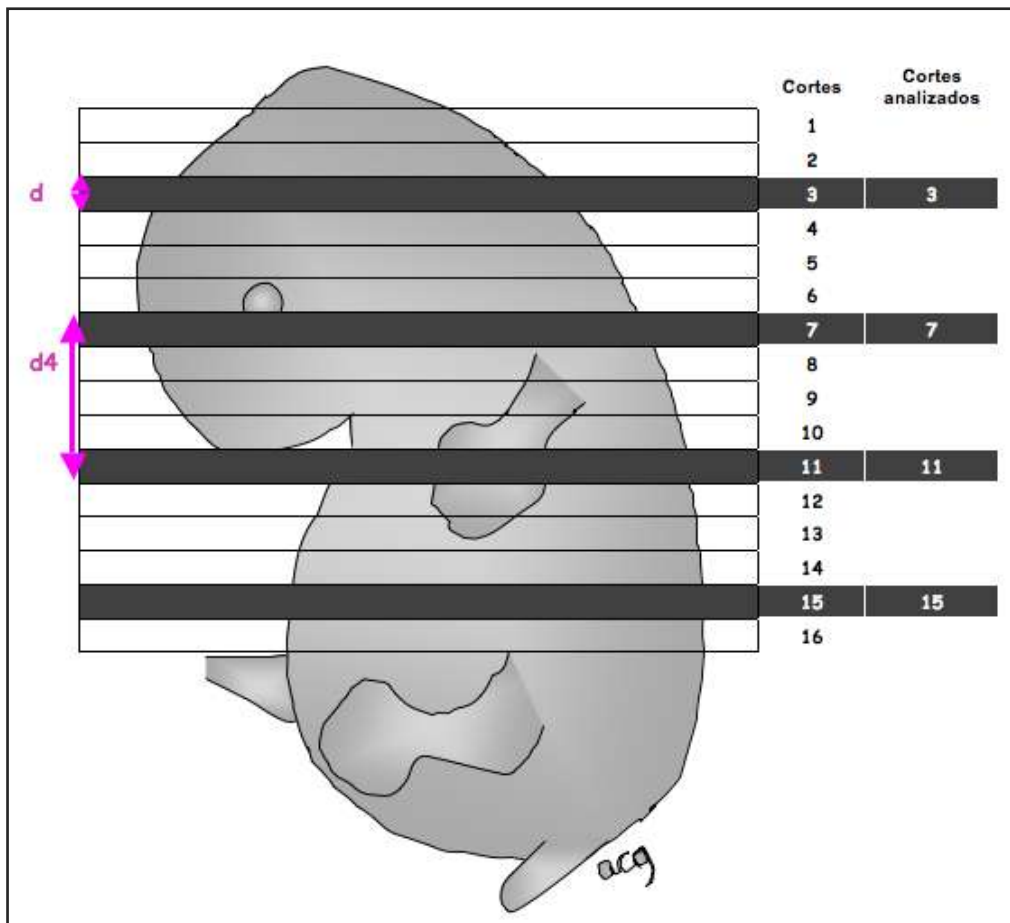


Fig. 26 Esquema de un embrión en el que se representan todas las secciones histológicas realizadas. Las secciones son consecutivas (1-16) con un grosor uniforme ( $d$ ) (véase texto). Las secciones histológicas sombreadas en gris serían las que se habrían analizado en el estudio. Según el tamaño del embrión se determinó una secuencia de análisis de las secciones histológicas (selección secuencial), constante en un mismo embrión (en este caso uno cada 4). A partir de un corte histológico escogido aleatoriamente (entre los primeros 4 cortes en este ejemplo) se habrían ido seleccionando las secciones histológicas a analizar (en este caso como habíamos dicho uno de cada 4). En este ejemplo la distancia entre los cortes histológicos sería  $d \times 4$ . Se analizaba solamente una de las caras de las secciones histológicas. (Basado en el gráfico del artículo de Maythew y Olsen (1991).

### 6.3. Cálculo de promedios

#### 6.3.1 Cálculo de los promedios de los valores estudiados

Una vez todos los volúmenes ( $\mu\text{m}^3$ ) estaban calculados para cada celda, se calculó el valor promedio de los de ambos lados (derecho e izquierdo), siendo éste el utilizado para los análisis de todas las variables. De este modo se evita las diferencias de valores debidos a la asimetría de algunas secciones histológicas.

## 7. PERIODO DE CIERRE DE LA HENDIDURA BUCONASOFARÍNGEA Y SU DIVISIÓN EN INTERVALOS

En el presente trabajo se definen los siguientes conceptos:

- La hendidura buconasofaríngea es el espacio limitado por los puntos de cada fragmento del SMS que están más próximos al plano mediosagital (corresponden a la línea maxilar de cada lado) (Fig. 11).
- El periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea (PCH) es el conjunto de estados embrionarios que comprende el desarrollo de las crestas palatinas (procesos palatinos laterales) derecha e izquierda hasta que éstas se elevan completamente. En nuestro estudio se corresponde con el periodo entre el EC17 y el EC23.
- El intervalo es cada una de las partes del PCH comprendidas entre dos estados embrionarios consecutivos (Fig. 27).
- El intervalo acumulado es el conjunto de intervalos del PCH discurridos desde el EC17 hasta un determinado estado embrionario (Fig. 27).

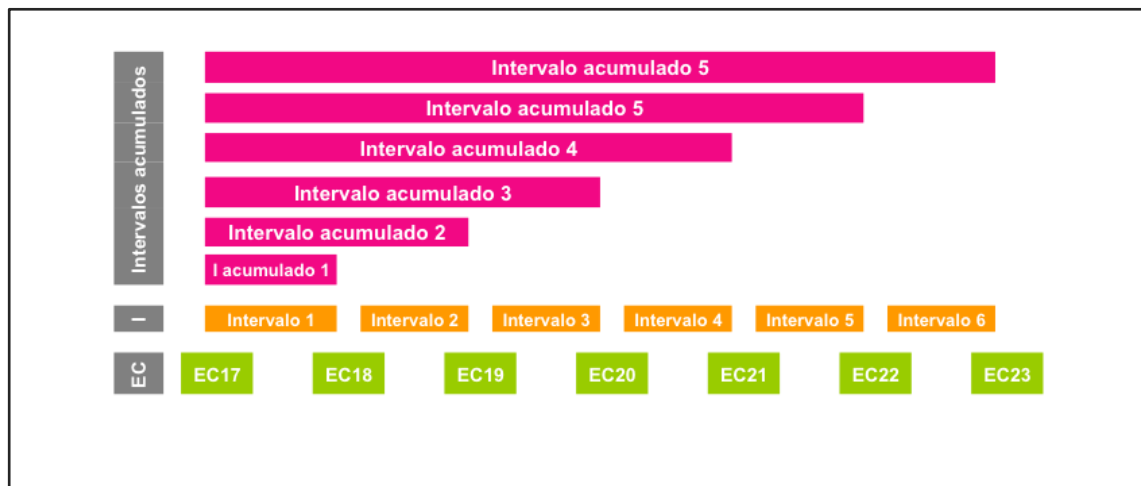


Fig. 27 Esquema de la división del periodo de la hendidura buconasofaríngea en el que se representan los diferentes embriones estudiados (color verde), los intervalos (I) (color naranja) y los intervalos acumulados (color rosado). Abreviatura: EC, estadio Carnegie.

## 8. CÉLCULO DE LAS DIFERENTES VARIABLES

### 8.1. Nomenclatura de las fórmulas

En las fórmulas utilizadas para el cálculo de las diferentes variables de nuestro estudio se ha establecido una sistemática para aportar una información completa de sus características (Tabla 6).

Tabla 6 Nomenclatura de las fórmulas para el cálculo de las diferentes variables

ÍNDICE		SUBÍNDICE - DEFINICIÓN VARIABLE		
Símbolo matemático	Nombre variables	Zona analizada		Cronología
		Específica	[General]	
$b$	P	t	[T]	e
$\bar{X}$	V	T	[SMS]	e-1
$\zeta$	bP	tT	[tT]	pe
	IP	SMS	[tSMS]	ue
		tSMS		i
		Med		a
		NoMed		PCH
		MedExterno		
		MedInterno		

Abreviaturas: a, intervalo acumulado del PCH; e, estadio de Carnegie concreto; e-1, estadio anterior a e; i, intervalo de PCH; IP, índice de proporcionalidad; Med, territorio medial; MedExterno, territorio medial externo; MedInterno, territorio medial interno; NoMed, territorios no medial (matriz e inferior); P, porcentaje de ocupación volumétrica; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; pe, primer e; SMS, segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio; tSMS: tercio del SMS; tT, tercio del territorio; ue, último e; V, volumen;  $\bar{X}$ , promedio; b, incremento del porcentaje de ocupación volumétrica; bP, incremento de porcentaje;  $\zeta$ , desviación estándar.

### 8.2. Volumen del SMS □

Se ha calculado el volumen del SMS y el volumen de sus tercios, en  $\mu\text{m}^3$  (véase apartado 6.2.).

Así mismo se ha analizado el volumen de cada territorio del SMS y de sus tercios.

### 8.3. Distribución porcentual del volumen del SMS entre sus territorios

Se ha calculado el porcentaje de ocupación del volumen de cada territorio (matriz, inferior y medial) respecto al volumen del SMS para cada estadio del PCH ( $P_{T[SMS]e}$ ), a partir de la siguiente fórmula:

$$P_{T[SMS]e} = \frac{V_{Te} \times 100}{V_{SMSe}}$$

donde  $V_{Te}$  es el volumen de un determinado territorio (T) y  $V_{SMSe}$  el volumen del SMS en un determinado estadio (e).

También se ha calculado la distribución de porcentajes del volumen de ocupación de los territorios en los diferentes tercios (anterior, medio y posterior) del SMS para cada estadio del PCH ( $P_{tT[SMS]e}$ ), a partir de la siguiente fórmula:

$$P_{tT[SMS]e} = \frac{V_{tTe} \times 100}{V_{tSMSe}}$$

donde  $V_{tTe}$  es el volumen que ocupa en un tercio concreto un determinado territorio (tT) y  $V_{tSMSe}$  el volumen de este tercio del SMS en un determinado estadio (e).

#### 8.3.1. Diferencias de la distribución porcentual del volumen del SMS en los intervalos del PCH

Mediante las siguientes fórmulas se ha calculado el crecimiento (incremento ( $\Delta$ ) positivo) o disminución (incremento negativo) que se ha producido en el porcentaje de ocupación (total) del volumen de cada territorio (T) respecto a la variación del volumen (total) del SMS en cada intervalo (i) del PCH ( $\Delta P_{T[SMS]i}$ ). Estos cambios porcentuales también se han calculado considerando la ocupación del volumen de cada territorio en cada tercio (t) del SMS en los diferentes intervalos ( $\Delta P_{tT[SMS]i}$ ).

---

*Abreviaturas del texto:* e, un estadio Carnegie determinado; i, intervalo del PCH; P, porcentaje de ocupación volumétrica; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio; tSMS, tercio del segmento maxilar seleccionado; tT, tercio del territorio; V, volumen.

$$\Delta P_{T[SMS]i} = P_{T[SMS]e} - P_{T[SMS]e-1}$$

$$\Delta P_{tT[tSMS]i} = P_{tT[tSMS]e} - P_{tT[tSMS]e-1}$$

donde  $P_{T[SMS]e}$  y  $P_{T[SMS]e-1}$  son los valores de los porcentajes de ocupación del volumen de un territorio (T) en un estadio (e) y en el estadio previo (e-1) del intervalo (i) del PCH, respectivamente, y donde  $P_{tT[tSMS]e}$  y  $P_{tT[tSMS]e-1}$  son los valores de los porcentajes de ocupación del volumen de un determinado territorio en un tercio concreto (tT) del SMS en un estadio (e) y en el estadio (e-1) del intervalo (i) del PCH, respectivamente.

### 8.3.2 Índice de proporcionalidad entre las diferencias del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial y el equivalente de los otros territorios del SMS en los intervalos del PCH

Se ha calculado el índice de proporcionalidad (IP) entre el valor absoluto del incremento, en cada intervalo (i) del PCH, del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial (Med) y el correspondiente incremento de cada uno de los otros territorios (NoMed: inferior o matriz), respecto al volumen del SMS ( $IP \Delta P_{(Med-NoMed)[SMS]i}$ ). También se ha calculado este índice de proporcionalidad entre el valor absoluto del incremento, en cada intervalo (i) del PCH, del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial (Med) en un determinado tercio (t) y el correspondiente incremento de cada uno de los otros territorios (NoMed: inferior o matriz), respecto al volumen del total de dicho tercio del SMS ( $IP \Delta P_{t(Med-NoMed)[tSMS]i}$ ), mediante las siguientes fórmulas:

$$IP \Delta P_{(Med-NoMed)[SMS]i} = \frac{|\Delta P_{Med[SMS]i}|}{|\Delta P_{NoMed[SMS]i}|}$$

□

$$IP \Delta P_{t(Med-NoMed)[tSMS]i} = \frac{|\Delta P_{tMed[tSMS]i}|}{|\Delta P_{tNoMed[tSMS]i}|}$$

donde  $|\Delta P_{Med[SMS]i}|$  es el incremento, durante un intervalo (i) del PCH, del porcentaje de ocupación de la totalidad del volumen del territorio medial (Med), mientras que  $|\Delta P_{NoMed[SMS]i}|$  es la variación equivalente en alguno de los otros territorios (inferior o matriz); y donde  $|\Delta P_{tMed[tSMS]i}|$  es el incremento, durante un intervalo (i) del PCH, del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial en un determinado tercio del

SMS y  $|\Delta P_{tNoMed[tSMS]}|$  corresponde al cambio porcentual de alguno de los otros territorios (inferior o matriz) en el mismo tercio todas estas variables calculadas en valores absolutos.

### 8.3.3. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen de los tercios de los territorios del SMS

A partir de los porcentajes de ocupación del volumen por tercios de los diferentes territorios respecto al volumen del SMS en cada estadio del PCH, se ha calculado la media y la desviación estándar.

### 8.3.4. Diferencias de la distribución porcentual por tercios del volumen del SMS durante el PCH

Mediante las siguientes fórmulas se ha calculado el incremento (positivo o negativo) del porcentaje de distribución del volumen de cada territorio respecto al volumen del SMS que ha ocurrido durante todo el PCH ( $\Delta P_{T[SMS]PCH}$ ), así como este mismo incremento respecto al volumen de los tercios del SMS ( $\Delta P_{tT[SMS]PCH}$ ):

$$\Delta P_{T[SMS]PCH} = P_{T[SMS]ue} - P_{T[SMS]pe}$$

$$\square \quad \Delta P_{tT[SMS]PCH} = P_{tT[SMS]ue} - P_{tT[SMS]pe}$$

donde  $P_{T[SMS]ue}$  y  $P_{T[SMS]pe}$  son los valores de los porcentajes de ocupación de un territorio (T) en el último (ue) y primer estadio (pe) del PCH, respectivamente; y donde  $P_{tT[SMS]ue}$  y  $P_{tT[SMS]pe}$  son los valores de los porcentajes de ocupación de un determinado territorio en un tercio concreto (tT) del SMS en el último (ue) y primer estadio (pe) del PCH, respectivamente.

---

*Abreviaturas del texto:* e, un estadio Carnegie determinado; e-1, estadio anterior a un estadio Carnegie determinado; EC, estadio Carnegie; i, intervalo del PCH; IP, índice de proporcionalidad; P, porcentaje de ocupación volumétrica; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; pe, primer estadio Carnegie estudiado o estadio umbral; SMS, segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio; tSMS, tercio del segmento maxilar seleccionado; tT, tercio del territorio; ue, último estadio Carnegie estudiado; V, volumen.



## 8.3.5. Porcentajes de ocupación del volumen en las partes del territorio medial

Se ha determinado el porcentaje de ocupación del volumen de las partes del territorio medial respecto al volumen del SMS durante el PCH. Esta variable relativa al territorio medial externo ( $P_{MedExterno[SMS]e}$ ) y medial interno ( $P_{MedInterno[SMS]e}$ ) se ha calculado a partir de las siguientes fórmulas:

$$P_{MedExterno[SMS]e} = \frac{V_{MedExterno e} \times 100}{V_{SMS e}}$$

□

$$P_{MedInterno[SMS]e} = \frac{V_{MedInterno e} \times 100}{V_{SMS e}}$$

donde  $V_{MedExterno e}$  es el volumen del territorio medial externo,  $V_{MedInterno e}$  es el volumen del territorio medial interno y  $V_{SMS e}$  el volumen del SMS, en un determinado estado embrionario(e).

También se ha calculado la distribución del porcentaje de ocupación del volumen de las partes del territorio medial respecto a los diferentes tercios del SMS durante el PCH. Esta variante relativa al territorio medial externo ( $P_{tMedExterno[SMS]e}$ ) y medial interno ( $P_{tMedInterno[SMS]e}$ ) se ha calculado a partir de las siguientes fórmulas:

$$P_{tMedExterno[tSMS]e} = \frac{V_{tMedExterno e} \times 100}{V_{tSMS e}}$$

□

$$P_{tMedInterno[tSMS]e} = \frac{V_{tMedInterno e} \times 100}{V_{tSMS e}}$$

donde  $V_{tMedExterno e}$  es el volumen del tercio (t) del territorio medial externo,  $V_{tMedInterno e}$  es el volumen del tercio (t) del territorio medial interno y  $V_{tSMS e}$  el volumen del tercio del SMS, en un determinado estado embrionario(e).

### 8.3.6. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen de las partes del territorio medial respecto al SMS

A partir de los porcentajes de ocupación del volumen total y por tercios de las partes del territorio medial respecto al volumen del SMS durante el PCH, se ha calculado la media y la desviación estándar, relativa al territorio medial externo y medial interno.

### 8.4. Distribución porcentual del volumen de los territorios del SMS entre sus tercios

Se ha calculado la distribución, en cada estadio del PCH, del porcentaje de ocupación del volumen del tercio de un territorio del SMS respecto el volumen de ese territorio ( $P_{t[T]e}$ ), a partir de la siguiente fórmula:

$$P_{t[T]e} = \frac{V_{te} \times 100}{V_{Te}}$$

donde  $V_{tTe}$  es el volumen del tercio (t) de un determinado territorio (T) y  $V_{Te}$  el volumen (total) de un determinado territorio del SMS, en un determinado estadio embrionario (e).

#### 8.4.1. Diferencias de la distribución porcentual del volumen de cada territorio del SMS entre sus tercios en los intervalos del PCH

Se ha calculado el crecimiento (incremento ( $\Delta$ ) positivo) o disminución (incremento ( $\Delta$ ) negativo) que se ha producido del porcentaje de ocupación del volumen de cada territorio (T) dividido por tercios (t) respecto al volumen de cada territorio del SMS en cada intervalo (i) del PCH ( $P_{t[T]i}$ ), mediante las siguientes fórmulas:

$$\Delta P_{t[T]i} = P_{t[T]e} - P_{t[T]e-1}$$

□

---

*Abreviaturas del texto:* e, un estadio Carnegie determinado; e-1, estadio anterior a un estadio Carnegie determinado; EC, estadio Carnegie; i, intervalo del PCH; IP, índice de proporcionalidad; Inf, territorio inferior; Med, territorio medial; MedExterno, territorio medial externo; MedInterno, territorio medial interno; NoMed, territorios no medial, es decir, los territorios matriz e inferior; P, porcentaje de ocupación volumétrica; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio; tSMS, tercio del segmento maxilar seleccionado; tT, tercio del territorio; V, volumen.

donde  $P_{t[T]e}$  es el valor del porcentaje de ocupación del volumen del tercio del territorio respecto al volumen total del mismo en un estadio del intervalo (e) y  $P_{t[T]e-1}$  es el valor del volumen del tercio del territorio en el estadio previo (e-1) del PCH.

#### 8.4.2 Índice de proporcionalidad entre las diferencias del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial y el equivalente de los otros territorios en los intervalos del PCH

Se ha calculado el índice de proporcionalidad (IP) entre el valor absoluto del incremento, en cada intervalo del PCH, del porcentaje de ocupación del volumen del tercio de cada territorio (tT) respecto al volumen del territorio medial (Med) y el correspondiente incremento de cada uno de los otros territorios (NoMed: inferior o matriz) respecto al volumen total del territorio en cada intervalo (i) del PCH ( $IP_{\Delta P_{t(Med-NoMed)[T]i}}$ ), mediante las siguientes fórmulas:

$$IP_{\Delta P_{t(Med-NoMed)[T]i}} = \frac{|\Delta P_{tMed}[T]i|}{|\Delta P_{tNoMed}[T]i|}$$

donde  $|\Delta P_{tMed}[T]i|$  es el incremento, durante un intervalo (i) del PCH, del porcentaje de ocupación del tercio del volumen del territorio medial (Med) respecto el volumen total del territorio medial; mientras que  $|\Delta P_{tNoMed}[T]i|$  es la variación equivalente en alguno de los otros territorios (inferior o matriz). Ambos calculados en valores absolutos.

#### 8.4.3. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen por tercios respecto el volumen de los diferentes territorios del SMS

A partir de los porcentajes de ocupación del volumen por tercios de los diferentes territorios respecto al volumen del territorio correspondiente en cada estadio del PCH, se ha calculado la media y la desviación estándar.

#### 8.4.4. Diferencias de la distribución porcentual por tercios del volumen de los diferentes territorios del SMS durante el PCH

Se ha calculado el incremento (positivo o negativo) del porcentaje de distribución volumétrica de cada tercio respecto al volumen total del territorio que ha ocurrido durante todo el PCH ( $\Delta P_{t[T]PCH}$ ), mediante las siguientes fórmulas:

$$\Delta P_{t[T]PCH} = P_{t[T]ue} - P_{t[T]pe}$$

donde  $P_{tT[T]ue}$  y  $P_{tT[T]pe}$  son los valores de los porcentajes de ocupación de un tercio de un territorio (tT) respecto al volumen de ese territorio (T), en el último (ue) y primer estadio (pe) del PCH, respectivamente.

---

*Abreviaturas del texto:* e, un estadio Carnegie determinado; e EC, estadio Carnegie; i, intervalo del PCH; IP, índice de proporcionalidad; Med, territorio medial; Mt, territorio matriz; NoMed, territorios no medial, es decir, los territorios matriz e inferior; P, porcentaje de ocupación volumétrica; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; pe, primer estadio Carnegie estudiado o estadio umbral; SMS, segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio; tSMS, tercio del segmento maxilar seleccionado; tT, tercio del territorio; ue, último estadio Carnegie estudiado; V, volumen.



# Resultados





---

## 9. EMBRIOLOGÍA DESCRIPTIVA

Para ilustrar los cambios morfológicos acontecidos durante el PCH se muestran...

- a) las microfotografías de las secciones histológicas representativas de cada tercio del SMS, así como de las reconstrucciones faciales de los distintos embriones (Fig. 28).
- b) las imágenes de las líneas maxilares de cada embrión superpuestas (Fig. 29), las cuales permiten tener una visión objetiva en cada embrión estudiado de la hendidura buconasofaríngea que es el espacio limitado por los puntos de cada fracción del SMS (izquierda y derecha) más próximos al plano mediosagital, así como parte de las crestas palatiras.
- c) las imágenes de las zonas de tejido que se han valorado cuantitativamente en el SMS –junto con las gradillas del SMS (Anexo 2).



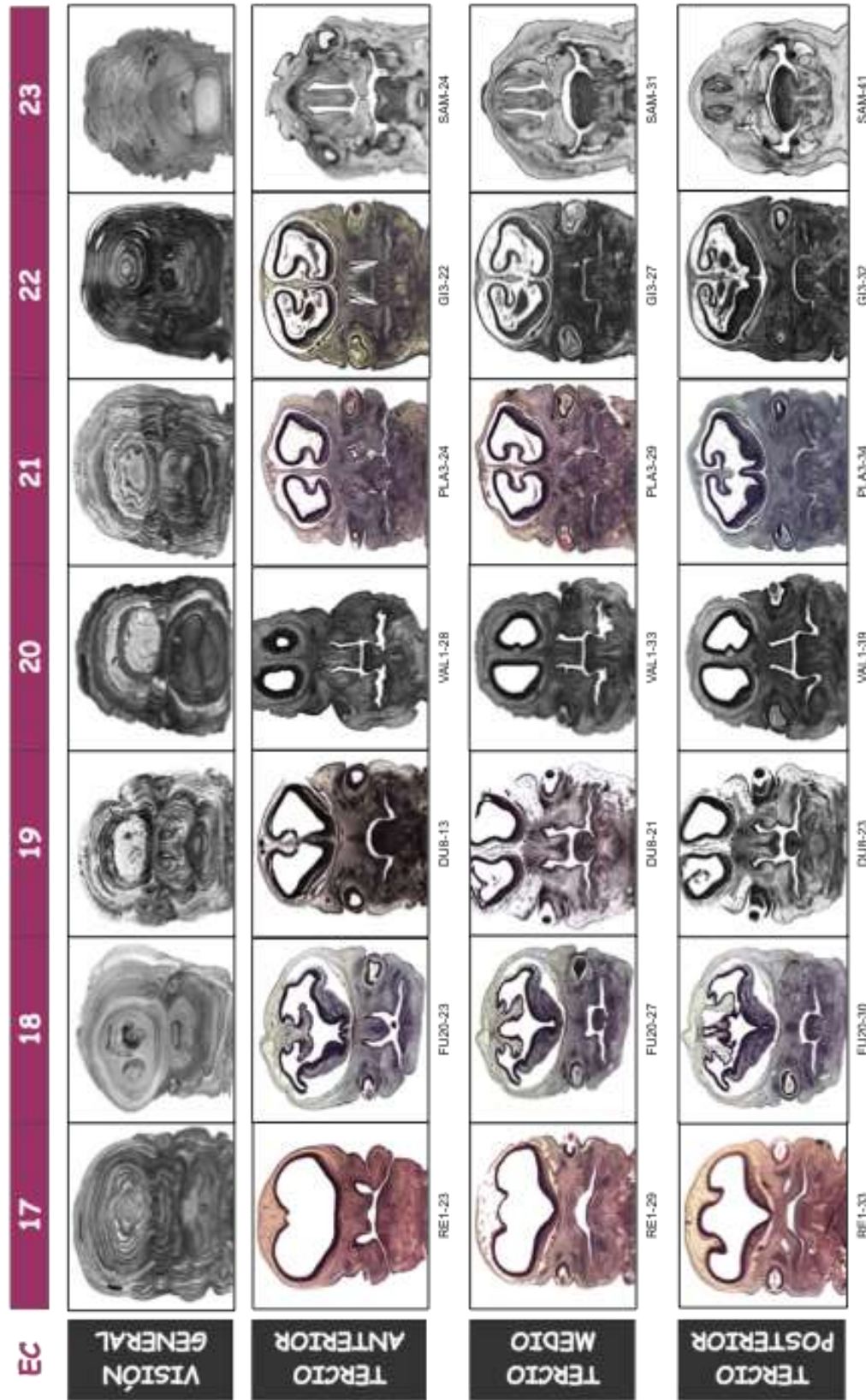


Fig. 28 Microfotografías (objetivo 3'2x) de cortes frontales de las cabezas de los embriones estudiados en el presente estudio. En esta figura se observa en la primera fila las reconstrucciones de todas las microfotografías de las cabezas de los embriones, en la segunda fila las microfotografías representativas del tercio anterior del SMS para cada EC, en la tercera fila las microfotografías representativas del tercio medio del SMS para cada EC y en la cuarta fila las microfotografías representativas del tercio posterior del SMS para cada EC. Abreviatura: EC, estadio Carnegie; SMS, segmento maxilar seleccionado.

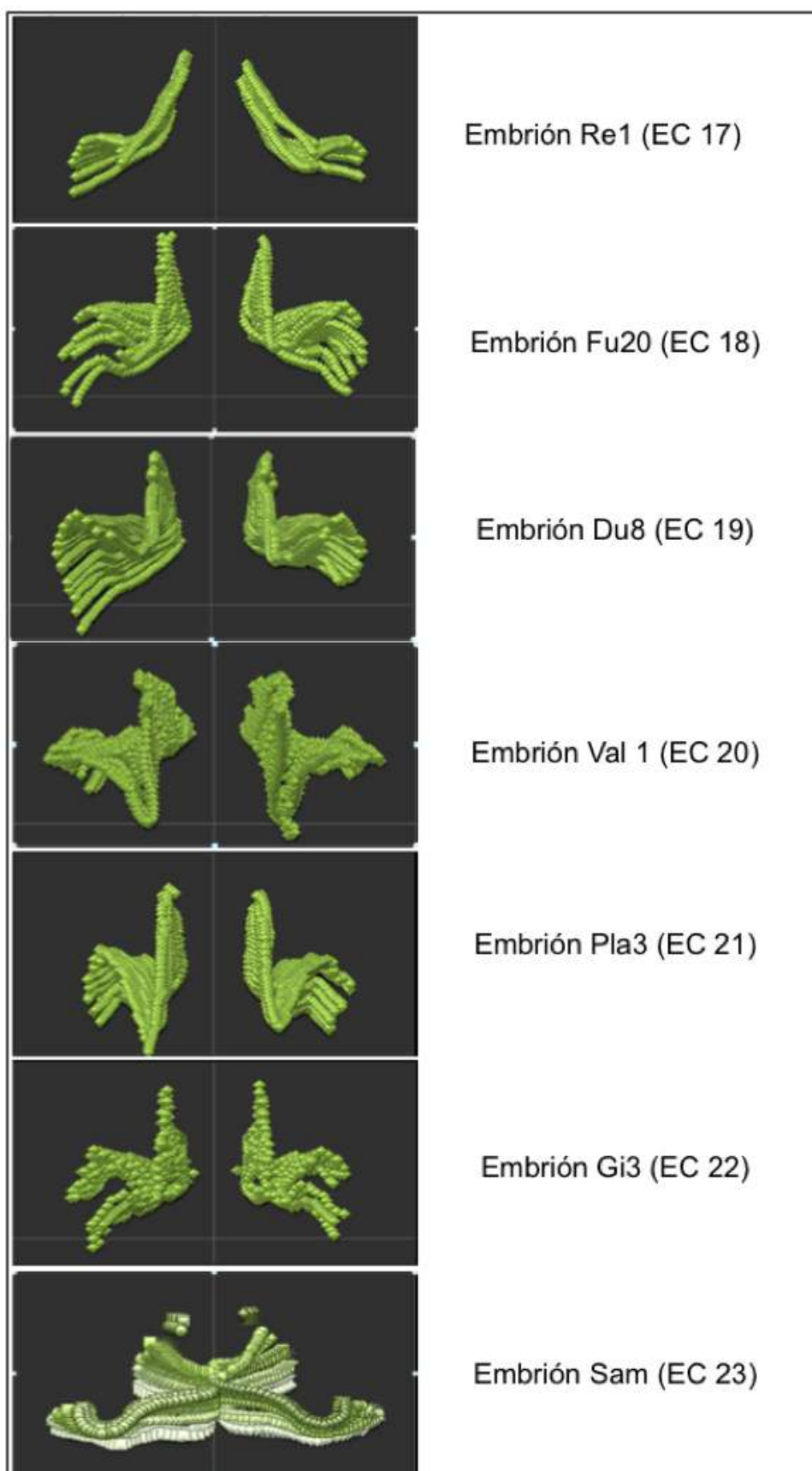


Fig. 29 Líneas maxilares de ambos lados superpuestas. Permite apreciar la hendidura buconasofaríngea y, en parte, las crestas palatinas. El plano mediosagital se ha representado en el centro de cada imagen. Cada imagen tiene una escala propia (se incrementa con el estadio de cada embrión). Vista anterior. Abreviatura: EC, estadio Carnegie.

## 10. VOLUMEN DEL SMS

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 30 a 33 y los valores se pueden consultar en el Anexo 1.

Al analizar el volumen (total) del segmento maxilar seleccionado (SMS) en los diferentes embriones, destaca un aumento progresivo del volumen con un ascenso más marcado en el último estadio (EC23) (Fig. 30A).

Al analizar el volumen (total) de los distintos territorios del SMS, destaca un aumento progresivo en los tres territorios con un crecimiento más marcado en el último estadio (EC23), siendo en éste el territorio medial el que mayor volumen presenta (Fig.30B).

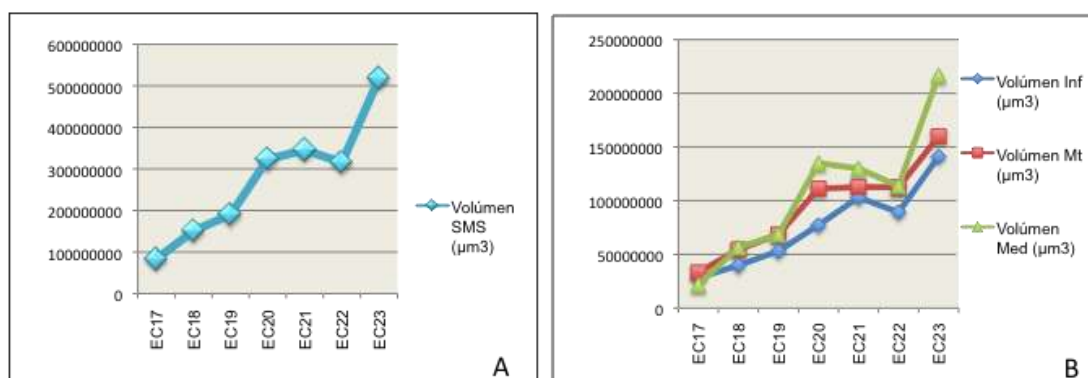


Fig. 30 Volumen total del SMS. A) Volumen total del SMS. B) Volumen del SMS (total) dividido en territorios. Abreviaturas: EC, estadio Carnegie; Inf, territorio inferior; Med, territorio medial; Mt, territorio matriz.

Al analizar el volumen del tercio anterior del SMS durante el PCH, destaca:

1. Unos valores claramente mayores en el cuarto (EC20), quinto (EC21) y sexto estadio embrionario (EC22) que en el resto, tanto al analizar el volumen total del tercio del SMS como al hacerlo dividido por territorios (Figs. 31A y 31B).
2. Un mayor volumen constante en el territorio medial que en el territorio inferior (Fig. 31B).
3. En ambos casos el menor valor se observa en el último estadio (EC23) (Figs. 31A y 31B).

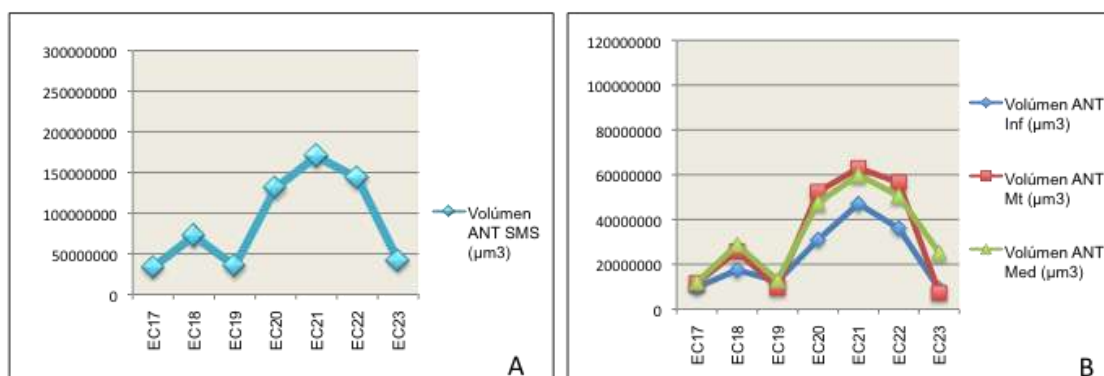


Fig. 31 Volumen en el tercio anterior del SMS. A) Volumen del tercio anterior del SMS. B) Volumen del tercio anterior del SMS dividido en territorios. Abreviaturas: ANT, tercio anterior; EC, estadio Carnegie; Inf, territorio inferior; Med, territorio medial; Mt, territorio matriz

Al analizar el volumen del tercio medio del SMS durante el PCH, destaca:

1. un aumento del volumen con un ascenso más marcado en el último estadio (EC23), al analizarlo en su totalidad (Fig. 32A).
2. un volumen del territorio medial muy superior a los otros territorios a partir del cuarto estadio (EC20) y con mayor ascenso en el último estadio (EC23) (Fig. 32B).

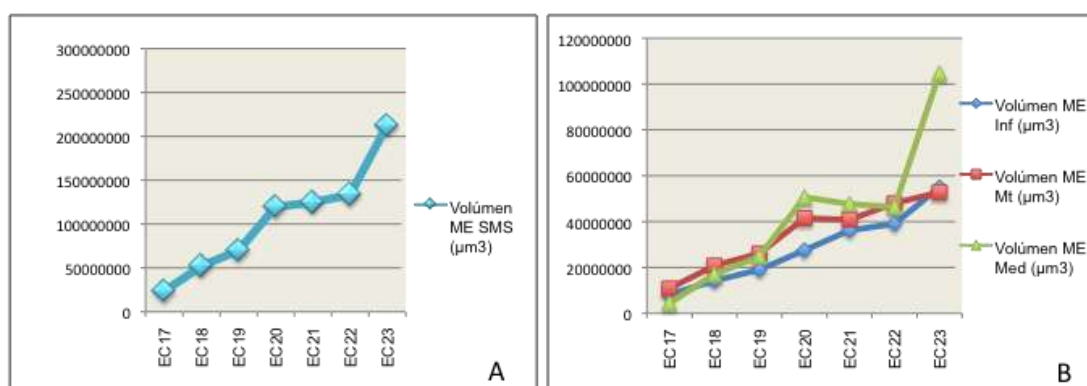


Fig. 32 Volumen en el tercio medio del SMS. A) Volumen del tercio medio del SMS. B) Volumen del tercio medio del SMS dividido en territorios. Abreviaturas: EC, estadio Carnegie; Inf, territorio inferior; ME, tercio medio; Med, territorio medial; Mt, territorio matriz.

Al analizar el volumen del tercio posterior del SMS durante el PCH, destaca:

1. un aumento del volumen con un ascenso muy marcado en el último estadio (EC23), tanto al analizar el volumen total del tercio del SMS como al hacerlo dividido por territorios (Figs. 33A y 33B).

Abreviaturas del texto: EC, estadio Carnegie; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.

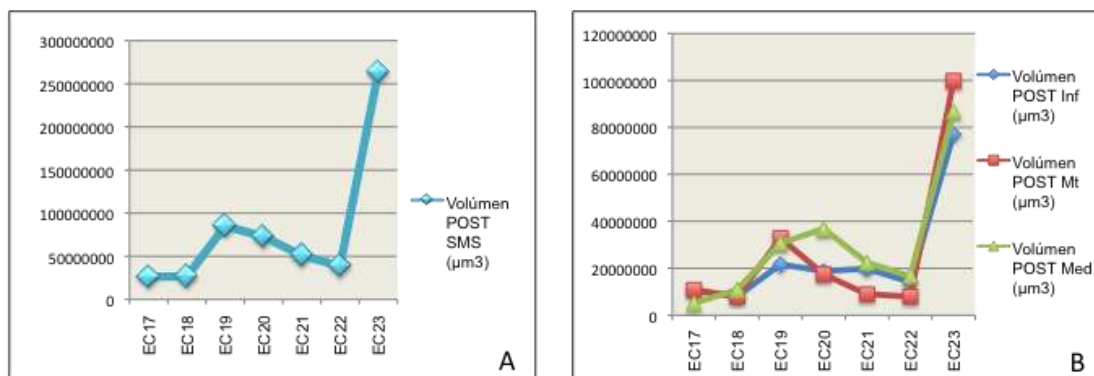


Fig. 33 Volumen en el tercio posterior del SMS. A) Volumen del tercio posterior del SMS. B) Volumen del tercio posterior del SMS dividido en territorios. Abreviaturas, EC, estadio Carnegie; Inf, territorio inferior; Med, territorio medial; Mt, territorio matriz; POST, tercio posterior.

## 11. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL VOLUMEN DEL SMS ENTRE SUS TERRITORIOS

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 34B, 35B, 36B y 37B.

De los valores de los porcentajes de ocupación del volumen de cada territorio respecto al volumen del SMS, destaca que a partir del segundo estadio del PCH (EC18):

1. el mayor porcentaje corresponde al territorio medial, mientras que el menor al territorio inferior –porcentajes respecto al volumen de la totalidad del SMS– (Fig. 34B).
2. el porcentaje por tercios del territorio medial es superior al del territorio inferior, aunque no siempre es el mayor valor o porcentaje respecto al volumen del tercio del SMS correspondiente– (Figs. 35B, 36B y 37B).

### 11.1. Diferencias de la distribución porcentual del volumen del SMS en los intervalos del PCH

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 34A, 35A, 36A y 37A).

De las diferencias del porcentaje de ocupación del volumen de los diferentes territorios respecto al volumen (total) del SMS en cada intervalo del PCH, destaca:

1. un incremento marcado del territorio medial en el primer (iEC 17-18), tercer (iEC 19-20) y último intervalo del PCH (iEC 22-23), que se corresponde con una disminución de los territorios inferior y matriz (Fig. 34A).



2. un crecimiento del territorio medial inverso al del territorio inferior en todos los intervalos (si aumenta medial disminuye inferior y viceversa), excepto en el quinto intervalo (iEC21-22) donde el signo del cambio es coincidente entre los territorios medial e inferior (Fig. 34A).

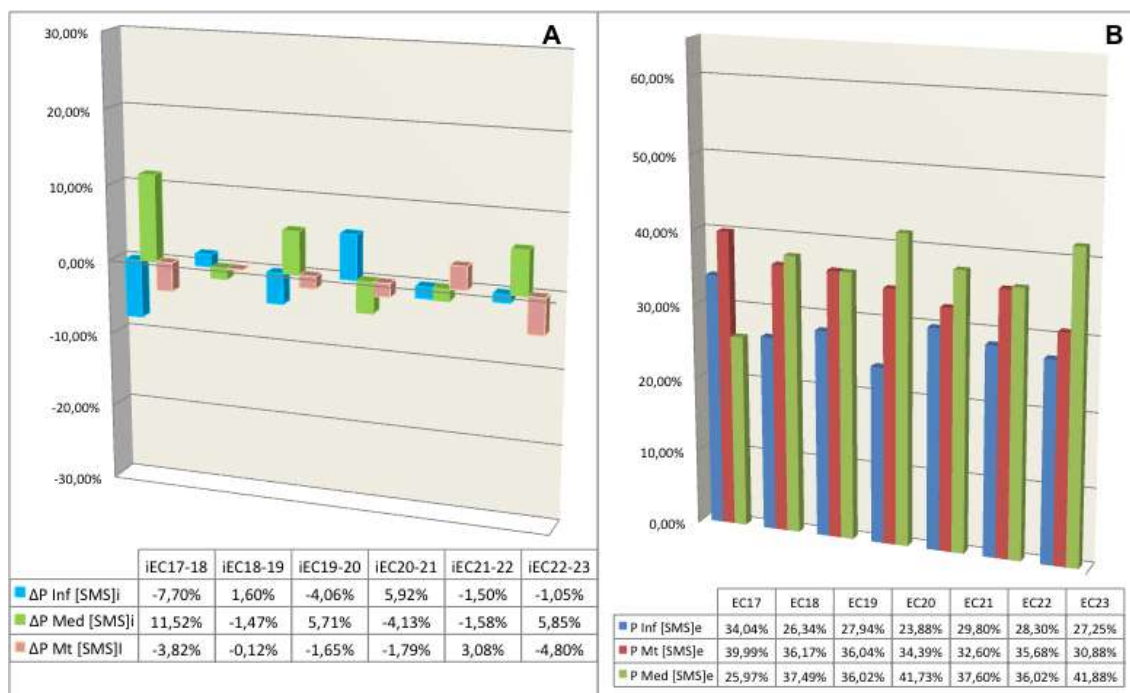


Fig. 34 Distribución porcentual total del volumen del SMS. A) Diferencias de la distribución porcentual de los diferentes territorios respecto al volumen del SMS en los intervalos del PCH ( $bP_{T[SMS]i}$ ). B) Distribución en cada estadio del porcentaje de ocupación de los diferentes territorios respecto al total del SMS ( $P_{T[SMS]e}$ ). Abreviaturas, EC, estadio Carnegie; Inf, territorio inferior; Med, territorio medial; Mt, territorio matriz; PCH, periodo de cierre de la hendidura bucofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado; T, territorio.

Al compararlas diferencias del porcentaje de ocupación del volumen de los diferentes territorios en cada tercio, respecto al volumen del correspondiente tercio del SMS en cada intervalo del PCH, destaca:

1. en el tercio anterior:

1.1 un marcado incremento del territorio medial en el último intervalo (iEC22-23), mientras que los territorios matriz e inferior presentan un decremento (Fig. 35A).

1.2 un segundo incremento del territorio medial respecto al territorio inferior en el primer intervalo (iEC17-18), pero que representa aproximadamente una séptima parte del incremento obtenido en el último intervalo (Fig. 35A).

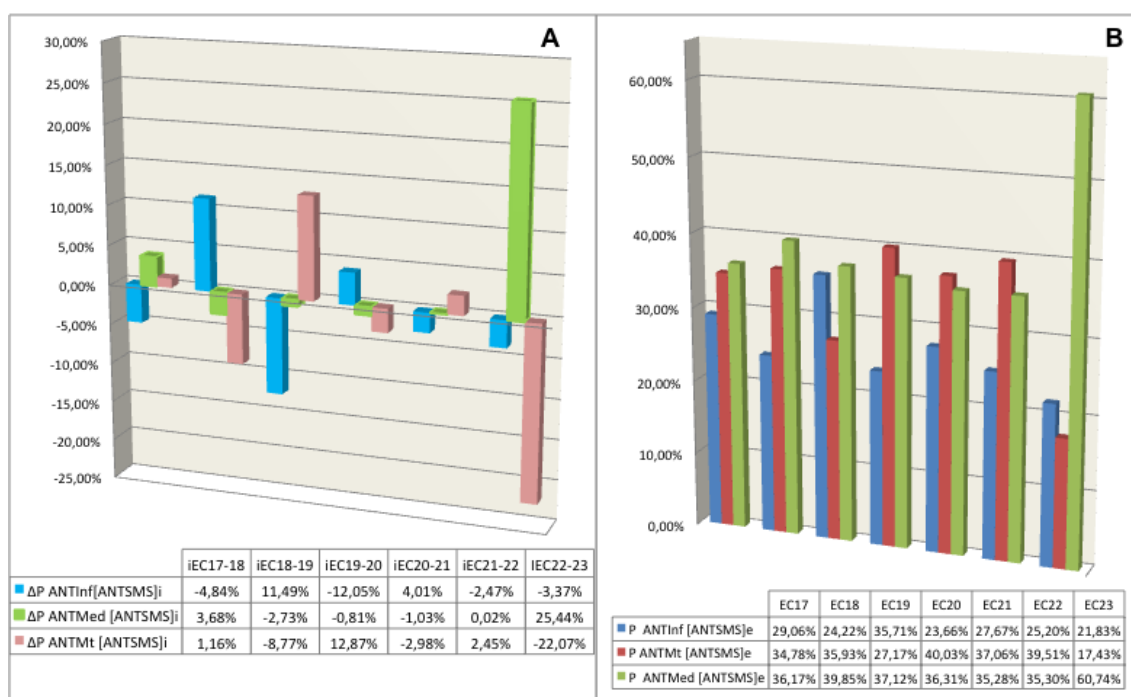


Fig. 35 Distribución porcentual en el tercio anterior del volumen del SMS. A) Diferencias de la distribución porcentual de los diferentes territorios respecto el volumen del tercio anterior del SMS en los intervalos del PCH ( $\Delta P_{ANTT[ANTSMS]i}$ ). B) Distribución en cada estadio del porcentaje de ocupación de los diferentes territorios respecto al tercio anterior del SMS ( $P_{ANTT[ANTSMS]e}$ ). Abreviaturas, ANT, tercio anterior; EC, estadio Carnegie; Inf, territorio inferior; Med, territorio medial; Mt, territorio matriz; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio; tSMS, tercio del SMS.

2. en el tercio medio:

2.1 un marcado crecimiento del territorio medial en el primer (iEC17-18), tercer (iEC19-20) y último intervalo del PCH (iEC22-23), mientras que disminuyen los territorios inferior y matriz (Fig. 36A).

2.2 Un porcentaje de ocupación del territorio inferior inverso al medial, en el resto de intervalos (Fig. 36A).

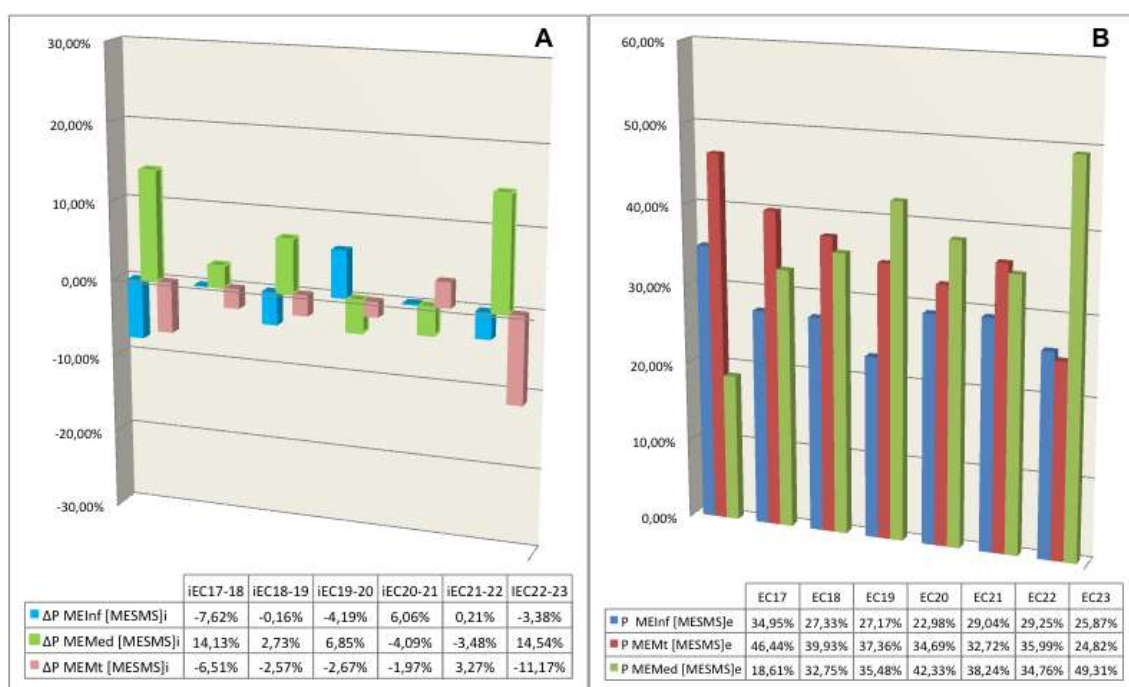


Fig. 36 Distribución porcentual en el tercio medio del volumen del SMS. A) Diferencias de la distribución porcentual de los diferentes territorios respecto el volumen del tercio anterior del SMS en los intervalos del PCH ( $bP_{MET[MESMS]_i}$ ). B) Distribución en cada estadio del porcentaje de ocupación de los diferentes territorios respecto al tercio medio del SMS ( $P_{MET[MESMS]_e}$ ). Abreviaturas: EC: estadio Carnegie; Inf: territorio inferior; ME: tercio medio; Med: territorio medial; Mt: territorio matriz; PCH: periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio; tSMS, tercio del SMS.



3. en el tercio posterior:

3.1 un mayor incremento del territorio medial en el primer intervalo (iEC 17-18), acompañado por un decremento de los territorios inferior y matriz (Fig. 37A).

3.2 un segundo incremento del territorio medial en el tercer intervalo (iEC 19-20) de PCH, pero en esta ocasión con una disminución del porcentaje de ocupación marcada para el territorio matriz y sólo con un mínimo incremento del territorio inferior, menor al 1%. El incremento del territorio medial es aproximadamente 1,4 partes menor respecto al incremento del primer intervalo (Fig. 37A).

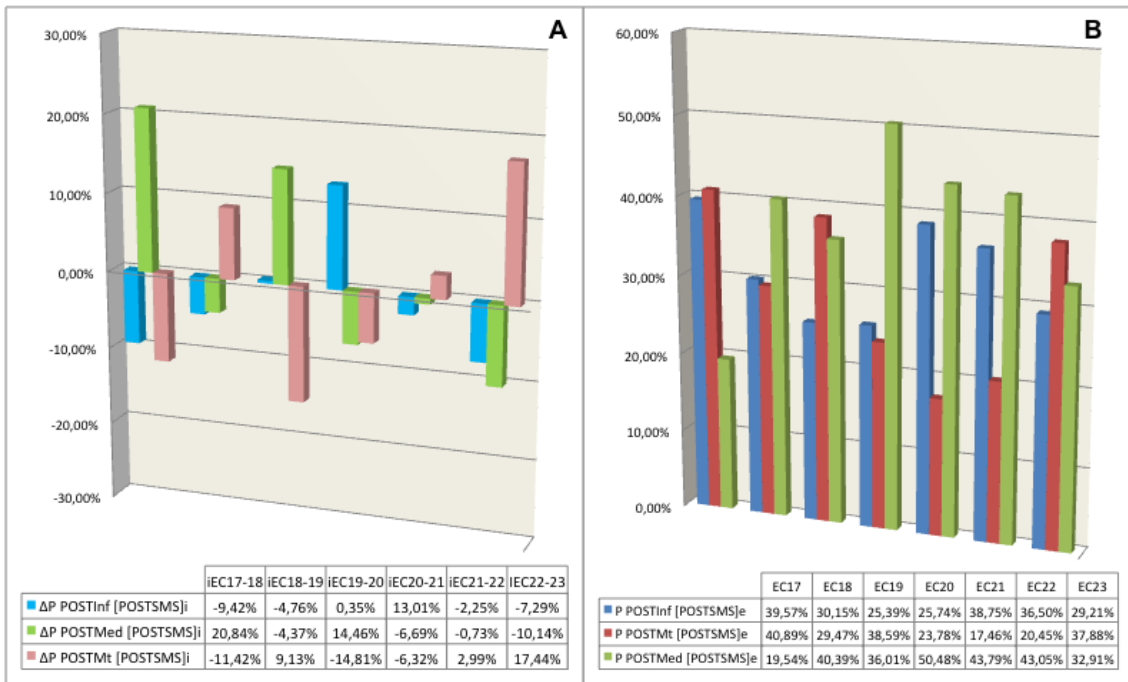


Fig. 37 Distribución porcentual en el tercio posterior del volumen del SMS. A) Diferencias de la distribución porcentual de los diferentes territorios respecto el volumen del tercio posterior del SMS en los intervalos del PCH ( $bP_{POSTT[POSTSMS]i}$ ). B) Distribución en cada estadio del porcentaje de ocupación de los diferentes territorios respecto al tercio posterior del SMS ( $P_{POSTT[POSTSMS]e}$ ). Abreviaturas, EC, estadio Carnegie; Inf, territorio inferior; Med, territorio medial; Mt, territorio matriz; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio; tSMS, tercio del SMS.

11.2. Índice de proporcionalidad entre las diferencias del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial y el equivalente de los otros territorios del SMS en los intervalos del PCH

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 38 y 39.

Para poder valorar el grado de proporcionalidad existente entre el crecimiento y/o disminución de los porcentajes de ocupación volumétrica del territorio medial y los de los otros territorios, se ha analizado el índice de proporcionalidad (IP) entre los valores absolutos de sus porcentajes de ocupación.

Del índice de proporcionalidad entre los valores absolutos de los porcentajes de ocupación, destaca que el territorio medial...

1. multiplica por 5,56 el valor del territorio inferior en el último intervalo (iEC22-23) de PCH en porcentajes respecto al volumen del SMS total (Fig. 38A).
2. multiplica por 7,55 el valor del territorio inferior en el último intervalo (iEC22-23) en porcentajes respecto al volumen del tercio anterior (Fig. 38B).
3. multiplica por 17,02 y 16,53, respectivamente, el valor del territorio inferior en el segundo (iEC18-19) y quinto intervalo (iEC21-22) en porcentajes respecto al volumen del tercio medio (Fig. 38C).
4. multiplica por 41,26 el valor del territorio inferior en el tercer intervalo (iEC19-20) en porcentajes respecto al volumen del tercio posterior (Fig. 38D).

En resto de intervalos la proporción se aproxima a 1.

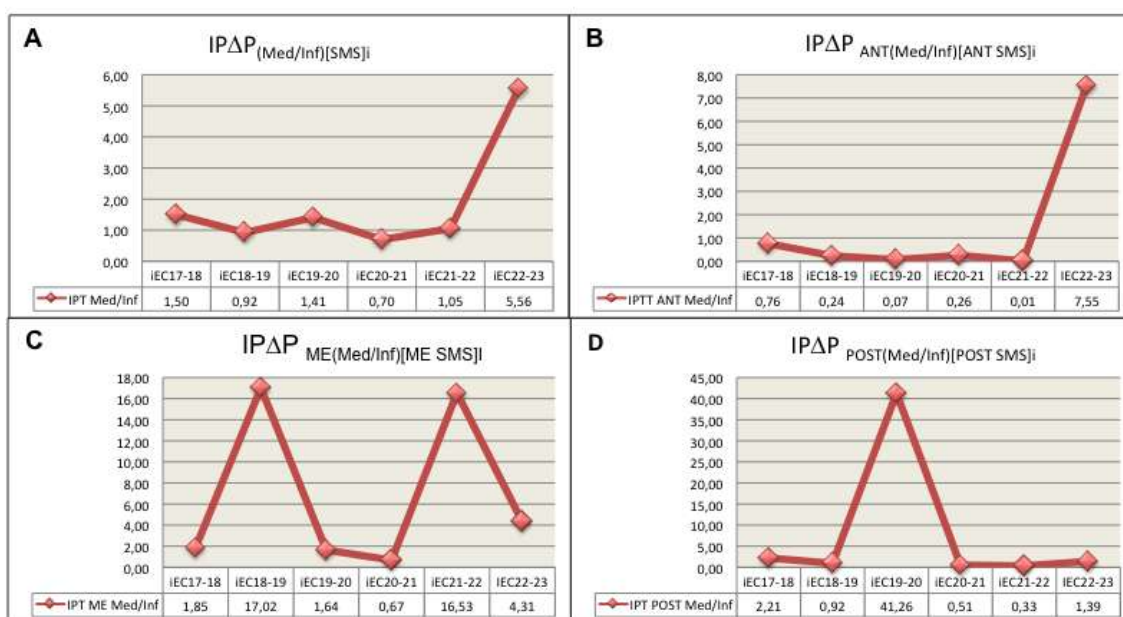


Fig. 38 Índice de proporcionalidad (IP) entre los valores absolutos de las diferencias de distribución porcentual del territorio medial y el territorio inferior. A) IP respecto el volumen total del SMS en los intervalos del PCH ( $IP\Delta P_{(Med/Inf)[SMS]i}$ ); B) IP respecto el volumen del tercio anterior del SMS en los intervalos del PCH ( $IP\Delta P_{ANT(Med/Inf)[ANT SMS]i}$ ); C) B) IP respecto el volumen del tercio medio del SMS en los intervalos del PCH ( $IP\Delta P_{ME(Med/Inf)[ME SMS]i}$ ); B) IP respecto el volumen del tercio posterior del SMS en los intervalos del PCH ( $IP\Delta P_{POST(Med/Inf)[POST SMS]i}$ ). Abreviaturas: ANT: tercio anterior; EC: estadio Carnegie; i, intervalo; Inf: territorio inferior; ME: tercio medio; Med: territorio medial; Mt: territorio matriz; PCH: periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; POST; tercio posterior; SMS: segmento maxilar seleccionado.

Abreviaturas del texto: EC, estadio Carnegie; i, intervalo del PCH; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.

Del índice de proporcionalidad entre los valores absolutos de los porcentajes de ocupación, destaca que el territorio medial...

1. multiplica por 11,91 el valor del territorio matriz en el segundo intervalo (iEC19-20) del PCH  $\alpha$  porcentajes respecto al volumen del SMS total (Fig. 39A).
2. multiplica por 3,19 el valor del territorio matriz en el primer intervalo (iEC18-19)  $\alpha$  porcentajes respecto al volumen del tercio anterior (Fig. 39B).
3. multiplica por 2.17, 2.57 y 2.07, respectivamente, el valor del territorio matriz en el primer (iEC17-18), el tercer (iEC19-20) y en el cuarto intervalo (iEC20-21)  $\alpha$  porcentajes respecto al volumen del tercio medio (Fig. 39C).
4. multiplica por 1,82 el valor del territorio matriz en el primer intervalo (iEC17-18)  $\alpha$  porcentajes respecto al volumen del tercio posterior (Fig. 39D).

En resto de intervalos la proporción se aproxima a 1.

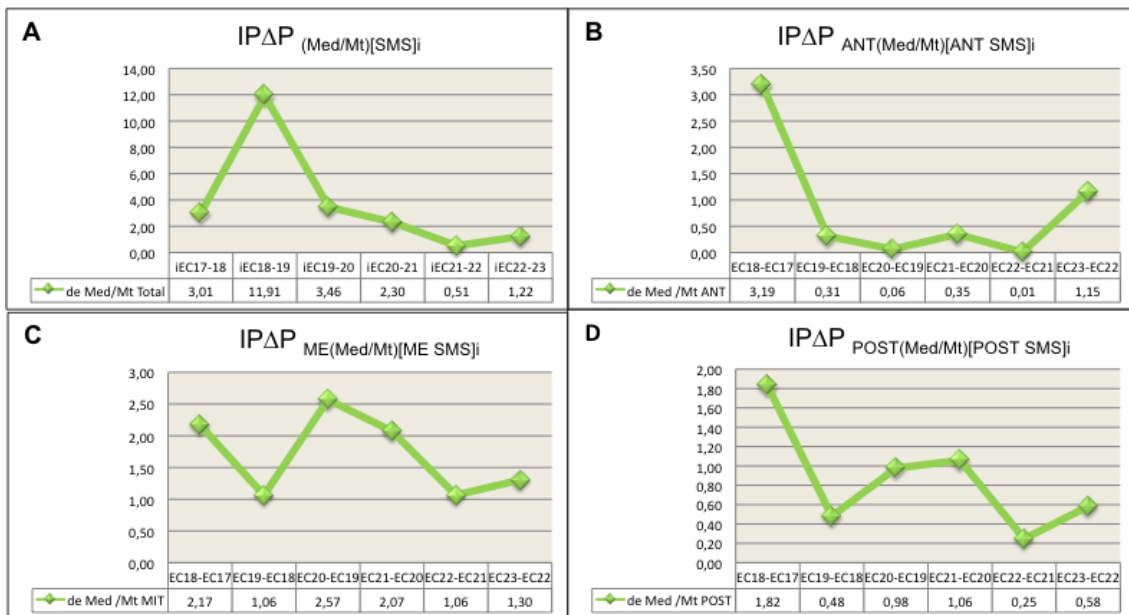


Fig. 39 Índice de proporcionalidad (IP) entre los valores absolutos de las diferencias de distribución porcentual del territorio medial y el territorio matriz. A) IP respecto el volumen total del SMS en los intervalos del PCH ( $IP\Delta P_{(Med/Mt)[SMS]i}$ ); B) IP respecto el volumen del tercio anterior del SMS en los intervalos del PCH ( $IP\Delta P_{ANT(Med/Mt)[ANT SMS]i}$ ); C) B) IP respecto el volumen del tercio medio del SMS en los intervalos del PCH ( $IP\Delta P_{ME(Med/Mt)[ME SMS]i}$ ); B) IP respecto el volumen del tercio posterior del SMS en los intervalos del PCH ( $IP\Delta P_{POST(Med/Mt)[POST SMS]i}$ ). Abreviaturas: ANT: tercio anterior; EC: estadio Carnegie; i, intervalo; Inf: territorio inferior; ME: tercio medio; Med: territorio medial; Mt: territorio matriz; PCH: periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; POST; tercio posterior; SMS: segmento maxilar seleccionado.

### 11.3. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen de los tercios de los territorios del SMS

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 40A, 40B y 40C.

De los valores de la media del porcentaje de ocupación por tercios de los diferentes territorios respecto al volumen del SMS, destaca una media de porcentaje de ocupación mayor para el territorio medial que para el territorio inferior en todos los tercios.

De los valores de la desviación estándar del porcentaje de ocupación por tercios de los diferentes territorios respecto al volumen del SMS, destaca:

1. la mayor desviación estándar en el territorio medial en los tres tercios.
2. la menor desviación estándar en el territorio inferior en los tres tercios.

### 11.4. Diferencias de la distribución porcentual por tercios del volumen del SMS durante el PCH

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 40D, 40E y 40F.

De los valores correspondientes al incremento (positivo o negativo) del porcentaje de distribución volumétrica por tercios de los diferentes territorios respecto al volumen del SMS que ha ocurrido durante todo el PCH, destaca:

1. un aumento marcado del porcentaje de ocupación del territorio medial en los tres tercios.
2. los territorios inferior y matriz presentan una disminución de crecimiento en los tres tercios.



Fig. 40 Porcentajes de ocupación del volumen del SMS. A) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen del SMS en el tercio anterior. B) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen del SMS en el tercio medio. C) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen del SMS en el tercio posterior. D) Diferencias de la distribución porcentual del volumen del SMS durante el PCH en el tercio anterior ( $\Delta P_{ANT|T|PCH}$ ); E) Diferencias de la distribución porcentual del volumen del SMS durante el PCH en el tercio medio ( $\Delta P_{ME|T|PCH}$ ); F) Diferencias de la distribución porcentual del volumen del SMS durante el PCH en el tercio posterior ( $\Delta P_{POST|T|PCH}$ ). Abreviaturas: ANT, tercio anterior; EC, estadio Carnegie; Inf, territorio inferior; ME, tercio medio; Med, territorio medial; Mt, territorio matriz; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; POST, tercio posterior; SMS, segmento maxilar seleccionado; T, territorio;  $\bar{X}$ , promedio;  $\sigma$ , desviación estándar.

### 11.5. Porcentajes de ocupación del volumen del SMS en las partes del territorio medial

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 41A, 42A, 43A y 44A.

De los valores del porcentaje de ocupación de las partes del territorio medial (medial externo y medial interno) respecto al volumen del SMS durante el PCH, destaca:

1. un aumento progresivo del porcentaje de ocupación del territorio medial externo a partir del tercer estado (EC19) y hasta el sexto estado (EC22) en el que disminuye (Fig. 41A).
2. un aumento más marcado del porcentaje de ocupación del territorio medial interno en el último estado (EC23) (Fig. 41A).

Cuando comparamos estos porcentajes de ocupación entre ambas partes del territorio medial en cada uno de sus tercios, destaca:

1. en el tercio anterior y en el tercio medio, un aumento marcado y brusco del porcentaje de ocupación del territorio medial interno en el último estadio (EC23), siendo éste el único estadio donde el territorio medial interno supera en porcentaje de ocupación al de medial externo (Figs. 42A y 43A).
2. en el tercio posterior, un mayor porcentaje de ocupación del territorio medial externo en todos los estadios (Fig. 44A).

#### 11.6. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen de las partes del territorio medial respecto al SMS

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 41B, 42B, 43B y 44B.

De los valores de la media del porcentaje de ocupación del volumen de las partes del territorio medial respecto al volumen del SMS en su totalidad y por tercios, destaca una media de porcentaje de ocupación mayor para el territorio medial externo (Figs. 41B, 42B, 43B y 44B).

De los valores de la desviación estándar del porcentaje de ocupación del volumen de las partes del territorio medial respecto al SMS total y por tercios, destaca:

1. la menor desviación estándar en el territorio medial externo, al analizar el total, el tercio anterior y el tercio medio (Figs. 41B, 42B y 43B).
2. la menor desviación estándar en el territorio medial interno, al analizar el total del tercio posterior (Fig. 44B)

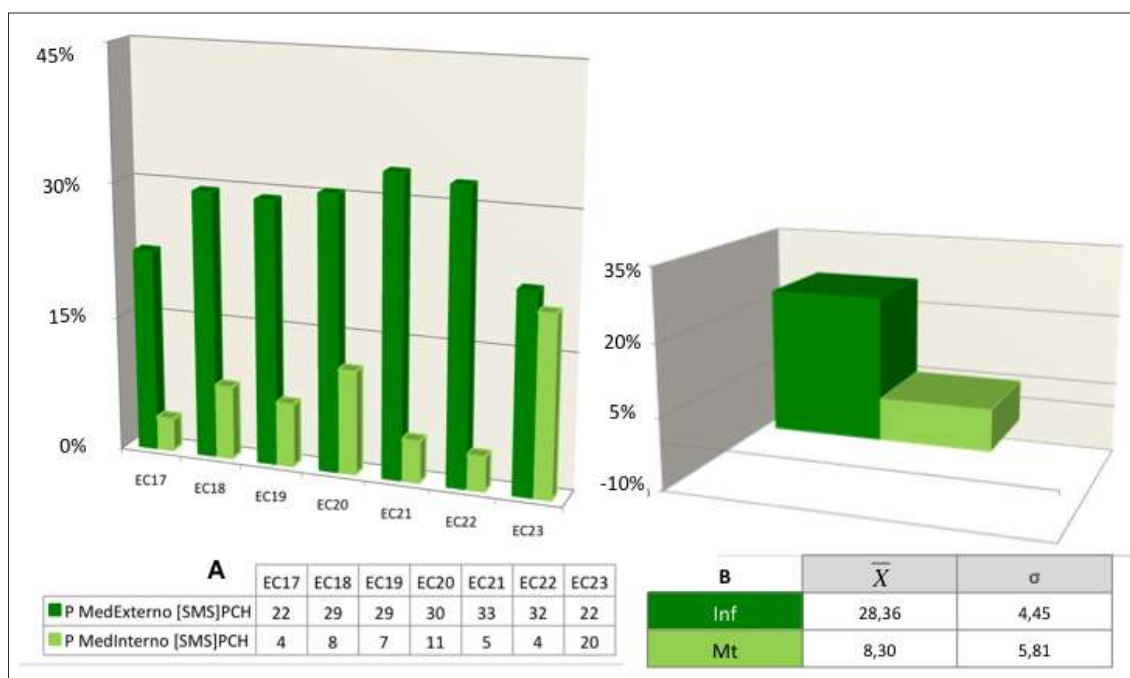


Fig. 41 Distribución porcentual del SMS en las partes del territorio medial. A) Distribución porcentual en cada estadio del territorio medial respecto al volumen total del SMS analizando por separado el territorio medial externo ( $P_{MedExterno[SMS]PCH}$ ) y el territorio medial interno ( $P_{MedInterno[SMS]PCH}$ ); B) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen del territorio medial dividido. Abreviaturas: EC: estadio Carnegie;  $\sigma$ : desviación estándar; PCH; periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.

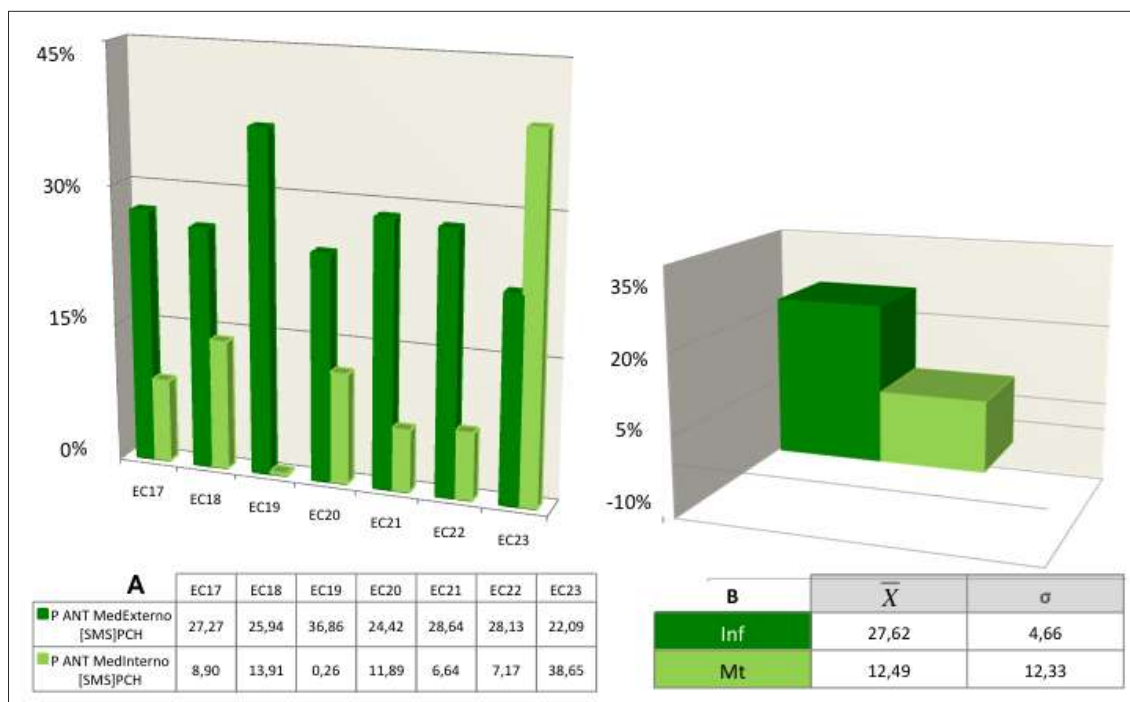


Fig. 42 Distribución porcentual del volumen del territorio medial dividido en el tercio anterior. A) Distribución porcentual en cada estadio del territorio medial respecto al volumen del tercio anterior del SMS analizando por separado el territorio medial externo ( $P_{ANTMedExterno[ANTSMS]PCH}$ ) y el territorio medial interno ( $P_{ANTMedInterno[ANTSMS]PCH}$ ); B) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen del territorio medial dividido en el tercio anterior. Abreviaturas: ANT: tercio anterior; EC: estadio Carnegie;  $\sigma$ : desviación estándar; PCH; periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.



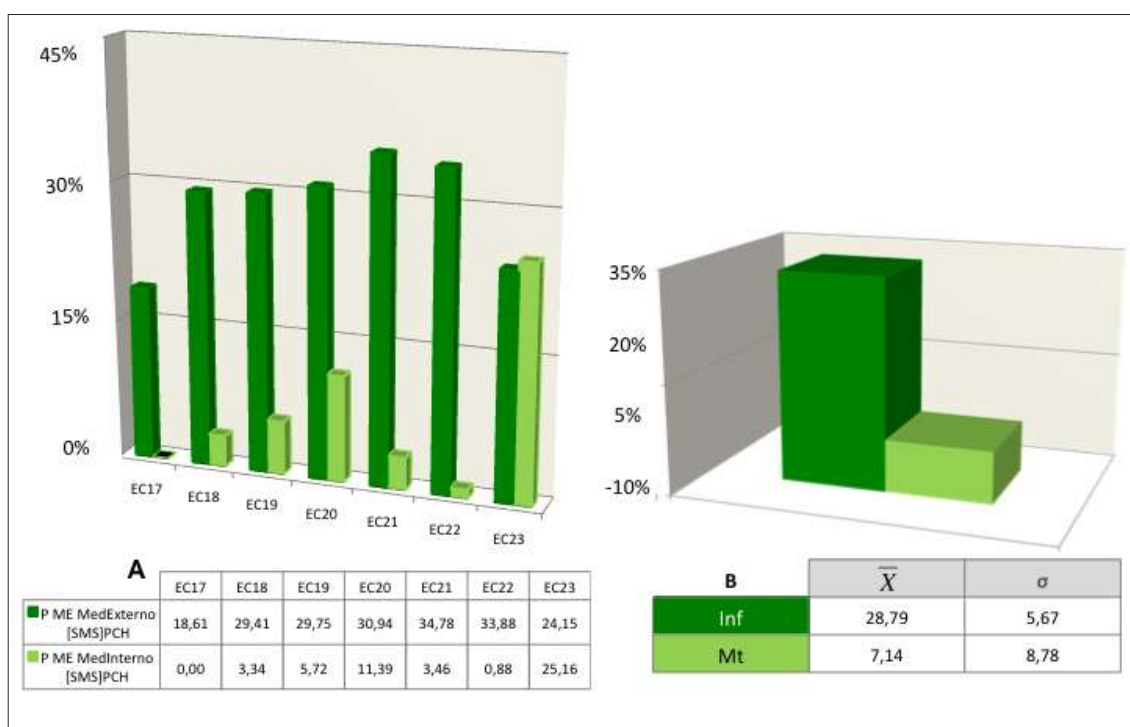


Fig. 43 Distribución porcentual del volumen del territorio medial dividido en el tercio medio. A) Distribución porcentual en cada estadio del territorio medial respecto al volumen del tercio medio del SMS analizando por separado el territorio medial externo ( $P_{ME\ MedExterno[MESMS]PCH}$ ) y el territorio medial interno ( $P_{ME\ MedInterno[MESMS]PCH}$ ); B) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen del territorio medial dividido en el tercio medio. Abreviaturas: EC: estadio Carnegie; ME: tercio medio;  $\sigma$ : desviación estándar; PCH; periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.

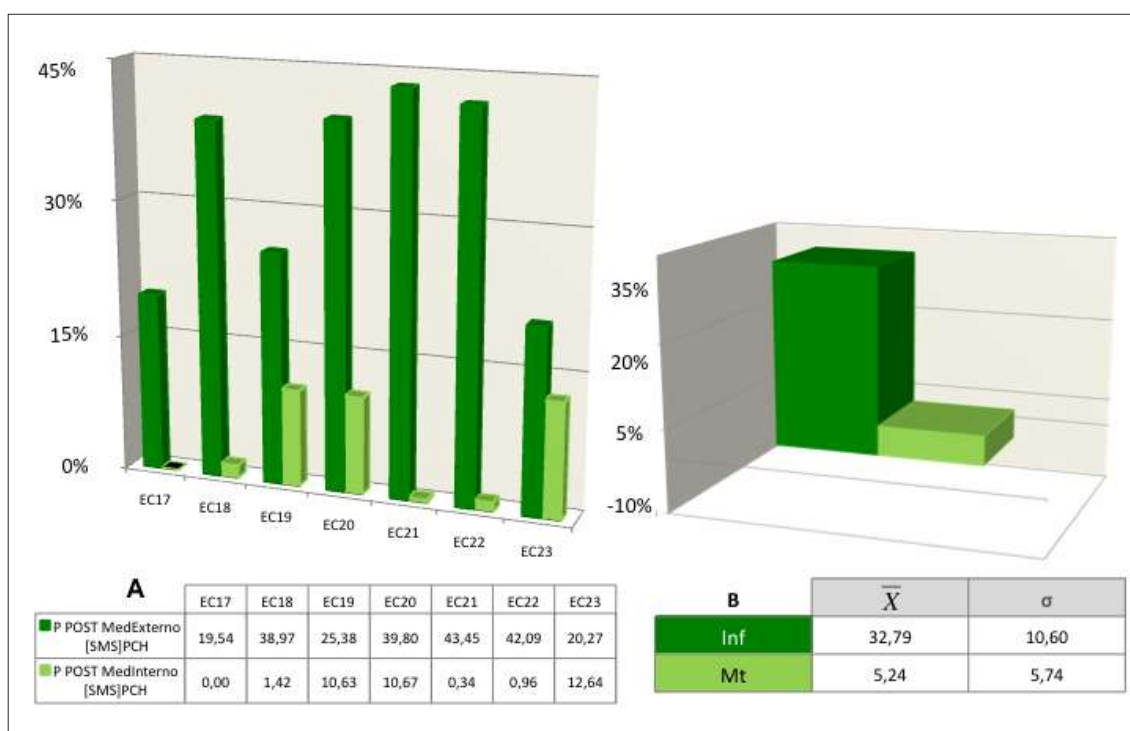


Fig. 44 Distribución porcentual del volumen del territorio medial dividido en el tercio posterior. A) Distribución porcentual en cada estadio del territorio medial respecto al volumen del tercio posterior del SMS analizando por separado el territorio medial externo ( $P_{POST\ MedExterno[POSTSMS]PCH}$ ) y el territorio medial interno ( $P_{POST\ MedInterno[POSTSMS]PCH}$ ); B) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen del territorio medial dividido en el tercio posterior. Abreviaturas: EC: estadio Carnegie; POST: tercio posterior;  $\sigma$ : desviación estándar; PCH; periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.



## 12. DISTRIBUCIÓN POR CENTUAL DEL VOLUMEN DE LOS TERRITORIOS DEL SMS ENTRE SUS TERCIOS

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 45B, 46B y 47B.

Al analizar la distribución porcentual del volumen (total) de un territorio entre sus tercios en cada estadio, destaca:

1. un porcentaje de ocupación más estable en el tercio medio
2. unos porcentajes de ocupación inversos entre los tercios anterior y posterior (en el estadio donde el valor es más elevado el tercio anterior en el tercio posterior es menor y viceversa).

### 12.1. Diferencias de la distribución porcentual del volumen de cada territorio del SMS entre sus tercios en los intervalos del PCH

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 45A, 46A y 47A.

Al compararla diferencia del porcentaje de ocupación del volumen de los tercios de cada territorio respecto a los cambios de volumen de cada territorio del SMS en cada intervalo del PCH, destaca un crecimiento del tercio anterior inverso al del tercio posterior en todos los territorios, excepto en el territorio matriz en el quinto intervalo (iEC21-22) (Fig. 45A), en el territorio inferior en el quinto intervalo (iEC21-22) (Fig. 46A) y en el territorio medial en el primer (iEC17-18) y quinto intervalo (iEC21-22) (Fig. 47A), en el que presentan el mismo sentido de crecimiento.

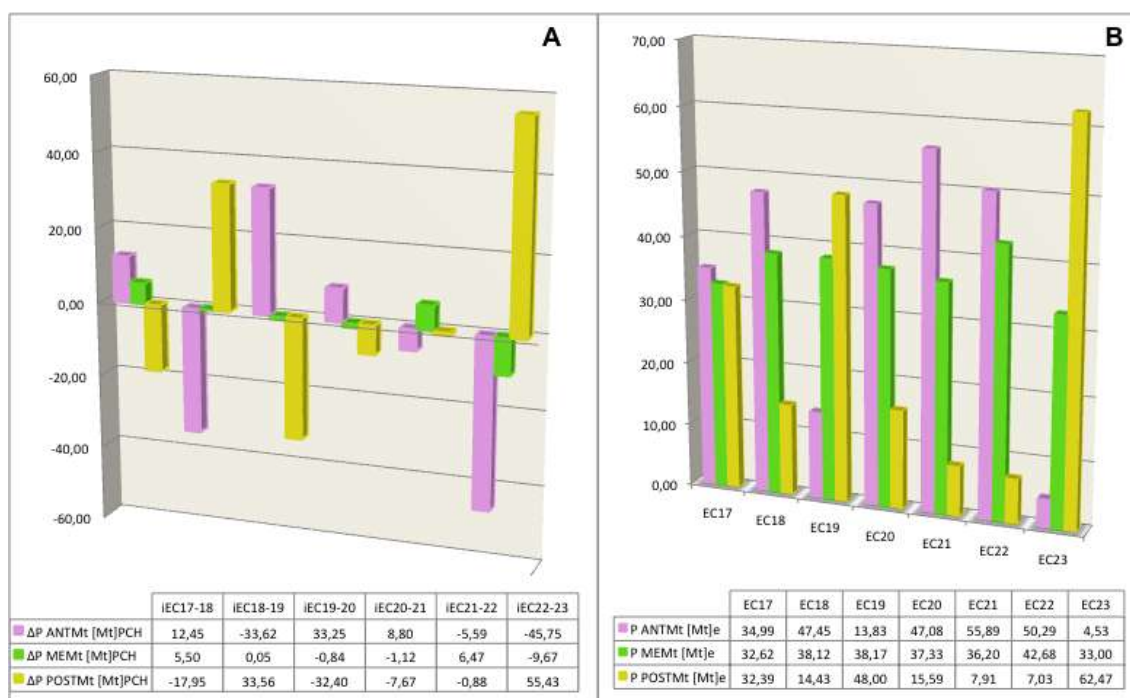


Fig. 45 Distribución porcentual del volumen del territorio matriz del SMS analizado por tercios. A) Diferencias de la distribución porcentual del volumen del territorio matriz del SMS en los intervalos del PCH por tercios ( $bP_{tMt[Mt]}$ ); B) Distribución en cada estado del porcentaje de ocupación del territorio matriz del SMS por tercios ( $P_{tMt[Mt]e}$ ). Abreviaturas: ANT: tercio anterior, e, un estadio Carnegie determinado; EC: estadio Carnegie, i, intervalo; ME: tercio medio, Mt: territorio matriz; PCH: periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; POST: tercio posterior, SMS: segmento maxilar seleccionado; t, tercio.

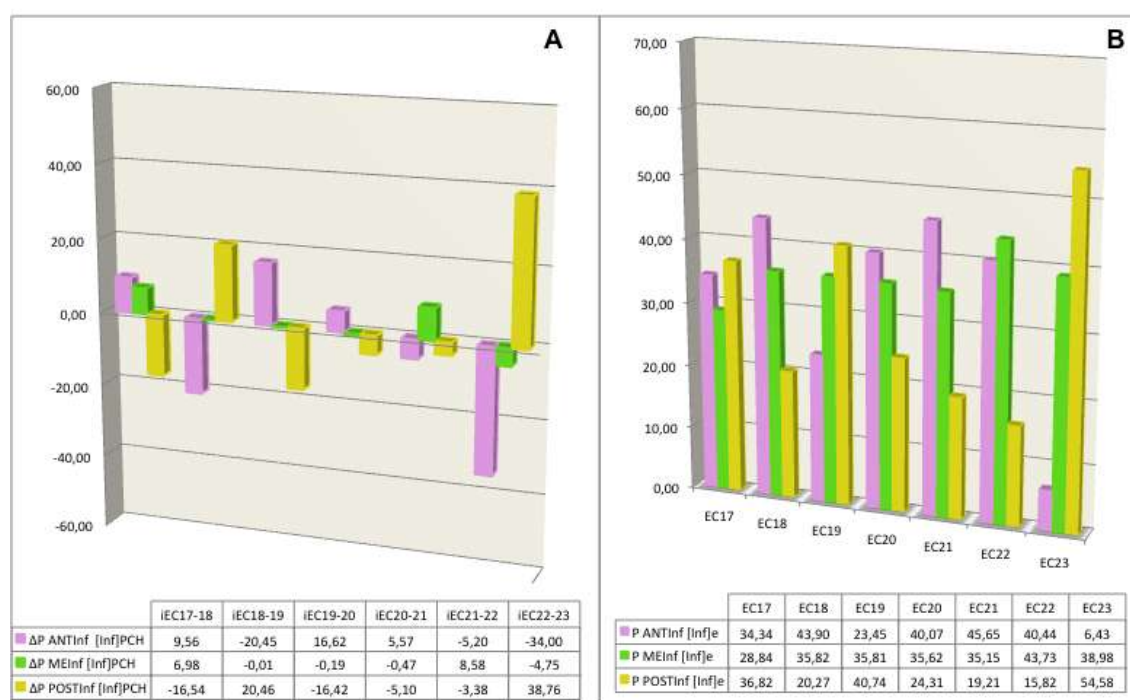


Fig. 46 Distribución porcentual del volumen del territorio inferior del SMS analizado por tercios. A) Diferencias de la distribución porcentual del volumen del territorio inferior del SMS en los intervalos del PCH por tercios ( $bP_{tInf[Inf]}$ ); B) Distribución en cada estado del porcentaje de ocupación del territorio inferior del SMS por tercios ( $P_{tInf[Inf]e}$ ). Abreviaturas: ANT: tercio anterior, e, un estadio Carnegie determinado; EC: estadio Carnegie, i, intervalo; Inf, territorio inferior; ME: tercio medio, PCH: periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; POST: tercio posterior, SMS: segmento maxilar seleccionado; t, tercio.

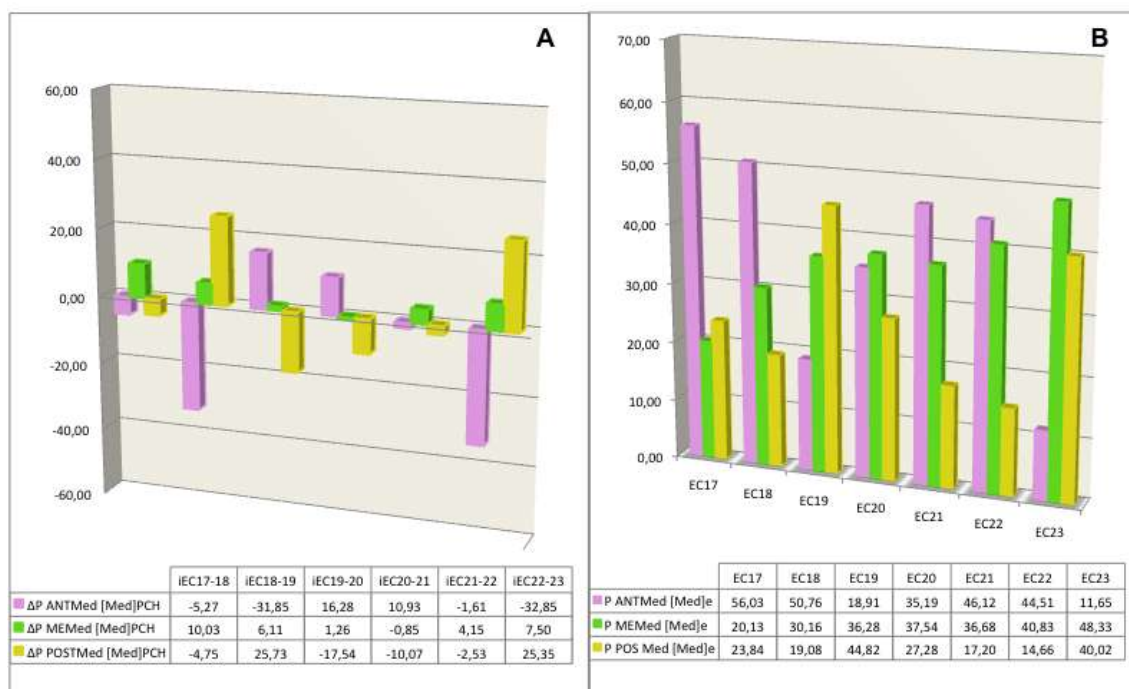


Fig. 47 Distribución porcentual del volumen del territorio medial del SMS analizado por tercios. A) Diferencias de la distribución porcentual del volumen del territorio medial del SMS en los intervalos del PCH por tercios ( $\Delta P_{tMed[Med]i}$ ); B) Distribución en cada estadio del porcentaje de ocupación del territorio medial del SMS por tercios ( $P_{tMed[Med]e}$ ). Abreviaturas: ANT: tercio anterior, e, un estadio Carnegie determinado; EC: estadio Carnegie; i, intervalo; ME: tercio medio; Med, territorio medial; PCH: periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; POST: tercio posterior, SMS: segmento maxilar seleccionado; t, tercio.

## 12.2. Índice de proporcionalidad entre las diferencias del porcentaje de ocupación del volumen del territorio medial y el equivalente de los otros territorios en los intervalos del PCH

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 48 y 49.

Para poder ver la relación entre el crecimiento y/o disminución de los diferentes territorios se analizó el índice de proporcionalidad (IP) entre los valores absolutos de las diferencias de los porcentajes de ocupación del volumen del territorio medial (Med) y el correspondiente incremento de cada uno de los otros territorios (NoMed: inferior o matriz) respecto al volumen total de los territorios del SMS, en cada intervalo del PCH.

Del índice de proporcionalidad entre los valores absolutos de los porcentajes de ocupación del tercio respecto al territorio total, destaca que el territorio medial...

1. tiene unos valores cercanos a 1 respecto al territorio inferior en los tercios anterior y posterior (Fig. 48A).
2. multiplica por 611 el valor del territorio inferior en el terciomedio (Fig. 48B).

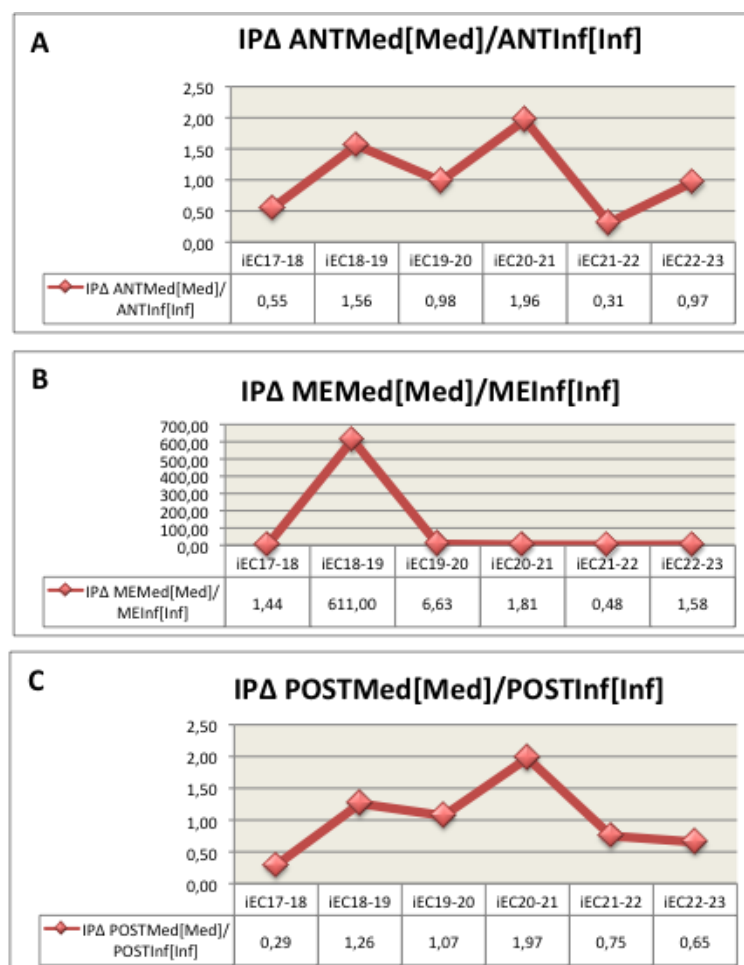


Fig. 48 Índice de proporcionalidad (IP) entre los valores absolutos de  $\Delta P_{\text{tercio}}$  de los territorios medial e inferior  $IP_{\Delta} P_{\text{tercio}} \text{Med}/\text{Inf}$ . A) en el tercio anterior, B) en el tercio medio, C) en el tercio posterior. Abreviaturas: ANT: tercio anterior, EC: estadio Carnegie, Inf: territorio inferior, ME: tercio medio, Med: territorio medial, POST: tercio posterior, SMS: segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio.

Del índice de proporcionalidad entre los valores absolutos de los porcentajes de ocupación del tercio respecto al territorio total, destaca que el territorio medial...

1. tiene unos valores cercanos a 1 respecto al territorio matriz en el tercio anterior uno valores cercanos a 1 (Fig. 49A).
2. multiplica por 117,50 el valor del territorio matriz en el tercio medio (Fig. 49B).
3. multiplica por 2,88 el valor del territorio matriz en el tercioposterior (Fig. 49C).

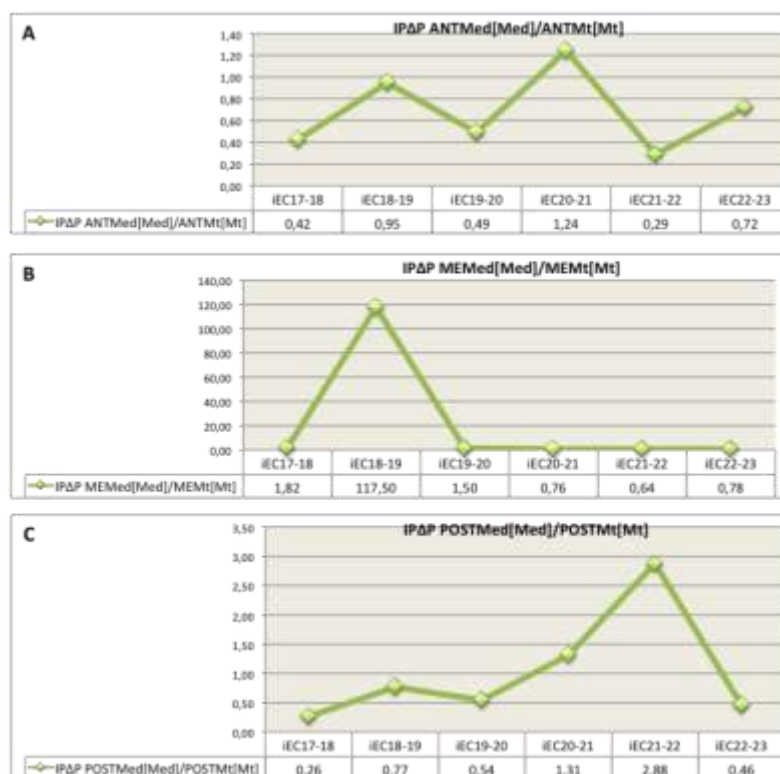


Fig. 49 Índice de proporcionalidad (IP) entre los valores absolutos de  $\Delta$ Ptercio de los territorios medial e matriz  $IP_{bP_{tMed/Mt}[T]j}$ . A) en el tercio anterior, B) en el tercio medio, C) en el tercio posterior. Abreviaturas: ANT: tercio anterior, EC: estadio Carnegie, Inf: territorio inferior, ME: tercio medio, Med: territorio medial, POST: tercio posterior, SMS: segmento maxilar seleccionado; t, tercio; T, territorio.

### 12.3. Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación del volumen por tercios respecto el volumen de los diferentes territorios del SMS

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 50A, 50B y 50C.

De los valores de la media de los porcentajes de ocupación de los tercios respecto al volumen total de cada territorios, destaca:

1. un valor mayor en el tercio medio de los territorios inferior y matriz (Figs. 50A y 50B).
2. un valor mayor en el tercio anterior del territoriomedial (Fig. 50C).
3. el menor valor en el tercio posterior al analizar los tres territorios (Figs. 50A, 50B y 50C).

De los valores de la desviación estándar de los porcentajes de ocupación de los tercios respecto al volumen total de cada territorio, destaca:

1. que en los tres territorios el tercio más homogéneo a lo largo del PCH es el terciomedio.
2. unos valores similares en los tercios anterior y posterior en cada territorio excepto en el territorio medial en el que la desviación estándar del tercio posterior es intermedia a la del tercio medio (la de menor valor) y la del anterior (de mayor valor).

#### 12.4. Diferencias de la distribución porcentual por tercios del volumen de los diferentes territorios del SMS durante el PCH

Los resultados de este apartado se corresponden con las Figuras 50D, 50E y 50F.

De los valores de los cambios del porcentaje de distribución volumétrica de cada tercio respecto al volumen (total) de cada territorio durante todo el PCH, destaca:

1. un aumento del porcentaje de ocupación de los tercios medio y posterior de los tres territorios (siendo muy pequeño el incremento en el tercio medio del territoriomatriz).
2. una disminución en el tercio anterior de los tres territorios (siendo ésta más marcada en el territorio medial).
3. el aumento del tercio posterior es superior al resto en los territorios matriz e inferior, a diferencia del territorio medial en el mayor aumento sucede en el terciomedio.

---

\* *Abreviaturas del texto:* PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.

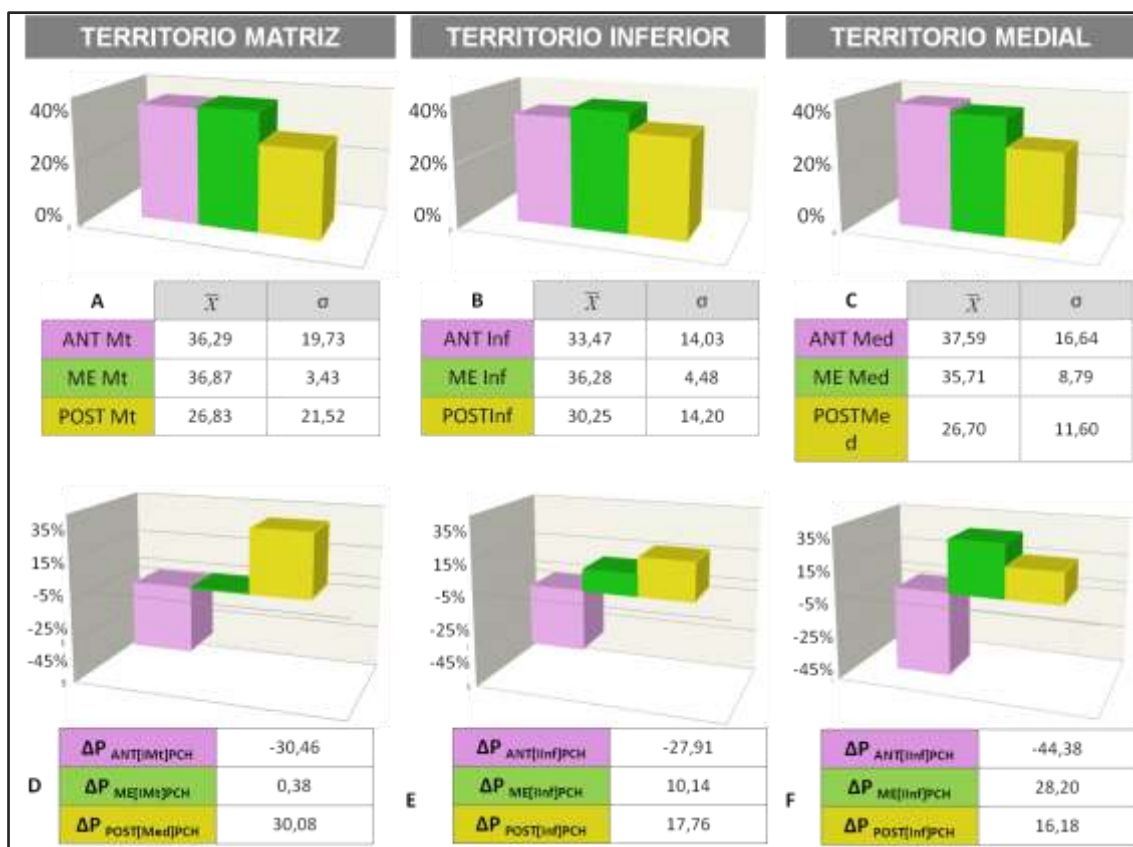


Fig. 50 Porcentajes de ocupación del volumen respecto el volumen total de los diferentes territorios. A) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación en el territorio matriz. B) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación en el territorio inferior. C) Media y desviación estándar de los porcentajes de ocupación en el territorio medial. D) Diferencias de la distribución porcentual del volumen del territorio matriz durante el periodo de cierre de la hendidura bucofaríngea (PCH) ( $bP_{t[Mat]PCH}$ ) en los diferentes tercios; E) Diferencias de la distribución porcentual del volumen del territorio inferior durante el PCH ( $bP_{t[Inf]PCH}$ ) en los diferentes tercios; F) Diferencias de la distribución porcentual del volumen del territorio medial durante el PCH ( $bP_{t[Med]PCH}$ ) en los diferentes tercios. Abreviaturas: ANT: tercio anterior, EC: estadio Carnegie, Inf: territorio inferior, ME: tercio medio, Med: territorio medial, Mt: territorio matriz, PCH: periodo de cierre de la hendidura bucofaríngea, POST: tercio posterior; SMS: segmento maxilar seleccionado; t, tercio;  $\bar{X}$ : promedio;  $\sigma$ : desviación estándar.

## Discusión







La embriología descriptiva humana ha permitido conocer cómo se forman las estructuras del cuerpo humano a partir de sus primordios, cuál es su desarrollo (crecimiento y morfogénesis) y la embriología experimental y molecular siguen aportando razones sobre las interacciones, orígenes y regulaciones que se encuentran detrás de los mecanismos que permiten a unas células multiplicarse y/o morir, desplazarse y diferenciarse. La posibilidad de poder objetivar el desarrollo embrionario y fetal humano mediante técnicas de medida, ha permitido conocer no solamente datos morfométricos y/o estereológicos, sino también conocer cómo cada estructura crece, decrece o se sitúa espacialmente durante el desarrollo, saber si estos cambios son homogéneos o no en sus distintas partes y determinar si hay relación entre los cambios de posición con el crecimiento de los órganos vecinos (Cromi et al., 2005; Durand et al., 2006; Macarulla-Sanz et al., 1996; Macarulla-Sanz et al., 1999; Nebot-Cegarra et al., 2001; Nebot-Cegarra et al. 2005; Radlanski, 2003; Diewert, 1983; Diewert y Shiota, 1990; Wang y Diewert, 1992; Diewert y Lozanoff, 1993a,b; Diewert et al., 1993; Diewert et al., 1993; Young et al. 2007). Al mismo tiempo aporta información de un hecho biológico y clínicamente permite conocer de forma precisa cómo es la «anatomía craneofacial» en cada período del desarrollo, facilitando a obstetras, radiólogos, dismorfólogos, neonatólogos y pediatras la identificación de la edad gestacional así como el diagnóstico de las variaciones respecto el desarrollo normal (Vermeij-Keers et al., 1983; Radlanski, 2003; Stanier y Moore, 2004). Durante los últimos años la resolución de las ecografías prenatales ha mejorado mucho, por lo se pueden objetivar variaciones a edades gestacionales más precoces y con mayor definición (Gillham et al., 2009). Por este motivo, un claro conocimiento de las variantes de la normalidad y aquellas patológicas puede facilitar a los diferentes especialistas clínicos un diagnóstico precoz. Y además permite ayudar a definir similitudes y diferencias respecto a lo que sucede en otros modelos animales, en los que se suelen realizar estudios de investigación, y no extrapolar datos directamente que en ocasiones ha podido crear discrepancias anteriormente.

El desarrollo craneofacial es complejo e intervienen en su formación tejidos procedentes de diversos primordios, entre los que existen múltiples interrelaciones e interacciones. Alteraciones en el desarrollo de cualquiera de los procesos que participan en el «puzle» craneofacial puede desembocar en alguno de los múltiples tipos de defectos congénitos de esta zona. Estos hechos justifican la gran variabilidad

clínica, en cuanto a defectos congénitos craneofaciales, que se observa en la práctica pediátrica (Bermejo y Martínez-Frías, 2001; Gorlin et al., 2001; Jones et al., 2013).

La formación del paladar (palatogénesis) es el resultado de la fusión de varios primordios, sucede entre la quinta y la doceava semana de gestación y determina la división de la cavidad buconasal en la cavidad bucal y las fosas nasales, consiguiendo separar también la boca de la nasofaringe (Moore et al., 2015; Bush y Jiang, 2012; Moxham, 2003; Meng et al., 2009). En concreto las crestas palatinas (primordios palatinos laterales) se desarrollan en cada lado por la proliferación de la parte medial de cada procesomaxilar, entre finales de la quinta y el inicio de la sexta semana de gestación (O'Rahilly y Müller, 1992; Standring, 2005; Sadler, 2012; Moore et al., 2015) (Fig. 1). Entre la séptima y la octava semana se alargan y en la octava semana ascienden de forma brusca y alcanzan una posición horizontal supralingual (Moore et al., 2015; Standring, 2005). En la octava semana de gestación se inicia la fusión de las crestas palatinas izquierda y derecha (O'Rahilly y Müller, 1992) y en la doceava semana se completa la fusión y formación del paladar (Moore et al., 2015; Bush y Jiang, 2012). En la zona que dará lugar al paladar duro, las crestas palatinas inician su fusión entre sí, presentando también fusión en su porción anterior con el paladar primario (procesopalatino medio) y en su superficie superior con el tabique nasal (que proviene de la proliferación en la línea media y hacia abajo del mesénquima de la prominencia frontonasal) (O'Rahilly y Müller, 1992; Moore et al., 2015; Fergusson, 1978). La zona que dará lugar al paladar blando, que incluye la úvula (parte posterior del paladar), presenta un proceso de *merging* (véase apartado 1.1.1) (O'Rahilly y Müller, 1992; Burdi y Faist, 1967; Gorlin et al., 2001). El inicio de la fusión de las crestas palatinas para formar el paladar secundario se inicia en la zona palatina media y posteriormente continua simultáneamente hacia delante y hacia atrás, quedando durante este proceso zonas de no contacto inicial (Bush y Jiang, 2012; Smith et al., 2013; Ferguson, 1988; Okano et al., 2006; Li y Ding, 2007).

En relación con el proceso de elevación de las crestas palatinas existen estudios controvertidos tanto en lo que se refiere a la secuencia de participación de sus partes, como por los mecanismos implicados.

Los tratados de embriología han considerado este proceso de elevación como un fenómeno brusco y generalizado de toda la cresta palatina que tiene lugar durante el último estadio embrionario en humanos (EC23) (Sadler, 2012; Carlson, 2014; O'Rahilly y Müller, 1992; Moore et al., 2015; Standring, 2005). No obstante, esta explicación se

contraponen con otros estudios que describen un inicio del ascenso en la zona posterior de las crestas palatinas (Walker y Fraser, 1956; Ferguson, 1978; Schüpbach et al., 1983; Yu y Ornitz, 2011) o en la zona anterior de éstas (Ferguson, 1978; Coleman, 1965; Wragg et al., 1972).

Tal y como se detalla en la introducción (véase apartado 1.1.3.1. y Figura 3) en el proceso de elevación de las crestas palatinas se han implicado tres mecanismos, entre los cuales sobre todo dos están contrapuestos (rotación y remodelación):

- 1) Rotación de las crestas palatinas: consiste en un ascenso de éstas respecto a un eje imaginario que estaría localizado en la zona lateral. Dentro de esta hipótesis están implicados los factores intrínsecos a las crestas palatinas y extrínsecos a éstas (Yu y Ornitz, 2011; Ferguson, 1978; Wragg et al., 1972; Diewert, 1985; Greene y Pratt, 1976; Walker y Fraser, 1956; Brinkley et al., 1978; Chou et al., 2004; Coleman, 1965).
- 2) Remodelación de las crestas palatinas: consiste en un proceso en el que existe regresión de la porción distal de éstas, acompañándose a la vez de un crecimiento de las mismas hacia la línea media (Walker y Fraser, 1956; Coleman, 1965; Ferguson, 1978; Yu y Ornitz, 2011; Yasuda y Fujimoto, 1986; Chou et al., 2004).
- 3) La proliferación tisular en la zona medial de las crestas palatinas (Walker y Fraser, 1956; Coleman, 1965; Schüpbach, et al., 1983; Ferguson, 1978).

### 13. NUESTRO ESTUDIO: UNA ALTERNATIVA A DIVERSOS CONDICIONANTES

Nuestro estudio está centrado en analizar la participación de las crestas palatinas en la palatogénesis, desde su formación hasta su elevación, valorando cuándo (estadios embrionarios), cómo (mecanismos implicados) y dónde (zonas palatinas) sucede el proceso de crecimiento y elevación de las crestas palatinas, para poder comparar nuestros datos objetivos (estereológicos) con la bibliografía existente, que aporta informaciones claramente contrapuestas entre varios autores.

De acuerdo con el cronograma de la formación de las crestas palatinas, los ejemplares embrionarios estudiados comprendían el período desde la sexta hasta la octava semana postovulatoria, un embrión por cada uno de los siete EC estudiados (EC 17-

---

*Abreviaturas del texto:* EC, estadio Carnegie.

23). Justifica la validez de utilizar un reducido número de embriones, la escasez de ejemplares humanos con calidad histológica suficiente (Radlanski et al., 2004), la garantía de no presentar defectos congénitos y de cumplir con los requisitos que permiten su clasificación en el estado concreto del desarrollo (O'Rahilly y Müller, 1987). Es de destacar que si bien todos los embriones han sido seccionados transversalmente respecto al eje del tronco, la realidad respecto a la orientación de éstos en la región cefálica ha dependido del grado de flexión de la cabeza: por lo general podemos decir que el plano resultante se acercaba al frontal.

En nuestro estudio hemos calculado por estereología los volúmenes de los territorios comprendidos en cada segmento (derecho e izquierdo) seleccionado de los procesos maxilares (SMS) que incluía las crestas palatiras (territorio medial) y otros adyacentes (inferior y matriz). En el diseño del trabajo hemos tenido también en cuenta que superficialmente los límites de los procesos faciales quedan bien delimitados a partir de la sexta semana de gestación, pero por debajo de la capa ectodérmica el mesénquima todavía está indiferenciado sin límites precisos (Corliss, 1979).

El principio de Cavalieri se ha aplicado en la práctica médica sobre todo en el área de la histología aunque también se ha utilizado en radiología, sobre todo con imágenes capturadas mediante Resonancia Nuclear Magnética (RNM) y tomografía computarizada (TC) (Coronado et al., 2010). Varios estudios han analizado la validez de este principio tanto para el cálculo de volúmenes mediante áreas (Maythew y Olsen, 1991; Rosen y Harry, 1990). Maythew y Olsen (1991) demostraron que es una metodología muy adecuada para el cálculo de volúmenes a través de áreas (en su caso imágenes de RNM cerebral) si se calculaban de una forma sistemática y describieron que el coeficiente de error a partir de unos 8-10 cortes disminuía de una forma muy evidente, pudiéndose demostrar la precisión del estudio. También Rosen y Harry (1990) estimaron el volumen cerebral mediante diferentes principios matemáticos de valores de áreas extraídos de imágenes de RNM cerebral y demostraron que ante un gran número de cortes analizados no existían diferencias entre los diferentes cálculos matemáticos realizados, pero que si se utilizaba un menor número de cortes el principio de Cavalieri era el más preciso de todos ellos.

Toda la metodología empleada en este estudio está diseñada para poder dar respuesta con cuál de las tres hipótesis sobre la elevación de las crestas palatiras (rotación, remodelación y proliferación tisular) se correlacionan más los datos encontrados en los diferentes tercios del paladar así como en los diferentes territorios

del SMS. Nuestro diseño además puede dar una visión "espacial" de los cambios que suceden en las diferentes regiones.

Como el cálculo estereológico de volúmenes se efectúa a partir de áreas medidas en secciones histológicas (seriadas, paralelas y equidistantes), no permite extrapolar con toda certeza los datos obtenidos con los que presuntamente tendrían los embriones vivos analizados intrauterinamente mediante ecografías, pero sí que permiten ser comparados entre los distintos estadios al haber sido procesados de forma similar. Estas diferencias pueden ser explicadas por diferentes motivos: retracción por el proceso de fijación, cambios postmortem, distorsión por ecografía o estimación incorrecta del estado de desarrollo de los embriones fijados (para revisión ver Macarulla-Sanz et al., 1996).

Aunque la mayoría de ejemplares utilizados han sido idénticamente procesados, hemos querido eliminar factores particulares de cada uno (por ejemplo su tamaño), por lo que nuestra medida de comparación entre los estadios no ha sido el valor absoluto del volumen, sino el porcentaje que cada parte analizada representaba del correspondiente total. De este modo cualquier comparación de las variables entre estadios desechaba el factor crecimiento global, relativizando los resultados: así -por ejemplo- si en el intervalo (Fig. 27) entre un embrión más joven y el siguiente más avanzado un territorio hubiese multiplicado su volumen por el mismo factor que lo hiciese todo el SMS del que es una parte, concluiríamos que el porcentaje de ocupación volumétrica de dicho territorio no habría variado, a pesar que el embrión hubiera crecido.

### 13.1. Características novedosas

El presente trabajo es una aportación novedosa al conocimiento de la palatogénesis humana por sumar las tres razones siguientes:

1. La metodología para estudiar dinámicas de desarrollo del paladar humano es original. Es el único trabajo sobre palatogénesis donde se analiza el desarrollo total de las crestas palatiras de forma integrada con el del conjunto del SMS de donde proceden, lo cual ha permitido realizar un análisis comparativo de las dinámicas de desarrollo tisular de los territorios incluidos en ese segmento

---

*Abreviaturas del texto:* EC, estadio Carnegie; SMS, segmento maxilar seleccionado.

- maxilar (SMS) así como determinar las similitudes o diferencias entre sus tercios anterior, medio y posterior.
2. Al analizar todas las partes del SMS y no aisladamente las crestas palatinas, ha permitido evitar que los datos de una parte se extrapolen al total (problema apuntado anteriormente por Ferguson, 1978; Yu y Ornitz, 2011). En otros artículos publicados los datos volumétricos habían sido parciales (Diewert y Lozanoff, 1993b) o bien aportaban solamente distancias y/o áreas (Diewert, 1983; Diewert y Shiota, 1990; Wang y Diewert, 1992; Diewert y Lozanoff, 1993a,b; Diewert et al., 1993; Diewert et al., 1993; Young et al. 2007).
  3. Al ser una de las pocas aportaciones a la palatogénesis que se han hecho con ejemplares humanos (Burdi y Faist, 1967; Yoon et al., 2000; Diewert, 1983; Diewert y Shiota, 1990; Diewert y Lozanoff, 1993a,b; Young et al. 2007; Vermeij-Keers et al., 1983; Burdi et al., 1988), evita el peligro constatado de interpretaciones erróneas que representa extrapolar resultados entre especies (Chou et al., 2004; Yu y Ornitz, 2011).

### 13.2. Distribución porcentual del volumen del SMS

Comparando los datos entre el comienzo y el final del PCH, el territorio que aumenta en todos los tercios es el territorio medial (el cual incluye mayoritariamente a las crestas palatinas), mientras que el territorio matriz e inferior disminuye (Figs. 40D, 40E y 40F).

Cuando realizamos un análisis detallado de todos los intervalos, de nuestros datos se deduce que cada tercio presenta un comportamiento diferente (resumen Fig. 51):

#### 13.2.1. En el tercio posterior

En el tercio posterior hemos observado que el porcentaje de ocupación del territorio medial (el cual incluye mayoritariamente las crestas palatinas) presenta su incremento más marcado en el primer intervalo del PCH (iEC17-18) y otro menor en el tercer intervalo (iEC19-20). Este mayor crecimiento inicial del tercio posterior de la zona que incluye mayoritariamente las crestas palatinas (territorio medial), se correlacionaría con lo observado en embriones de ratón (Walker y Fraser, 1956; Yu y Ornitz, 2011) y de rata (Ferguson, 1978; Schüpbach et al., 1983), donde en la zona posterior del paladar hay un crecimiento horizontal desde un inicio hacia la línea media.

Asimismo, este incremento del porcentaje de ocupación del territorio medial en el tercio posterior durante el primer intervalo (iEC17-18) sugiere que pueda deberse parcialmente a la existencia de una remodelación tisular (Fig. 3) desde los otros territorios del SMS, ya que su crecimiento coincide con la disminución del porcentaje de ocupación del territorio inferior y matriz. Como además el descenso porcentual del territorio inferior tiene un aceptable grado de proporcionalidad ( $IP_{Med/Inf} = 2,21$ ) respecto al incremento que se produce en el territorio medial, hace más creíble que haya una transferencia de mesénquima entre ambos (remodelación) que determine el crecimiento de la zona donde mayoritariamente se desarrollan las crestas palatiras (territorio medial). Esta proporcionalidad no se mantiene en el tercer intervalo (iEC19-20) ( $IP_{Med/Inf} = 4,126$ ) en el que el incremento del territorio medial es muy superior al del territorio inferior, por lo que en ese momento es más probable que el crecimiento del porcentaje de ocupación del territorio medial responda más a un mecanismo de proliferación tisular local, que afecta también a las crestas palatiras, que a una remodelación entre territorios, aunque no podemos descartar que también exista en cierta medida.

### 13.2.2 En el tercio medio

En el tercio medio el territorio medial muestra tres incrementos de su porcentaje de ocupación: dos más marcados en el primer (iEC17-18) y último intervalo (iEC22-23) del PCH y uno menor en el tercer intervalo (iEC19-20) (la mitad que en el primer). En todos ellos simultáneamente los porcentajes de ocupación de los territorios matriz e inferior disminuyen. Estas observaciones apuntan a un posible mecanismo de remodelación en el primer y tercer intervalo, pues el descenso observado en el territorio inferior es similar al incremento del territorio medial (que incluye mayoritariamente a las crestas palatiras) ( $IP_{Med/Inf} = 1,85$  y  $1,64$  respectivamente). Sin embargo, en el último intervalo el incremento del territorio medial es superior al descenso del territorio inferior ( $IP_{Med/Inf} = 4,31$ ) pudiendo sugerir estos datos más una proliferación tisular local que una remodelación, aunque no se pueda descartar su implicación.

Esta dinámica observada coincide con matices con lo explicado anteriormente por algunos autores como Walker y Fraser (1956) que describieron la zona media de las crestas palatiras como una zona de transición. Estos autores observaron, en

---

*Abreviaturas del texto:* EC, estadio Carnegie; i, intervalo del PCH; IP, índice de proporcionalidad; Inf, territorio inferior; Med, territorio medial; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.



embriões de ratón, que la elevación de las crestas palatiras se iniciaban en la zona posterior y proseguía hacia la zona anterior con un movimiento ondulante –similar a una ola“ (Walker BE and Fraser FC, 1956). Según nuestros datos pensamos que el tercio medio no sólo se ve influenciado por el ascenso que se ha iniciado inicialmente en el tercio posterior, si no que el mismo tercio anterior presenta al final del PCH un proceso –activo“ de elevación por si misma que también influye sobre el tercio medio. Por lo que pensamos que el tercio medio está influenciado por los diferentes procesos que suceden en los extremos de la cresta palatina a lo largo del PCH.

### 13.2.3. En el tercio anterior

En el tercio anterior hemos observado que es únicamente en el último intervalo del PCH (iEC22-23) cuando el porcentaje de ocupación del territorio medial (que incluye mayoritariamente a las crestas palatiras) aumenta marcadamente, al tiempo que disminuye en los territorios inferior y matriz. Además hemos comprobado que este crecimiento del territorio medial se hace sobre todo a expensas del territorio medial interno (único intervalo en el que el territorio medial interno supera en porcentaje al del medial externo). Este importante crecimiento medial del tercio anterior del territorio que incluye a las crestas palatiras (ocupan totalmente el territorio medial interno) junto con su disposición elevada por encima de la lengua en el EC23 de las crestas palatiras (Anexo 2), y el hecho que en los intervalos anteriores había una oscilación de crecimientos en los diferentes territorios sin presentar ninguna tendencia determinada, sugieren un ascenso probablemente por rotación brusca de éstas más que un proceso de remodelación, ya que los cambios entre el territorio medial y el territorio inferior distan mucho de ser proporcionales ( $IP_{Med/Inf} = 7,55$ ) Aunque no podemos descartar que también exista en cierta medida remodelación y proliferación tisular.

Estos datos se correlacionarían con los de Ferguson (1978) y Coleman (1965) en embriões de rata que observaban en la zona anterior de las crestas palatiras una elevación brusca en días equivalentes al último EC en humanos (EC23). A diferencia de los tratados de embriología (Sadler, 2012; Carlson, 2014; O’Rahilly y Müller, 1992; Moore et al., 2015; Standring S, 2005) que describían también una elevación brusca en el último estado embrionario, pero de toda la cresta palatina. Algunos de estos estudios explican que este ascenso brusco sucede como un movimiento de rotación respecto a un eje imaginario situado en la zona lateral de la cresta palatina (Coleman, 1965).

Se ha propuesto el descenso de la lengua como un factor favorecedor para que la rotación ascendente de las crestas palatinas se pueda producir, ya que la interposición lingual inicial entre ambas crestas la impediría. El crecimiento de la mandíbula (sobre todo en altura) implica pasivamente un descenso de la lengua por su unión a este hueso. La contracción de los músculos de la lengua y los movimientos de apertura y cierre de la boca, se han considerado factores activos que favorecerán el ascenso palatino (Yu y Ornitz, 2011; Ferguson, 1978; Wragg et al., 1972; Diewert, 1985; Greene y Pratt, 1976). Otros factores como la extensión de la cabeza y la protrusión de la lengua, implicados en la palatogénesis en embriones de ratón y rata, han sido considerados también en humano (Diewert, 1983; Diewert, 1985), pero no de forma unánime (Wragg et al., 1970). No obstante existen datos para pensar que las crestas palatinas poseen mecanismos intrínsecos que las harían elevar: son capaces de ascender activamente contra la fuerza de la gravedad (Brinkley et al., 1978; Zimmerman et al., 1983; Shiota et al., 1990), pueden elevarse a pesar de administrar inhibidores neuromusculares en embriones de ratón (Jacobs, 1970 y 1971) y no existe relación espacio-temporal entre el desarrollo de la lengua y las crestas palatinas (Young et al., 1991). En este sentido se han implicado también como factores intrínsecos a las crestas palatinas el aumento de la matriz extracelular inmediatamente antes y durante el cierre del paladar, con incremento de sulfomucopolisacáridos y proteoglicanos como el ácido hialurónico, moléculas que al hidratarse aumentan el volumen de las crestas palatinas produciendo un movimiento de ascenso palatino (Walker y Fraser, 1956; Standring, 2005; Brinkley et al., 1978; Chou et al., 2004).

---

*Abreviaturas del texto:* EC, estadio Carnegie; i, intervalo del PCH; IP, índice de proporcionalidad; Inf, territorio inferior; Med, territorio medial; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea.

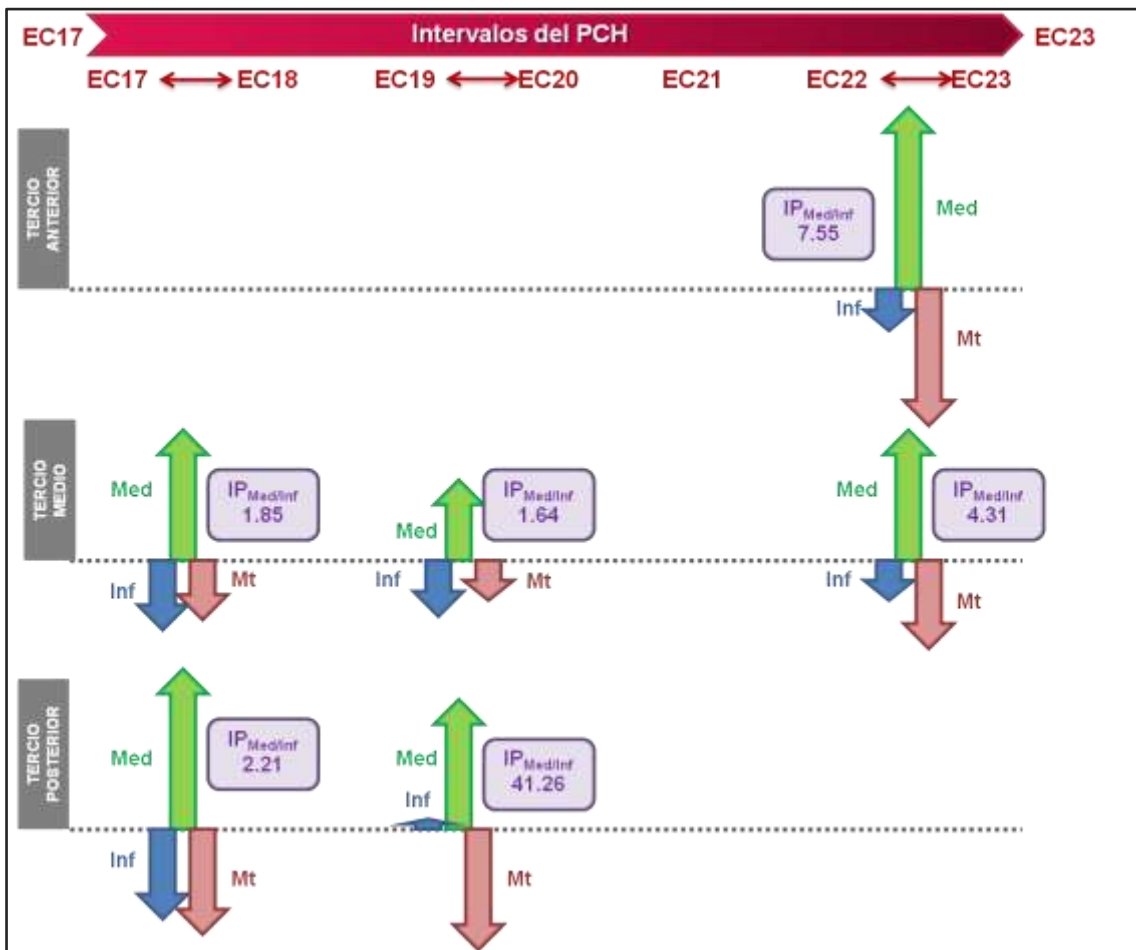


Fig. 51 Esquema de la distribución de los porcentajes de ocupación del volumen por tercios de los diferentes territorios respecto al volumen de cada tercio del SMS, en los intervalos del PCH. Se destacan los resultados más relevantes de nuestro estudio. Abreviaturas: EC: estadio Carnegie; IP<sub>Med/Inf</sub>: índice de proporcionalidad entre los valores absolutos de los porcentajes de ocupación del territorio medial respecto al inferior; Inf: territorio inferior; Med: territorio medial; MT: territorio matriz; PCH: periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS: segmento maxilar seleccionado. (Basado en las Figs. 35 a 38)

#### 13.2.4. Resumen de los resultados observados en nuestro estudio (Figs. 51 y 52)

Resumiendo los cambios que hemos observado en los tres tercios del SMS, y si partimos de la base que en el territorio medial es donde mayoritariamente se desarrollan las crestas palatinas, podemos decir que las dinámicas de crecimiento de los porcentajes de ocupación volumétricos en este territorio indican que la elevación de las crestas palatinas empieza en los tercios posterior y medio durante el primer intervalo (iEC17-18) del PCH, a través de mecanismos diversos entre los que destacaría la remodelación, que haría desplazar mesénquima desde los territorios vecinos (sobre todo del territorio inferior) hacia el territorio medial. Más tarde, en el tercer intervalo (iEC19-20), hay un repunte de crecimiento del porcentaje de ocupación

del territorio medial (que incluye mayoritariamente a las crestas palatiras) en los tercios posterior y medio. En este período los datos apuntan como mecanismos preponderantes en el tercio posterior la proliferación tisular local y en el tercio medio la remodelación. En el último intervalo (iEC22-23) del PCH el porcentaje de ocupación del territorio que incluye mayoritariamente a las crestas palatiras (territorio medial) crece de forma brusca en el tercio anterior. Antes de llegar al intervalo final en este tercio sólo se había observado una oscilación de crecimientos en los diferentes territorios sin una tendencia determinada, por lo que sugiere que en este último intervalo sucede un ascenso probablemente por rotación brusca de las crestas palatiras, más que un proceso de remodelación. En este mismo intervalo pero en el tercio medio, también se cree que sucede un proceso de rotación de las crestas palatiras.

Así cabe concluir que cada tercio de las crestas palatiras tiene tiempos y mecanismos prioritarios de desarrollo claramente distintos en los extremos (tercios anterior y posterior), mientras el tercio medio representa un terreno de transición, influenciado por los dos extremos, al ser la cresta palatira una superficie continua. Las crestas palatiras presentan inicialmente un proceso de remodelación en el tercio posterior y medio para acabar el PCH con un proceso de rotación brusca en el tercio anterior. El tercio medio representa un "terreno de transición" influenciado por los diferentes procesos que suceden en los extremos de la cresta palatira a lo largo del PCH.

---

*Abreviaturas del texto:* EC, estadio Carnegie; i, intervalo del PCH; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.

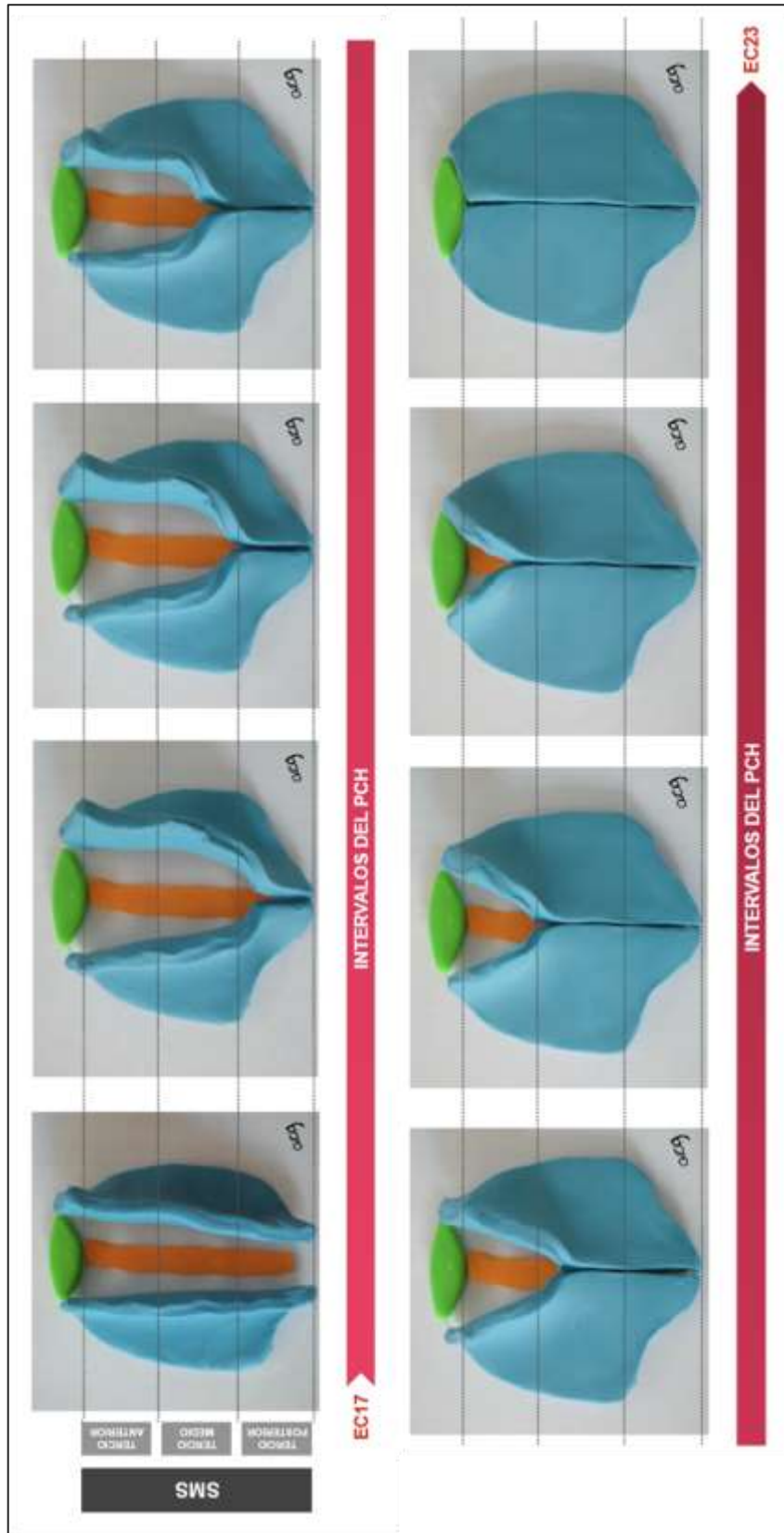


Fig. 52 (página anterior) Esquemas de vistas inferiores de la formación del paladar. Se observa el paladar primario (color verde), el paladar secundario o crestas palatinas (color azul) y el tabique nasal (color naranja). El tercio posterior presenta desde un inicio un crecimiento horizontal, el tercio anterior presenta una elevación brusca hacia el final del periodo de formación del paladar y el tercio medio está influenciado por sus extremos. Abreviaturas: EC: estadio Carnegie; SMS: segmento maxilar seleccionado.

De acuerdo con Bush y Jiang (2012), pensamos que probablemente ninguna de las hipótesis publicadas hasta el momento explican por sí solas el proceso de elevación de las crestas palatinas en humanos y que tanto la remodelación tisular, la proliferación local y la rotación de las crestas palatinas en desarrollo pueden darse simultáneamente en los diversos tercios, pero en diferentes grados, permitiéndonos hablar en cada zona y período de mecanismos preponderantes.

### 13.3. Distribución porcentual del volumen de los territorios del SMS

La distribución por tercios de los porcentajes de ocupación volumétricos que hemos observado en cada territorio del SMS nos permite pensar que hay, ni que sea parcialmente, un proceso de remodelación tisular anteroposterior en cada territorio.

Teniendo en cuenta que la separación por tercios responde a criterios de reparto equitativo de las secciones histológicas y no a límites orgánicos reales, el hecho generalizado que el aumento de porcentaje de ocupación de un tercio extremo (anterior o posterior) vaya sincrónicamente asociado a un descenso en el otro extremo, nos sugiere que se produce un desplazamiento de tejido entre ellos (Figs. 45, 46 y 47).

No obstante, si eso fuese así, el tejido desplazado debería acumularse en el tercio interpuesto (tercio medio), pero nuestros datos muestran a éste como el más estable a lo largo del PCH (menor variabilidad en la desviación estándar de los porcentajes de ocupación), es decir que su papel sería de zona de transición (Fig. 53). Así el tercio medio de cada territorio acumularía por un extremo tejido desplazado desde el tercio "donante" y transferiría por el otro extremo su propio tejido al otro tercio que actuaría como "receptor final". Este papel de zona de transferencia tisular del tercio medio se observa en la mayoría de intervalos del PCH en los tres territorios del SMS (Figs. 45, 46 y 47). Cuando se analiza el conjunto del PCH como un único intervalo, el territorio

---

*Abreviaturas del texto:* PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.

que hace de "donante" es en todos los territorios el tercio anterior y de "receptor" el tercioposterior, mientras que el terciomedio actúa claramente como zona de paso en los territorios inferior y matriz (su porcentaje de ocupación crece escasamente), excepto en el territorio medial en que se acumularía mesénquima incluso algo más que en el extremo posterior (Figs. 50D, 50E y 50F).

Al analizar las desviaciones estándar de los diferentes territorios a lo largo del PCH, observamos que en el tercio posterior el territorio que menor variabilidad presenta es el territorio medial (que incluye mayoritariamente a las crestas palatinas) (Fig. 53). Esta menor variabilidad podría estar relacionada con el crecimiento en dirección horizontal hacia la línea media de la parte posterior de este territorio desde un inicio. Esta dinámica es claramente opuesta a la sufrida por este mismo territorio medial en el tercio anterior, donde el crecimiento brusco del porcentaje de ocupación de éste ocurre en el último intervalo (iEC22-23) del PCH, coincidiendo con una elevación brusca en este tercio de las crestas palatinas.

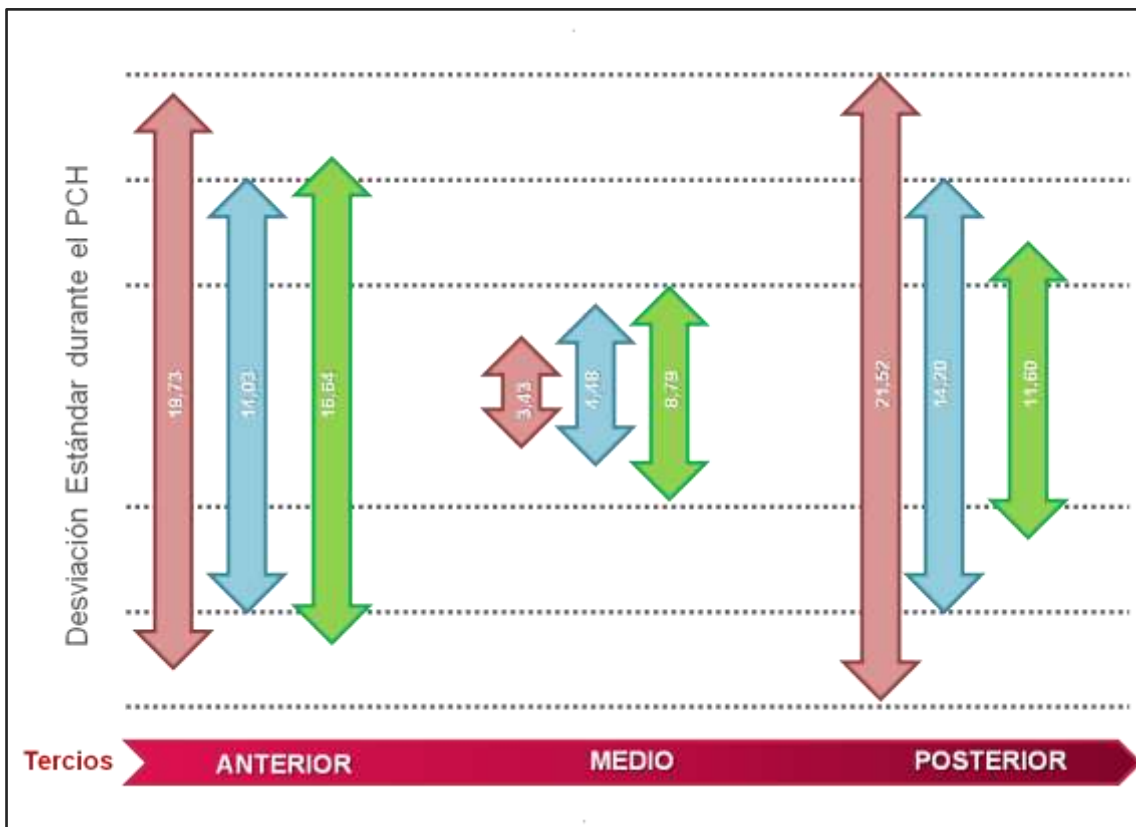


Fig. 53 Esquema de la distribución de las desviaciones estándar de los porcentajes de ocupación del volumen por tercios de los diferentes territorios respecto al volumen total del territorio, durante el PCH (Basado en las Figs. 50A, 50B y 50C). En rojo se esquematizan las correspondientes al territorio matriz, en color azul las del territorio inferior y en color verde las del territorio medial. Abreviaturas: PCH: periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea.

### 13.4. Relaciones con la biología celular y molecular

Es conocido que durante la palatogénesis en mamíferos existen interacciones entre el ectodermo faríngeo (epitelio) y el mesénquima derivado de las células de la cresta neural craneal (Li et al., 2011; Doshi y Patil, 2012; Bush y Jiang, 2012; Chai y Maxson, 2006). Las crestas palatinas en desarrollo están formadas por mesénquima derivado de la cresta neural (Ito et al., 2003), entre otros orígenes, cuyas células tienen una elevada capacidad migratoria (Gammill y Bronner-Fraser, 2003; Cordero et al., 2011; Helms et al., 2005; Milet y Monsoro-Buq, 2012). Estos factores moleculares presentan una heterogeneidad genética a lo largo de su eje antero-posterior (Bush y Jiang, 2012; Hilliard et al., 2005; Li y Ding, 2007; Smith et al., 2013), así como respecto al eje medial-lateral (Bush y Jiang 2012; Gao et al., 2009; Lan et al., 2004; Lan et al., 2015; Smith et al., 2013). (véase apartado 1.2.).

Esta heterogeneidad molecular iría a favor de un desarrollo distinto en los diferentes tercios durante la palatogénesis (Okano et al., 2006; Hilliard et al., 2005; Bush y Jiang, 2012; Lane y Kaartinen, 2014; Li y Ding, 2007; Gao et al., 2009; Lan et al., 2004; Lan et al., 2015).

Muchos estudios realizados en embriones de ratón han diferenciado la zona anterior de la zona posterior de las crestas palatinas en desarrollo mediante el límite que forma la primera ruga palatina (Bush y Jiang, 2012; Hilliard et al., 2005; Yu et al., 2005). En el mesénquima de las crestas palatinas de la zona anterior se expresan preferentemente los genes *Shox2*, *Msx1* y *Fgf10* y en la zona posterior de éste se expresan preferentemente los genes *Barx1*, *Mn1*, *Meox2* y *Tbx22* (Zhou et al., 2013; Hilliard et al., 2005). Por lo que se cree que el mesénquima de las crestas palatinas en desarrollo anterior y posterior tiene una respuesta diferente a las señales que provienen del epitelio (Zhou et al., 2013; Hilliard et al., 2005).

Creemos que existe correlación entre algunos de nuestros datos y la bibliografía publicada relacionada con la biología celular y molecular durante el periodo de la palatogénesis:

---

Abreviaturas del texto: EC, estadio Carnegie; i, intervalo; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea.



- a) Nuestros datos que apuntan a una heterogeneidad de mecanismo morfogénicos en los distintos tercios del eje anteroposterior de las crestas palatiras durante el PCH, se correlacionarían con los estudios en embriones de ratón que observaron como sólo se expresan en la región anterior de las crestas palatiras unos genes que no se expresan en la región posterior de éstas. Este hecho implicaría una proliferación celular localizada en una determinada zona si se estimularan ciertos genes, sin ser ésta generalizada. Por ejemplo, en la zona anterior del mesénquima de las crestas palatiras en desarrollo se encuentra el gen *Msx1* el cual estimula y es estimulado por el gen *Bmp4* situado en este mismo mesénquima anterior, no presentándose ni *Msx1* ni *Bmp4* en la región posterior de éstas (Li et al., 2011; Hilliard et al., 2005; Zhou et al., 2013). A su vez *Bmp4* estimula la expresión del gen *Shh*, situado en el epitelio de las crestas palatiras en desarrollo. *Shh* desde el epitelio de éstas estimula la expresión del gen *Bmp2* en el mesénquima produciendo la proliferación de éste en la zona anterior de las crestas palatiras en desarrollo (Zhang et al., 2002; Hilliard et al., 2005) (Fig. 4). Los genes *Shh*, *Msx1*, *Bmp4* y *Bmp2* se encuentran en fases iniciales del desarrollo del paladar anterior, sin diferencias en éstos entre la cara oral y nasal (Smith et al., 2013).
- b) Nuestros datos que apuntan a un proceso de remodelación tisular a lo largo del eje anteroposterior de las crestas palatiras durante el PCH diferente en los tres territorios analizados, sin poder descartar un patrón de migración celular asociado, se correlacionarían, por ejemplo, con los estudios en embriones de ratón que observaron que la expresión de los genes *Shox2* y *Meox2* era dinámica; pero ésta era diferente a lo largo del eje anteroposterior durante el desarrollo de la cresta palatina. Vieron como en un estadio precoz, E12.5 en ratones (equivalente a EC16 en humanos (Hill, 2016)), la expresión del gen *Shox2* estaba localizada en la región anterior de las crestas palatiras en desarrollo, cubriendo menos del 25% de toda la extensión total, expandiéndose progresivamente su expresión en dirección posterior cubriendo más del 60% de la cresta total en un estadio posterior, E14.5 en ratones (equivalente a EC20 en humanos (Hill, 2016)). Sin embargo, en E12.5 la expresión del gen *Meox2* tenía una expresión de más del 70% de la cresta palatina total, en la región posterior y medial; presentando más tarde en E14.5 una regresión a la región posterior, ocupando sólo un 25% en este estadio, coincidiendo con el futuro paladar blando (Li y Ding, 2007) (Fig. 5). Todos estos datos sugieren que el mesénquima de las crestas palatiras presenta un patrón de migración

celular a lo largo del eje anteroposterior (Bush y Jiang 2012; Li y Ding, 2007), aunque comentan que se deben realizar más estudios para profundizar al respecto.

Nuestros datos que apuntan a una heterogeneidad de mecanismos morfogenéticos en los distintos tercios de las crestas palatinas durante el PCH respecto el eje mediolateral, más relacionado quizás con la proliferación tisular localizada que con la remodelación; se correlacionarían con los estudios en embriones de ratón que observaron una heterogeneidad molecular mediolateral, respecto al eje vertical de las crestas palatinas en desarrollo, siendo la cara lateral la que finalmente estará en contacto con la región oral y la cara medial con la región nasal (Zhou et al., 2013; Bush y Jiang, 2012). Por ejemplo, respecto a este eje la expresión del gen *Shh* queda delimitada al epitelio de la región lateral en la zona media y posterior (respecto al eje anteroposterior) de las crestas palatinas en desarrollo. Dentro del mesénquima derivado de la cresta neural del tercio medio y posterior de éstas, la expresión del gen *Osr1* estaba localizado en la zona lateral sólo y el gen *Osr2* con un gradiente mayor en la zona lateral que en la zona medial (Bush y Jiang 2012; Gao et al., 2009; Lan, 2004; Gritli-Linde, 2007). Diversos autores observaron en embriones de ratón *knock out* para el gen *Osr2* una reducción de la proliferación celular en la región medial de las crestas palatinas en desarrollo pero no en su región lateral (con expresión normal de *Osr1*), presentando dichos embriones fisura de paladar. Al reponer la secuencia codificante del gen *Osr2* en estos ratones se rescataba la fisura de paladar (Bush y Jiang 2012; Gao et al., 2009; Gritli-Linde, 2007; Lan et al., 2004; Chai y Maxson, 2006)(Fig. 6). Por lo que se demostraban que el gen *Osr2* colaboraba con el crecimiento y ascenso del tercio medio y posterior de las crestas palatinas en desarrollo (Zhou et al., 2013).

---

*Abreviaturas del texto:* E, edad en días; EC, estadio Carnegie; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea.

## 14. SUGERENCIAS DE NUEVAS LÍNEAS DE TRABAJO

Nuestro trabajo podría complementarse con posteriores estudios centrados en los siguientes aspectos:

- a) Estudio de la fusión de las crestas palatinas en desarrollo. Nuestro trabajo lo hemos finalizado en el periodo en el que las crestas palatinas se han elevado, pero se podría ampliar éste hasta la doceava semana de gestación ya que existen discrepancias y poca exactitud en la bibliografía respecto a la fusión de éstas. Se podría analizar...
  - a. el segmento en el que se produce el inicio de la fusión de dichas crestas palatinas en desarrollo. En este momento en la bibliografía se ha descrito el inicio de la fusión:
    - i. i. en la región media de las crestas palatinas (Okano et al., 2006; Sani et al., 2005)
    - ii. ii. en la región anterior de las crestas palatinas (Chai y Maxson, 2006)
    - iii. iii. en la región anterior de la zona media de las crestas palatinas (Smith et al., 2003; Ferguson, 1988)
  - b. el mecanismo implicado en la fusión de las crestas palatinas en desarrollo. En este momento en la bibliografía se ha descrito como mecanismos implicados:
    - i. i. en el paladar duro mediante fusión y en el paladar blando mediante *merging* (Burd y Faist, 1967; Danescu et al., 2015; O'Rahilly y Müller, 1992)
    - ii. ii. en todo el paladar por fusión (Okano et al., 2006; Moxham, 2003; Martínez-Elvarez et al., 2000; Cuervo y Covarrubias, 2004)
- b) Estudio de la elevación de las crestas palatinas en desarrollo más detallado a lo largo de su eje anteroposterior. En nuestro estudio hemos dividido en tercios nuestra región estudiada (SMS), pero éste se podría detallar más si lo dividiéramos en sextos. De esta forma, se podría intentar correlacionar nuestros datos con los de Yu y Ornitz (2011) que describieron que la quinta parte más posterior del paladar en desarrollo se elevaría en una última fase,

una vez el resto de paladar se había elevado (y en concreto la zona más anterior).

- c) Valoración más precisa de los posibles mecanismos implicados en el desarrollo de las crestas palatras determinando el índice mitótico del mesénquima de los territorios del SMS de acuerdo con la estrategia aplicada sobre secciones histológicas archivadas sin marcadores específicos por Nebot-Cegarra et al. (2005).



## Conclusiones





- 1) El crecimiento del porcentaje de ocupación volumétrica en el tercio posterior del territorio en el que mayoritariamente se forman las crestas palatinas (territorio medial) es más intenso en el primer (iEC 17-18) y tercer intervalo (iEC 19-20) del PCH, siendo sugestivo que el incremento en el primero se deba prioritariamente a un desplazamiento de mesénquima desde la parte inferior del SMS (mecanismo de remodelación tisular), mientras que el aumento en el tercero se deba sobre todo a una proliferación tisular local.
- 2) El incremento del porcentaje de ocupación volumétrica en el tercio anterior del territorio donde mayoritariamente se forman las crestas palatinas (territorio medial), es prácticamente nulo durante el PCH excepto en el último intervalo (iEC 22-23) en el que se produce un intenso crecimiento de éste ligado al ascenso de las crestas palatinas, por lo que cabe deducir que su elevación sea debida a un proceso de rotación brusca de dichas crestas.
- 3) Los crecimientos del porcentaje de ocupación volumétrica que en el tercio medio del territorio donde mayoritariamente se forman las crestas palatinas (territorio medial) que se produce durante el primer (iEC 17-18) y tercer intervalo (iEC 19-20) del PCH, es sugestivo que se produzcan prioritariamente por un mecanismo de remodelación tisular (sobre todo por desplazamiento mesenquimático desde la parte inferior del SMS), mientras que el repunte del porcentaje de ocupación observado en el último intervalo (iEC 22-23) parece deberse sobre todo a una proliferación mesenquimática local.
- 4) El tercio medio reúne los patrones principales observados en el tercio anterior y posterior.
- 5) El tercio medio, tanto del territorio donde mayoritariamente se forman las crestas palatinas (territorio medial) como de los territorios adyacentes del SMS, es el más estable en cuanto a los valores de los porcentajes de ocupación volumétrica, mostrándose como una zona de transición o de transferencia tisular entre los extremos anterior y posterior de cada territorio.

---

*Abreviaturas del texto:* EC, estadio Carnegie; i, intervalo del PCH; PCH, periodo de cierre de la hendidura buconasofaríngea; SMS, segmento maxilar seleccionado.



6) Los cambios en el porcentaje de ocupación volumétrica del territorio donde mayoritariamente se forman las crestas palatinas (territorio medial) durante el PCH, sugieren que tanto la remodelación tisular, la proliferación local y la rotación de las crestas palatinas en desarrollo pueden darse simultáneamente en los diversos tercios, pero en diferentes grados, permitiéndonos hablar en cada zona y período de mecanismos preponderantes

7) El hecho que el crecimiento del porcentaje de ocupación volumétrica sea más estable durante el PCH en el tercio posterior del territorio donde mayoritariamente se forman las crestas palatinas (territorio medial) que en los otros tercios, parece estar relacionado con una disposición horizontal desde el inicio de esta parte del paladar secundario.

8) Se ha demostrado una buena estrategia de análisis comparativa entre estadíos de desarrollo los valores relativizados de una variable cuantitativa: así utilizar el porcentaje que cada parte representa del volumen del todo al que pertenece (SMS, tercio del SMS, territorio del SMS) ha solventado la comparación directa de volúmenes que podían estar condicionados por el tamaño del ejemplar y distorsionados por la retracción del procesado histológico o los cambios postmortem.

## Bibliografía





- Bermejo E, Martínez-Frías ML. Vigilancia epidemiológica de anomalías congénitas en España. Memoria anual del año 2012, datos recogidos hasta el año 2011 (período 1980-2011) *Boletín ECEMC (Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas): Revista Dismorfología y Epidemiología [Internet]*. 2012 [citado 3 julio de 2016]; VI(2). Disponible en: <http://revistas.isciii.es/evistas.jsp?id=ECEMC>
- Betancur P, Bronner-Fraser M, Sauka-Spengler T. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010; 26: 581-603.
- Bhatt S, Diaz R, Trainor PA. Signals and switches in mammalian neural crest cell differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5(2):a008326.
- Bomprezzi R, Kovanen PE, Martin R. New approaches to investigating heterogeneity in complex traits. *J Med Genet*. 2003; 40(8):553-9.
- Brinkley LL, Basehoar G, Avery JK. Effects of craniofacial structures on in vitro palatal shelf elevation. *J Dent Res*. 1978; 57(2):402-11.
- Brinkley LL, Morris-Wiman J. Computer-assisted analysis of hyaluronate distribution during morphogenesis of the mouse secondary palate. *Development*. 1987; 100(4): 629-35.
- Brinkley LL, Vickerman MM. Elevation of lesioned palatal shelves in vitro. *J Embryol Exp Morphol*. 1979; 54:229-40.
- Burdi AR, Faist K. Morphogenesis of the palate in normal human embryos with special emphasis on the mechanisms involved. *Am J Anat*. 1967; 120:149-60.
- Burdi AR, Lawton TJ, Grosslight J. Prenatal pattern emergence in early human facial development. *Cleft Palate J*. 1988; 25(1):8-15.
- Burdi AR, Silvey RG. Sexual differences in closure of the human palatal shelves. *Cleft Palate J*. 1969; 6(1):1-7.
- Bush JO, Jiang R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development*. 2012; 139(2): 231-43.
- Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007; 71(10): 1509-19.
- Carlson BM. Embridología humana y biología del desarrollo. 5ª ed. Madrid: Elsevier, 2014.
- Chai Y, Maxson RE. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn*. 2006; 235(9): 2353-75.
- Chou MJ, Kosazuma T, Takigawa T, Yamada S, Takahara S, Shiota K. Palatal shelf movement during palatogenesis: a fate map of the fetal mouse palate cultured in vitro. *Anat Embryol (Berl)*. 2004; 208(1): 19-25.

- Cobourne MT. The complex genetics of the cleft lip and palate. *Eur J Orthod.* 2004; 26(1): 7-16.
- Cohen SR, Chen L, Trotman CA, Burdi AR. Soft-palate myogenesis: a developmental field paradigm. *Cleft Palate Craniofac J.* 1993; 30(5): 441-6.
- Coleman ND. Development of the rat palate. *Anat Rec* 1965; 151: 107-17.
- Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M. Cranial neural crest on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet.* 2011; 155(2): 270-9.
- Corliss CE. Capítulo 15: Cara, mandíbulas y dientes. En: Embridología humana de Patten: fundamentos del desarrollo clínico. 1st ed. Madrid: El Ateneo; 1979p.365-376.
- Coronado C, Arriagada O, Zavando D, Del Sol M, Suazo I. Estimación del volumen orbitario mediante imágenes de TC y el principio de Cavalieri. *Rev Chil Radiol.* 2010; 16(2): 59-63.
- Cox TC. Taking in to the max: the genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology. *Clin Genet.* 2004; 65(3): 163-76.
- Creuzet S, Couly G, Le Douarin NM. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. *J Anat.* 2005; 207(5): 447-59.
- Cromi A, Ghezzi F, Dürig P, Di Naro E, Raio L. Sonographic umbilical cord morphology and coiling patterns in twin-twin transfusion syndrome. *Prenat Diagn.* 2005(9); 25:851-5.
- Cuervo R, Covarrubias L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development.* 2004; 131(1): 15-24.
- Danescu A, Mattson M, Dool C, Diewert VM, Richman J M. Analysis of human soft palate morphogenesis supports regional regulation of palatal fusion. *J Anat.* 2015; 227(4): 474-86.
- Dickey RP, Gasser RF. Ultrasound evidence for variability in the size and development of normal human embryos before the tenth post-insemination week after assisted reproductive technologies. *Hum Reprod.* 1993; 8(2): 331-7.
- Diewert VM. A cephalometric study of orofacial structures during secondary palate closure in the rat. *Arch Oral Biol.* 1974; 19(4): 303-15.
- Diewert VM. A quantitative coronal plane evaluation of craniofacial growth and spatial relations during secondary palate development in the rat. *Arch Oral Biol.* 1978; 23(8):607-29.
- Diewert VM. A morphometric analysis of craniofacial growth and changes in spatial relations during secondary palatal development in human embryos and fetuses. *Am J Anat.* 1983; 167(4): 495-522.

- Diewert VM. Development of human craniofacial morphology during the late embryonic and early fetal periods. *Am J Orthod.* 1985; 88(1): 64-76.
- Diewert VM, Lozanoff S. A morphometric analysis of human embryonic craniofacial growth in the median plane during primary palate formation. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1993a; 13(3):147-61.
- Diewert VM, Lozanoff S. Growth and morphogenesis of the human embryonic midface during primary palate formation analyzed in frontal sections. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1993b; 13(3): 162-83.
- Diewert VM, Lozanoff S, Choy V. Computer reconstructions of human embryonic craniofacial morphology showing changes in relations between the face and brain during primary palate formation. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1993; 13(3): 193-201.
- Diewert VM, Shiota K. Morphological observations in normal primary palate and cleft lip embryos in the Kyoto Collection. *Teratology.* 1990; 41(6): 663-77.
- Diewert VM, Wang KY. Recent advances in primary palate and midface morphogenesis research. *Crit Rev Oral Biol and Med.* 1992; 4(1): 111-130.
- Diewert VM, Wang KE, Tait B. A morphometric analysis of cell densities in facial prominences of the rhesus monkey embryo during primary palate formation. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1993; 13(4): 236-49.
- Dixon JM, Marazita ML, Beaty TH, Murray J C. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev.* 2011; 12(3): 167-78.
- Doshi RR, Patil AS. A role of genes in craniofacial growth. *IIOABJ.* 2012; 3(2): 19-36.
- Durand S, Delmas V, Ho Ba Tho MC, Batchvarova Z, Uhl JF, Oberlin C. Morphometry by computerized three-dimensional reconstruction of the human carpal bones during embryogenesis. *Surg Radiol Anat.* 2006; 28(4):355-8.
- Emmert-Streib F, Glazko GV. Network biology: a direct approach to study biological function. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011; 3(4): 379-91.
- Ferguson MW. Palatal shelf elevation in the Wistar rat fetus. *J Anat.* 1978; 125(3): 555-77.
- Ferguson MW. Palate development. *Development.* 1988; 103 (Suppl): 41-60.
- Fraser FC. The genetics of the cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Genet.* 1970; 22(3): 336-52.
- Fraser FC. The William Allan memorial evolution of a palate multifactorial threshold model. *Am J Hum Genet.* 1980; 32(6): 796-813.
- Funato N, Nakamura M, Yanagisawa H. Molecular basis of cleft palates in mice. *World J Biol Chem.* 2015; 6(3): 121-38.
- Gammill LS, Bronner-Fraser. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(10): 795-805.

- Gao Y, Lan Y, Ovitt C, Jiang R. Functional equivalence of the zinc finger transcription factors *Osr1* and *Osr2* in mouse development. *Dev Biol.* 2009; 328(2): 200-9.
- Gillham JC, Anand S, Bullen PJ. Antenatal decision of cleft lip with or without cleft palate: incidence of associated chromosomal and structural anomalies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009; 34(4): 410-5.
- Gorlin RJ, Cohen MM JR, Hennekam RCM. Chapter 20: orofacial clefting syndromes: general aspects. In: *Syndromes of the head and neck. 4<sup>th</sup> ed.* New York: Oxford University Press; 2001p.850-68.
- Greene RM, Pratt RM. Developmental aspects of secondary palate formation. *J Embryol Exp Morphol.* 1976; 36(2): 225-45.
- Gritli-Linde A. Molecular control of secondary palate development. *Dev Biol.* 2007; 301(2): 309-26.
- Graham A. Development of the pharyngeal arches. *Am J Med Genet A.* 2003; 119A(3): 251-6.
- Helms JA, Cordero D, Tapadia MD. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development.* 2005; 132(5): 851-61.
- Hill, MA [Internet]. Embryology: Carnegie Stage Comparison. Australia: the University of New South Wales (Sydney); 2016 [último acceso 3 de julio de 2016]. Disponible en: [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie\\_Stage\\_Comparison](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stage_Comparison)
- Hilliard SA, Yu L, Gu S, Zhang Z, Chen YP. Regional regulation of palatal growth and patterning along the anterior-posterior axis in mice. *J Anat.* 2005; 207(5): 655-67.
- Ito Y, Yeo JY, Chytil A, Han J, Bringas P Jr, Nakajima A et al. Conditional inactivation of *Tgfr2* in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development.* 2003; 130(21): 5269-80.
- Jacobs RM. Normal closure of secondary palate in paralyzed mouse embryos. *J Dent Res.* 1970; 49(6): 1495-97.
- Jacobs RM. Failure of muscle relaxants to produce cleft palate in mice. *Teratology.* 1971; 4(1): 25-9.
- Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn.* 2006; 235(5): 1152-66.
- Jones KL, Jones MC, Del Campo M. Chapter 4: Minor anomalies: clues to more serious problems and to the recognition of malformation syndromes. In: *Smith's: Recognizable patterns of human malformation. 7<sup>th</sup> ed.* Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013p.895-912.
- Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 2009; 15(7): 437-53.
- Kohli SS, Kohli VS. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012; 16(1): 64-72.

- Lan Y, Ovitt CE, Cho ES, Maltby KM, Wang Q, Jiang R. Odd-skipped related 2 (Osr2) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis. *Development*. 2004; 131(13): 3207-16.
- Lan Y, Xu J, Jiang R. Cellular and molecular mechanisms of palatogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 2015; 115: 59-84.
- Lane J, Kaartinen V. Signaling networks in palate development. *Willey Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2014; 6(3): 271-8.
- Levi B, Brugman S, Wong VW, Grova M, Longaker MT, Wan DC. Palatogenesis: engineering, pathways and pathologies. *Organogenesis*. 2011; 7(4): 242-254.
- Li Q, Ding J. Gene expression analysis reveals that formation of the mouse anterior secondary palate involves recruitment of cells from the posterior side. *Int J Dev Biol*. 2007; 51(2):167-72.
- Li L, Lin M, Wang Y, Cserjesi P, Chen Z, Chen Y. Bmpr1a is required in mesenchymal tissue and has limited redundant function with Bmpr1b in tooth and palate development. *Dev Biol*. 2011; 349(2): 451-61.
- Macarulla-Sanz E, Nebot-Cegarra J, Reina-de la Torre. Computer-assisted stereological analysis of gastric volume during the human embryonic period. *J Anat*. 1996; 188(2): 395-401.
- Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genom Human Genet*. 2012; 13: 263-83.
- Martínez-Elvárez C, Blanco MJ, Pérez R, Rabadán MA, Aparicio M, Resel E et al. Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev Biol*. 2004; 265(1): 207-18.
- Martínez-Elvárez C, Tudela C, Pérez-Miguelsanz J, O'Kane S, Puerta J, Ferguson MW. Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Dev Biol*. 2000; 220(2): 343-57.
- Martínez Frías ML. Características generales de los defectos congénitos, terminología y causas. *Semergen*. 2010; 36(3): 135-9.
- Mayhew TM, Olsen DR. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using Cavalieri principle. *J Anat*. 1991; 178: 133-44.
- Meng L, Bian Z, Toresma R, Von den Hoff JW. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res*. 2009; 88(1): 22-33.
- Milet C, Monsoro-Burq AH. Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Dev Biol*. 2012; 366(1): 22-33.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Embridología clínica. 9ª ed. Barcelona: Elsevier Saunders; 2015.
- Mossey P, Castilla E. Global registry and database on craniofacial anomalies [Internet]. WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies (2001: Baurú, Brazil). Geneva: World Health Organization; 2003 [acceso 3 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/genomics/anomalies/en/CFA-RegistryMeeting-2001.pdf>



- Mossey P. Epidemiology underpinning research in the aetiology of orofacial clefts. *Orthod Craniofac Res.* 2007; 10(3): 114-20.
- Mossey P, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009; 374 (9703): 1773-85.
- Moxham BJ. The development of the palate: a brief review. *Eur J Anat.* 2003; 7 (suppl 1): 53-74.
- Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.* 2002; 61(4): 248-56.
- Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways and pursuits. *J Clin Invest.* 2004; 113(12): 1676-78.
- Nebot-Cegarra J, Macarulla-Sanz E, Reina-De la Torre F. Factors involved in the "rotation" of the human embryonic stomach around its longitudinal axis: computer-assisted morphometric analysis. *J Anat.* 1999; 194(1): 61-69.
- Nebot-Cegarra J, Fábregas PJ, Campillo M. Separation between the digestive and the respiratory lumina during the human embryonic period: morphometric study along the tracheo-oesophageal septum. *J Anat.* 2001; 198(1): 117-24.
- Nebot-Cegarra J, Fábregas PJ, Sánchez-Pérez I. Cellular proliferation in the urorectal septation complex of the human embryo at Carnegie stages 13-18: a nuclear area-based morphometric analysis. *J Anat.* 2005; 207(4): 353-64.
- Noden DM, Trainor PA. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat.* 2005; 207(5): 575-601.
- Okano J, Suzuki S, Shiota K. Regional heterogeneity in the developing palate: morphological and molecular evidence for normal and abnormal palatogenesis. *Congenit Anom (Kyoto).* 2006; 46(2): 49-54.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. *Baltimore: National Library of Medicine website - Johns Hopkins University School of Medicine* [acceso 3 de Julio de 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
- O'Rahilly R, Müller F. Developmental stages in human embryos. 1<sup>st</sup> ed. Washington: Carnegie Institution of Washington; 1987.
- O'Rahilly R, Müller F. Chapter 13: The digestive system. In: Human embryology and teratology. 1<sup>st</sup> ed. New York: Wiley-Liss; 1992.p.139-150
- Potter AS, Potter SS. Molecular anatomy of palate development. *PLOS ONE.* 2015; 10(7): e0132662.
- Radlanski RJ. Prenatal craniofacial morphogenesis: four-dimensional visualization of morphogenetic processes. *Orthod Craniofacial Res.* 2003; 6(Suppl.1): 89-94.
- Radlanski RJ, Emmerich S, Renz H. Prenatal morphogenesis of the human incisive canal. *Anat Embryol (Berl).* 2004; 208: 265-71.

- Reiter R, Brosch S, Wefel H, Schlömer G, Haase S. The submucous cleft palate: Diagnosis and therapy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011; 75(1): 85-8.
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. 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*. 1999; Volume 59(1): 39-50.
- Rosen GD, Harry JD. Brain volume estimation from serial section measurements: a comparison of methodologies. *J Neurosci Methods*. 1990; 35(2): 115-24.
- Sadler TW. Embriología médica de Langman. 12ª ed. Buenos aires: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
- Sani FV, Hallberg K, Harfe BD, McMahon AP, Linde A, Gritli-Linde A. Fate-mapping of the epithelial seam during palatal fusion rules out epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Biol*. 2005; 285(2): 490-95.
- Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(7): 557-68.
- Schüpbach PM, Chamberlain JG, Schroeder HE. Development of the secondary palate in rat: a scanning electron microscopic study. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1983; 3(2): 159-77.
- Seelan RS, Mukhopadhyay P, Pisano MM, Greene RM. Developmental epigenetics of the murine secondary palate. *ILAR J*. 2012; 53(3-4): 240-52.
- Setó-Salvia N, Stanier P. Genetics of cleft lip and/or cleft palate: association with other common anomalies. *Eur J Med Genet*. 2014; 57(8): 381-93.
- Shiota K. Variability in human embryonic development and its implications for the susceptibility to environmental teratogenesis. *Birth Defects Research (Part A)*. 2009; 85(8): 661-6.
- Shiota K, Kosazuma T, Klung S, Neubert D. Development of the fetal mouse palate in suspension organ culture. *Acta Anat*. 1990; 137(1): 59-64.
- Shprintzen RJ, Siegel-Sadewitz VL, Amato J, Goldberg RB, Opitz JM, Reynolds JF. Anomalies associated with cleft lip, cleft palate, or both. *Am J Med Genet*. 1985; 20(4): 585-95.
- Smith TM, Lozanoff S, Iyyanar PP, Nazarali AJ. Molecular signalling along the anterior-posterior axis of early palate development. *Front in Physiol [Internet]*. 2013 [acceso 3 de Julio de 2016]; 3: 488-501. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539680/pdf/fphys-03-00488.pdf>
- Standring S. Chapter 34: Development of the face and neck. In: Gray's Anatomy. the anatomical basis of clinical practice. 39<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; Churchill-Livingstone; 2005.p.609-617.
- Stewart JM, Ott ME, Lagace R. Submucous cleft palate. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1971; 7(7): 64-6.

- Thyagarajan t, Totey S, Danton MJS and Kulkarni AB. Genetically altered mouse models: The good, the bad, and the ugly. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14(3):154-74.
- Tolarova MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet*. 1998; 75(2): 126-37.
- Twigg SRF, Wilkie AOM. New insights into craniofacial malformations. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(R1): R50-9.
- Vermeij-Keers C, Mazzola RF, Van der Meulen JC, Strickler M. Cerebro-Craniofacial and Craniofacial malformations: an embryological analysis. *Cleft palate J*. 1983; 20(2): 128-45.
- Walker BE, Fraser FC. Clousure of secondary palate in the three strains of mice. *J Embryol Exp Morphol*. 1956; 4: 176-89.
- Wang KY, Diewert VM. A morphometric analysis of craniofacial growth in cleft lip and noncleft mice. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1992; 12(3): 141-54.
- Wikipedia [database on the Internet]. Fundación Wikipedia, Inc; 2016 [último acceso 3 de julio de 2016]. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki>
- Wilkie AOM, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. *Nat Rev Genet*. 2001; 2(6): 458-68.
- Wong FK, Hägg U. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J*. 2004; 10(5): 331-6.
- Wragg LE, Klein M, Steinworth G, Warpeha R. Facial Growth accommodating secondary palate closure in rat and man. *Arch Oral Biol*. 1970; 15(8): 705-719, IN1-IN2.
- Wragg LE, Diewert VM, Klein M. Spatial relations in the oral cavity and the mechanism of secondary palate closure in the rat. *Arch Oral Biol*. 1972; 17(4): 683-90.
- Yasuda Y, Fujimoto T. The anterior half of mouse palatal shelf is elevated by a remodeling movement *Acta Anat (Basel)*. 1986; 125(1): 37-41.
- Yoon H, Chung IS, Young Seol E, Yun Park B, Woo Park H. Development of the lip and palate in staged human embryos and early fetuses. *Yonsei Med J*. 2000; 41(4): 477-84.
- Young A, Feeley E, Shah RM. Does the tongue play a role in the initial development of vertical palatal shelf in hamster? *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1991; 11(3): 146-55.
- Young NM, Wat S, Diewert VM, Browder LW, Hallgrimsson B. Comparative morphometrics of embryonic facial morphogenesis: implications for cleft-lip etiology. *Anat Rec*. 2007; 290(1): 123-39.
- Yu L, Gu S, Alappat S, Song Y, Yan M, Zhang X, Zhang G, Jiang Y, Zhang Z, Zhang Y and Chem YP. *Shox2*-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development*. 2005; 132(19): 4397-406.

- 
- Yu K, Karuppaiah K, Ornitz DM. Mesenchymal fibroblast growth factor receptor signalling regulates palatal shelf elevation during secondary palate formation. *Dev Dyn*. 2015; 244(11): 1427-38.
- Yu K, Ornitz DM. Histomorphological Study of palatal shelf elevation during murine secondary palate formation. *Dev Dyn*. 2011; 240(7): 1737-44.
- Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signalling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development*. 2002; 129(17): 4135-46.
- Zhou J, Gao Y, Lan Y, Jia S, Jiang R. Pax9 regulates a molecular network involving Bmp4, Fgf10, Shh signaling and the Osr2 transcription factor to control palate morphogenesis. *Development*. 2013; 140(23): 4709-18.
- Zimmerman EF, Clark RL, Ganguli S, Venkatasubramanian K. Serotonin regulation of palatal cell motility and metabolism. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1983; 3(4): 371-85.



Anexos





# Anexo 1

---

TABLAS DE LOS VALORES DEL VOLUMEN DEL SMS





VOLUMEN DEL SMS

TOTAL

Figura 30A

Embrión	Volúmen SMS (m <sup>3</sup> )
EC 17	83029505,0
EC 18	150760750,1
EC 19	189911620,6
EC 20	323297067,2
EC 21	345489072,0
EC 22	315406692,1
EC 23	517578692,8

TERCIO ANTERIOR

Figura 31A

Embrión	Volúmen ANT SMS (m <sup>3</sup> )
EC 17	33404993,8
EC 18	71994153,5
EC 19	34836472,4
EC 20	130749621,7
EC 21	169855492,0
EC 22	143266103,4
EC 23	41570686,0

TERCIO MEDIO

Figura 32A

Embrión	Volúmen ME SMS (m <sup>3</sup> )
EC 17	23321921,8
EC 18	52061262,1
EC 19	69946105,9
EC 20	119643372,8
EC 21	124601652,0
EC 22	133445572,3
EC 23	212459352,2

TERCIO POSTERIOR

Figura 33A

Embrión	Volúmen POST SMS (m <sup>3</sup> )
EC 17	26302582,4
EC 18	26705340,5
EC 19	85129042,3
EC 20	72904073,7
EC 21	51031922,0
EC 22	38695021,3
EC 23	26354865,6

## VOLUMEN DE LOS TERRITORIOS DEL SMS

### TOTAL

Figura 30B	Embrión	Volúmen Inf (km <sup>3</sup> )	Volúmen Mt (km <sup>3</sup> )	Volúmen Med (km <sup>3</sup> )
	EC17	28263586,16	33203244,00	21562675,04
	EC18	39713613,61	54525183,12	56521962,28
	EC19	53058703,93	68449951,75	68402965,18
	EC20	77198105,87	111184598,88	134914362,37
	EC21	102951680,80	112621631,80	129915762,60
	EC22	89252602,18	112535638,85	113618453,18
	EC23	141014963,69	159825487,49	216738244,70

### TERCIO ANTERIOR

Figura 31B	Embrión	Volúmen ANT Inf (km <sup>3</sup> )	Volúmen ANT Mt (km <sup>3</sup> )	Volúmen ANT Med (km <sup>3</sup> )
	EC17	9705986,56	11617786,40	12081220,72
	EC18	17435315,80	25870476,00	28688361,25
	EC19	12440001,29	9464223,91	12932247,74
	EC20	30934082,44	52343189,08	47472349,55
	EC21	46994236,00	62941512,00	59919745,20
	EC22	36097587,84	56598113,28	50570399,42
	EC23	9073352,47	7247628,16	25249705,67

### TERCIO MEDIO

Figura 32B	Embrión	Volúmen ME Inf (km <sup>3</sup> )	Volúmen ME Mt (km <sup>3</sup> )	Volúmen ME Med (km <sup>3</sup> )
	EC17	8150318,40	10830865,60	4340737,68
	EC18	14226818,10	20785960,10	17048487,01
	EC19	19002083,88	26130511,68	24813510,23
	EC20	27496113,90	41504923,94	50642334,64
	EC21	36183319,40	40768794,00	47649540,00
	EC22	39032417,47	48025056,00	46388098,56
	EC23	54968767,78	52736191,57	104754396,58

### TERCIO POSTERIOR

Figura 33B	Embrión	Volúmen POST Inf (km <sup>3</sup> )	Volúmen POST Mt (km <sup>3</sup> )	Volúmen POST Med (km <sup>3</sup> )
	EC17	10407281,20	33203244,00	21562675,04
	EC18	8051479,71	54525183,12	56521962,28
	EC19	21616618,76	68449951,75	68402965,18
	EC20	18767909,53	111184598,88	134914362,4
	EC21	19774125,40	112621631,80	129915762,60
	EC22	14122596,86	112535638,85	113618453,18
	EC23	76972843,44	159825487,49	216738244,70

## Anexo 2

---

MICROFOTOGRAFÍAS DE LOS FRAGMENTOS DE  
CADA SMS JUNTO CON LAS GRADILLAS DEL SMS DE  
CADA EMBRIÓN



DRETA

ESQUERRA

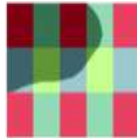
RE1-19



RE1-20



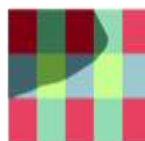
RE1-21



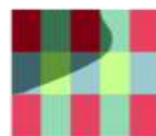
RE1-22



RE1-23



RE1-24

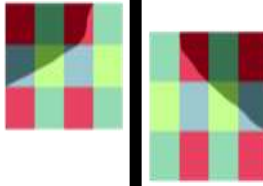


I

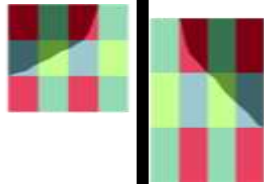
DRETA

ESQUERRA

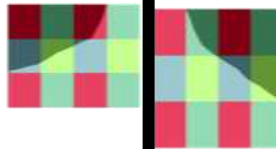
RE1-25



RE1-26



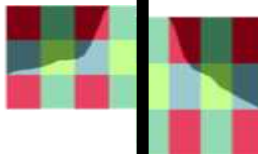
RE1-27



RE1-28



RE1-29



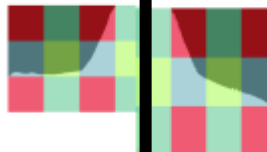
DRETA

ESQUERRA

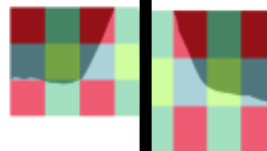
RE1-30



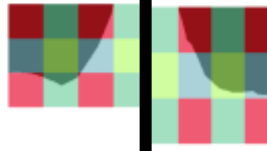
RE1-31



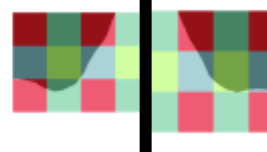
RE1-32



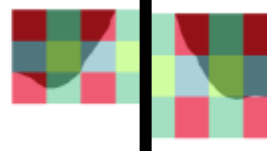
RE1-33



RE1-34



RE1-35



RE1-36





EC18

DRETA

ESQUERRA

FU20-19



FU20-20



FU20-21



FU20-22

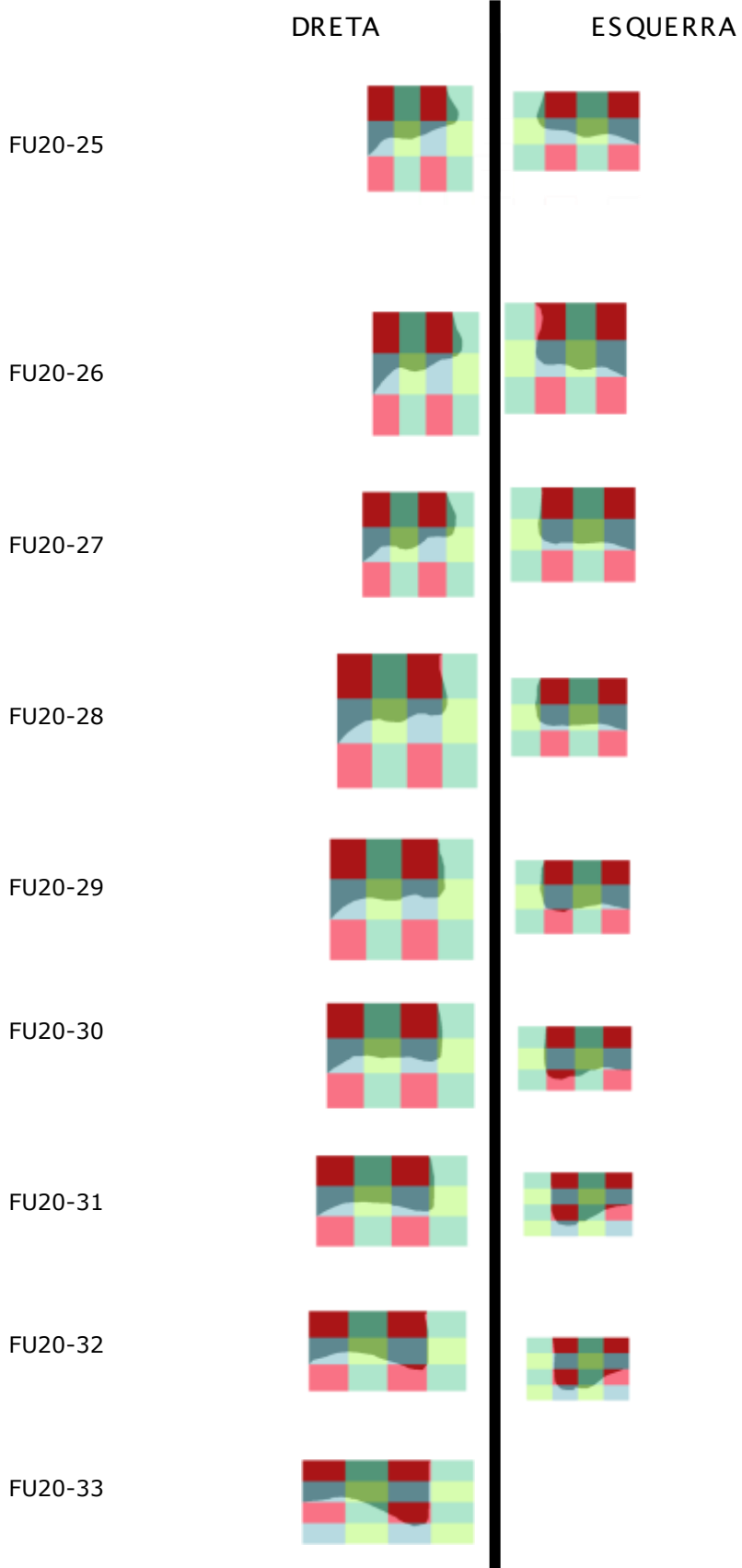


FU20-23



FU20-24





EC18

DRETA

ESQUERRA

FU20-34



FU20-35



DRETA

ESQUER RA

DU8-08



DU8-09



DU8-10



DU8-11



DU8-12



DU8-13



DU8-14

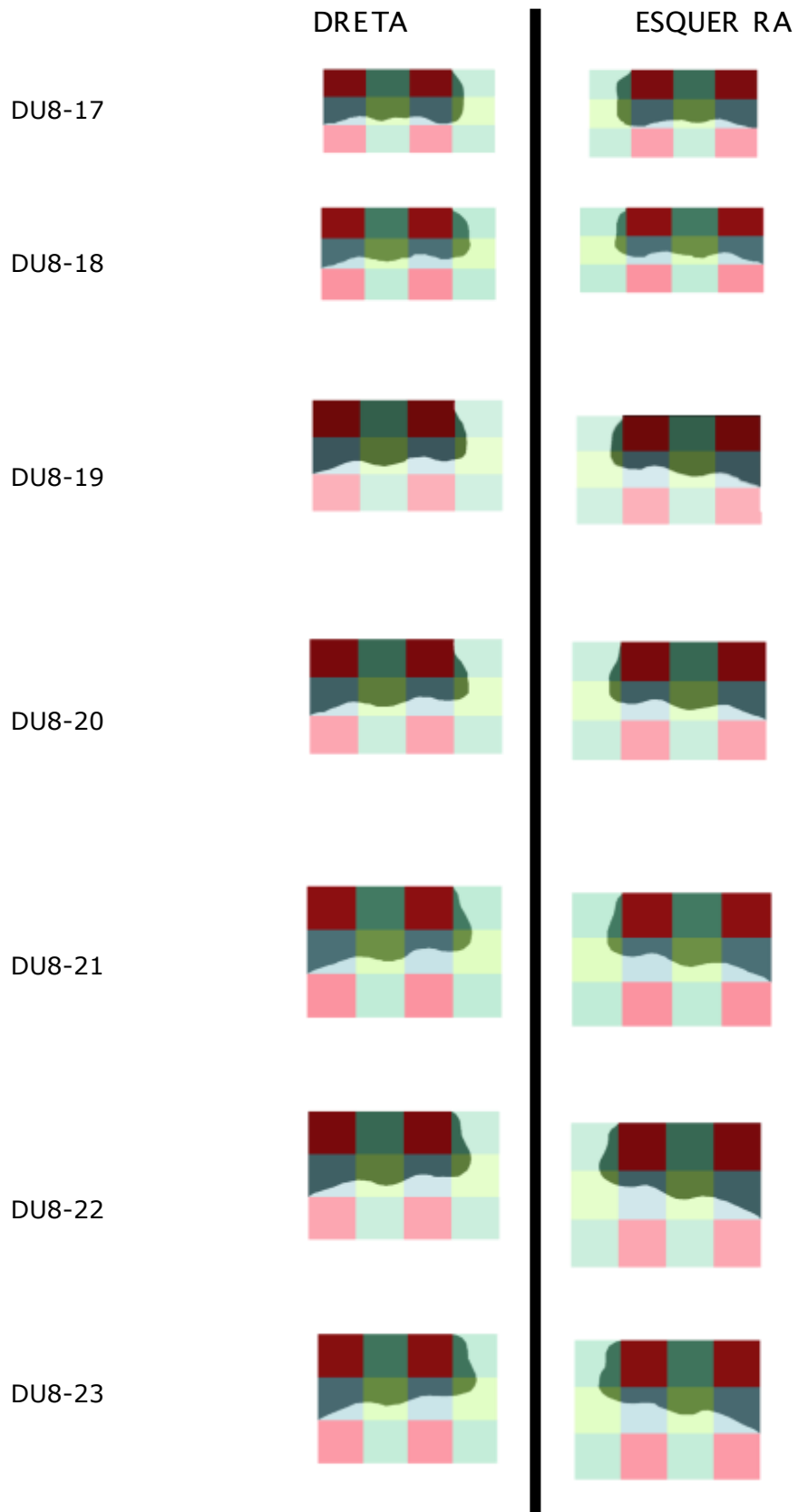


DU8-15



DU8-16





DRETA

ESQUER RA

DU8-24



DU8-25



DU8-26



DU8-27



EC20

DRETA

ESQUERRA

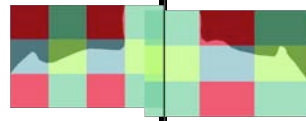
VAL1-22



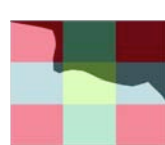
VAL1-23



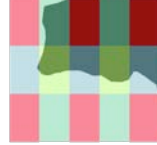
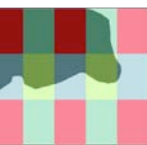
VAL1-24



VAL1-25



VAL1-26



VAL1-27



VAL1-28



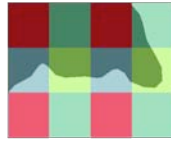
VAL1-29



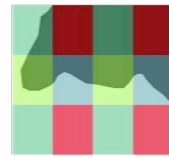
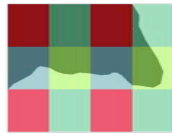
DRETA

ESQUERRA

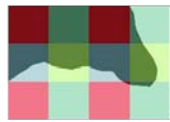
VAL1-30



VAL1-31



VAL1-32



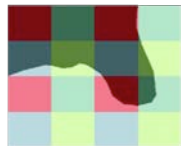
VAL1-33



VAL1-34



VAL1-35

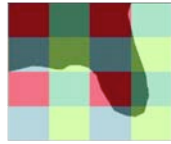




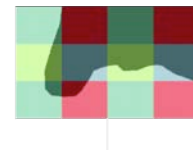
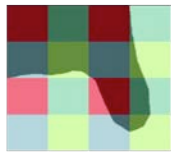
DRETA

ESQUERRA

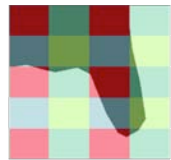
VAL1-36



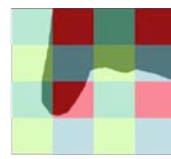
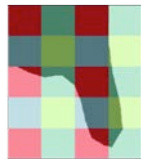
VAL1-37



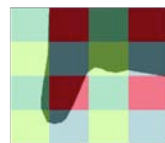
VAL1-38



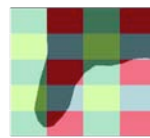
VAL1-39



VAL1-40



VAL1-41



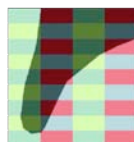
VAL1-42



DRETA

ESQUERRA

VAL1-43



VAL1-44



VAL1-45



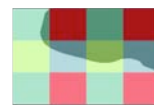
DRETA

ESQUERRA

PLA3-19



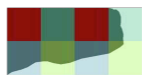
PLA3-20



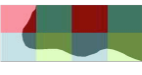
PLA3-21



PLA3-22



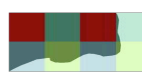
PLA3-23



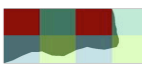
PLA3-24



PLA3-25



PLA3-26



PLA3-27



DRETA

ESQUERRA

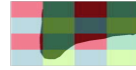
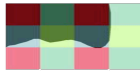
PLA3-28



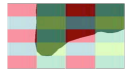
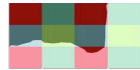
PLA3-29



PLA3-30



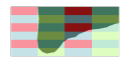
PLA3-31



PLA3-32



PLA3-33



PLA3-34



PLA3-35



PLA3-36



PLA3-37

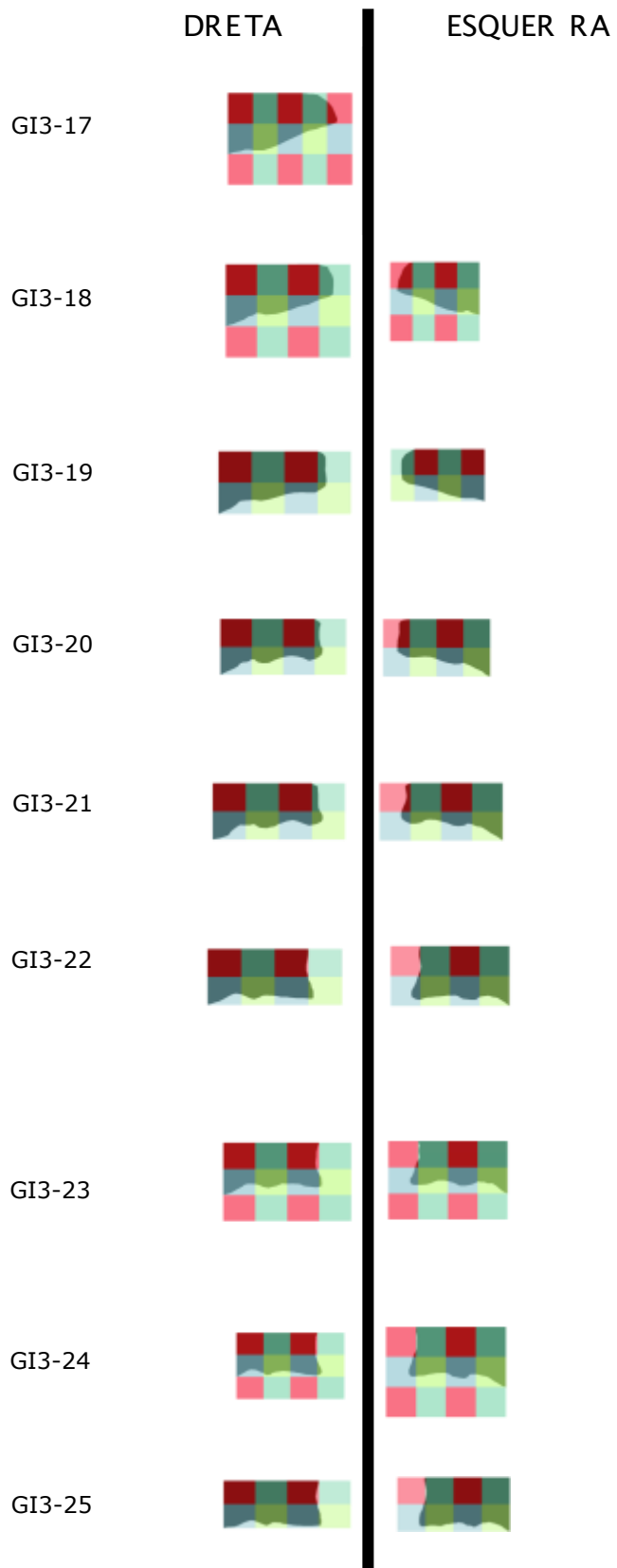


PLA3-38



PLA3-39





DRETA

ESQUER RA

GI3-26



GI3-27



GI3-28



GI3-29



GI3-30



GI3-31



GI3-32



GI3-33

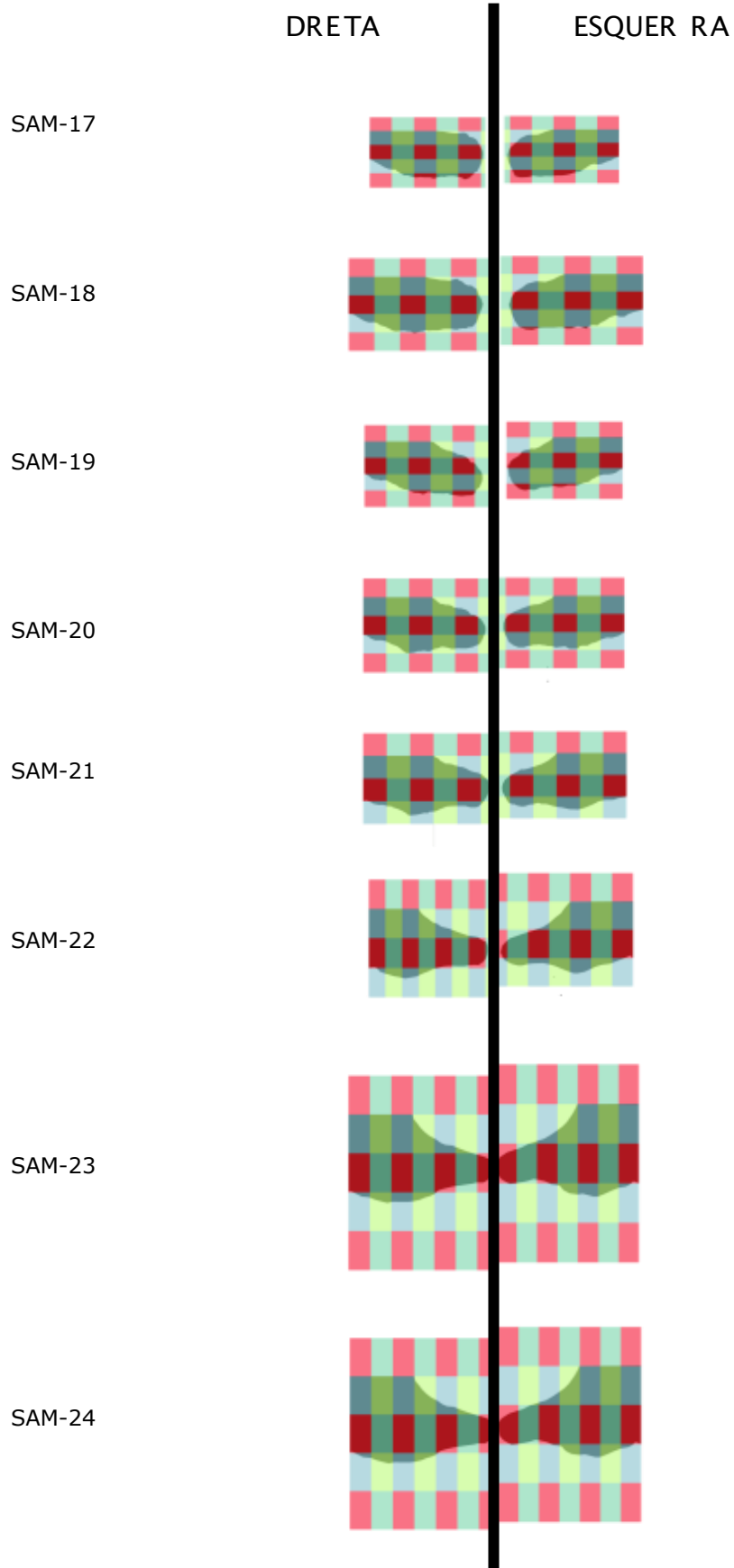


GI3-34



GI3-35

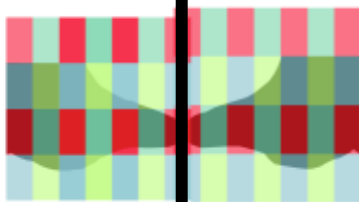




DRETA

ESQUER RA

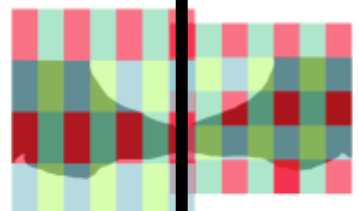
SAM-25



SAM-26



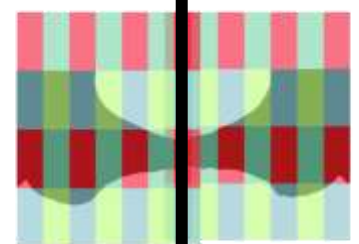
SAM-27



SAM-28



SAM-29



SAM-30

