



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **MECANISMOS MOLECULARES DEL DESARROLLO Y DESINTEGRACIÓN DEL CARTÍLAGO DE MECKEL. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LITERATURA**

**MONICA URREA FRANCO**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Odontología, Departamento de Salud Oral  
Ciudad, Colombia  
Mayo de 2016



**MECANISMOS MOLECULARES DEL  
DESARROLLO Y DESINTEGRACIÓN DEL  
CARTÍLAGO DE MECKEL.  
REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LITERATURA**

**MONICA URREA FRANCO**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Especialista en Ortodoncia y Ortopedia**

Directora:  
Clementina Infante Contreras DD  
Profesora Titular Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:  
Línea de Investigación en Genética del Crecimiento y Malformaciones

Grupo de Investigación:  
Crecimiento y Desarrollo Craneofacial

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Odontología, Departamento de Salud Oral  
Ciudad, Colombia  
Mayo de 2016



## Resumen

El cartílago de Meckel tiene su origen en células de cresta neural, que migran y originan el cartílago en el estadio 12.5 (E12.5) del desarrollo de ratas; es un cartílago hialino típico, con los condrocitos embebidos en una matriz rica en colágeno tipo II; corresponde a una estructura transitoria que inicia su degradación hacia E16; la porción proximal del cartílago da origen al yunque y martillo por osificación endocondral, la porción distal se incorpora a la sínfisis mandibular y en su porción media, se da origen al ligamento esfenomandibular por la parte más posterior, la anterior sufre un proceso de degradación. La presente revisión de literatura identificó 57 artículos en relación a los mecanismos moleculares del desarrollo y desintegración del MC. En relación al desarrollo se identifican en la literatura los genes *Prx1*, *Msx1*, *Sox9*, las vías de señalización End1, Shh y las moléculas FGF8, TGF $\beta$ , BMP, Hsp25, HGF, EGF, PTP, PTHrP y CTGF, que participan en el proceso modulando bien sea la migración de células de cresta neural hasta el primer arco faríngeo, la diferenciación de células mesenquimales a condroblastos, la maduración de éstos y su proliferación, hasta llegar al estadio final de su desarrollo, la hipertrofia; y que tiene un papel específico en determinado sitio y momento, que al ser modificado conduce a alteraciones en el tamaño y forma del cartílago de Meckel. Para la desintegración del cartílago de Meckel se identificó el papel de RANKL – OPG, marcadores de autofagia Beclin1 y LC3; factores pro apoptóticos Caspasas, p53 y anti apoptóticos Hsp70, Bcl2; MMP con actividad gelatinolítica (MMP 2 y MMP9); y la activación de macrófagos.

Cada uno de los mecanismo de señalización identificados tiene un papel espacial y temporal establecido, que puede llegar a ser alterado por factores externos o internos (otras moléculas que actúen concomitantemente) y modificar el desarrollo normal del cartílago de Meckel. En el proceso de degradación se establece que el cartílago de Meckel no participa en la formación mandibular sino que, la parte anterior de la porción media, la única que no tiene una función establecida, se degrada y desaparece sin sufrir osificación endocondral.

**Palabras clave:** Cartílago de Meckel, Crecimiento y Desarrollo, Desintegración, Mandíbula, Mecanismos moleculares.

**Key Word:** Meckel's Cartilage, Growth & Development, Disintegration, Mandible, Molecular Mechanisms.

## Abstract

Meckel's cartilage originates in neural crest cells that migrate and cause the cartilage in stage 12.5 (E12.5) of rat development, it's a typical hyaline cartilage, with chondrocytes embedded in a matrix rich in type II collagen; corresponds to a transient structure which initiates its degradation E16; the proximal portion of cartilage gives rise to the malleus and incus by endochondral ossification, the distal portion joins the mandibular symphysis and at its midportion, origin is given to the ligament sphenomandibular by the rear, the above undergoes a degradation process. This literature review identified 57 articles regarding the molecular mechanisms of development and disintegration of the MC. Regarding the development are identified in the literature the genes Prx1, Msx1, Sox9, signaling pathways End1, Shh and FGF8 molecules, TGF, BMP, Hsp25, HGF, EGF, PTP, PTHrP and CTGF, involved in the process modulating either the migration of neural crest cells to the first pharyngeal arch, the differentiation of mesenchymal cells to chondroblasts, maturation and proliferation of these, to the final stage of its development, hypertrophy; and it has a specific role in a certain place and time, which leads to be modified to alter the size and shape of Meckel's cartilage. For the disintegration of Meckel's cartilage role was identified RANKL - OPG, autophagy markers Beclin1 and LC3; Caspases pro apoptotic factors, p53 and anti-apoptotic Hsp70, Bcl-2; MMPs gelatinolytic activity (MMP 2 and MMP 9); and macrophage activation.

Each of the identified signaling mechanism has an established role in space and time that can be altered by external or internal factors (other molecules that act concomitantly) and modify the normal development of Meckel's cartilage. In the degradation process it states that Meckel's cartilage does not participate in the mandibular training but the front part of the middle portion, the one that does not have an established function degrades and disappears without undergoing endochondral ossification.

**Key Word:** Meckel's Cartilage, Growth & Development, Disintegration, Mandible, Molecular Mechanisms.

# Contenido

Pag.

Resumen .....	V
Lista de imágenes.....	9
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	9
Glosario.....	10
Introducción.....	13
1. Objetivos de la revisión .....	17
1.1 Objetivo general	
1.2 Objetivos específicos	
2. Metodología .....	18
Protocolo para la selección de artículos	
3. Resultados	
Capítulo 1. Generalidades del cartílago de Meckel.....	24
Capítulo 2. Mecanismos moleculares del desarrollo del cartílago de Meckel.....	29
2.1 Factor de crecimiento transformante Beta (TGF $\beta$ ).....	29
2.1.1 Proteína Morfogenética ósea (BMP).....	30
2.2 Vía de señalización Endotelina 1 (End1).....	33
2.3 Vía de Señalización Sonic Hedgehog.....	33
2.4 Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF).....	34
2.4.1 Factor de crecimiento fibroblástico- 3 (FGF-3).....	35
2.4.2 Factor de crecimiento fibroblástico-8 (FGF-8).....	36
2.4.3 Factor de crecimiento fibroblástico- 10 (FGF-10).....	36
2.5 Proteína de Shock térmico (Hsp).....	37
2.6 Proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP)....	38
2.7 Proteínas de Señalización CCN.....	38
2.7.1 CCN2 ó Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF).....	39
2.8 Proteína tipo Dipeptidil – peptidasa 6 (DPP 6).....	39
2.9 Expresión del gen <i>Hoxa2</i> .....	40
2.10 Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).....	40
2.11 Proteína Tirosin Fosfatasa (PTP).....	41
2.12 Factor de crecimiento epidermal (EGF).....	41
2.13 CTRP3/cartducin.....	42
2.14 Expresión del gen CD47.....	42
2.15 Expresión del gen <i>Fuz</i> .....	43
2.16 Matriz de Metaloproteinasas (MMP).....	43
2.17 Expresión de genes <i>Prx1</i> y <i>Prx2</i> .....	44
2.18 Expresión de Proteoglicanos (PG).....	45
2.19 Expresión de colágeno.....	46
Capítulo 3. Mecanismos moleculares de desintegración del cartílago de Meckel.....	47
3.1 Factores apoptóticos y antiapoptóticos.....	47
3.2 Autofagia y sus reguladores en el MC.....	49

3.3 Matriz de Metaloproteinasas (MMP) y actividad gelatinolítica.....	50
3.4 RANKL y Osteoprotegerina (OPG).....	52
3.5 Papel de los macrófagos.....	52
<b>Capítulo 4. Cartílago de Meckel y su relación con el desarrollo mandibular.....</b>	<b>53</b>
<b>4. Análisis de resultado.....</b>	<b>56</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>60</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexo 1 Homología entre estadios de desarrollo de humanos, ratas y pollos.....</b>	<b>68</b>

## **Lista de Imágenes**

- Imagen 1. Esquema de las porciones que conforma el MC.
- Imagen 2. Imagen microscópica de MC en embrión humano en estadio 13 de desarrollo.
- Imagen 3. Imagen microscópica de MC en embrión humano en estadio 17 de desarrollo.
- Imagen 4. Imagen microscópica de MC en embrión humano en estadio 22 de desarrollo.
- Imagen 5. Efecto de la sobreexpresión de Shh en mandíbulas de pollo.
- Imagen 6. Efectos de la inhibición de expresión de Shh en mandíbulas de rata en E13.5.
- Imagen 7. Esquema del proceso de activación de MMP a partir de condrocitos.
- Imagen 8. Esquema de la porción intramandibular del MC.

## **Lista de símbolos y abreviaturas**

- Cartílago de Meckel: MC
- Células de cresta neural: NCC
- Endotelina: End
- Factor de crecimiento de hepatocitos: HGF
- Factor de crecimiento epidermal: EGF
- Factor de crecimiento fibroblástico: FGF
- Factor de crecimiento transformante: TGF
- Hedgehog: Hh
- Matriz de metaloproteinasas: MMP
- Proteína de Shock térmico: Hsp
- Proteína morfogenética ósea: BMP
- Proteína relacionada con la hormona paratiroidea: PTHrP
- Proteína tipo Dipeptidil-peptidasa 6: DPP6
- Proteína tirosin fosfatasa: PTP
- Sonic Hedgehog: Shh

## Glosario

**Cartílago/Cartilage/ cartilagem.** Forma de tejido conectivo no vascular compuesto de condrocitos embebidos en una matriz que incluye condroitin sulfato y varios tipos de fibras colágenas. Los tres tipos principales son: cartílago hialino, fibrocartílago y cartílago elástico.

(Término MeSH: A non-vascular form of connective tissue composed of chondrocytes embedded in a matrix that includes chondroitin sulfate and various types of fibrillar collagen. there are three major types: hyaline cartilage; fibrocartilage; and elastic cartilage).

**Cartílago de Meckel/ Meckel's cartilage/ cartilagem de Meckel.** Es un cartílago hialino, formado en el proceso mandibular del primer arco branquial de los embriones de mamíferos, aparece antes de la formación de la mandíbula y sufre una completa degeneración antes del nacimiento. Descubierta por el anatomista alemán J.F. Meckel. Se considera que la porción intermedia del cartílago de Meckel es reabsorbida por células multinucleadas y desaparece durante el desarrollo embrionario, la porción más posterior del cartílago se transforma, por osificación endocondral, en huesecillos del oído, específicamente yunque y martillo; y su porción más anterior pasa a formar la sínfisis mandibular; el cartílago de Meckel no se considera un rudimento de mandíbula, ya que el tejido óseo mandibular es independientemente formado por osificación intramembranosa.

**Crecimiento y desarrollo/ Growth and Development/ crescimento e desenvolvimento.** Serie de cambios en forma, tamaño, componentes y función de un organismo que ocurren a través del tiempo a medida que el organismo pasa de su forma inicial a su tamaño completo y madurez.

(Término MeSH: The series of changes to the shape, size, components, and functions of an individual organism that occur over time as the organism progresses from its initial form to full size and maturity)

**Chondrogenesis/ Condrogenesis/ condrogênese.** Proceso de formación del tejido cartilaginoso.

(Término MeSH: The formation of cartilage. This process is directed by chondrocytes which continually divide and lay down matrix during development. It is sometimes a precursor to osteogenesis.)

**Desintegración/ Disintegration/ Desintegração.** Disociación, división, separación, pérdida de unión entre los elementos que conforman un todo, de modo tal que éste deja de existir.

**Diferenciación celular/ Cell differentiation/ Diferenciação Celular:** Proceso por el cual, a pesar de tener la misma información genética, cada célula de un mismo organismo, adquiere características especiales en cuanto a morfología y función, convirtiéndose en una célula especializada.

(Término MeSH: Progressive restriction of the developmental potential and increasing specialization of function that leads to the formation of specialized cells, tissues, and organs.)

**Humano/ Human/ Humano:** Especie de primate perteneciente a la familia de los homínidos.

(Término MeSH: Members of the species Homo sapiens.)

**Molecular/ molecular/ molecular.** De las moléculas o relativo a ellas. (Procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular, partiendo del estudio de las proteínas, macromoléculas activas en ellos).

**Ontogénesis/ Ontogenesis/ Ontogênese.** Comprende los procesos de desarrollo de un individuo desde el momento de su fecundación hasta su senescencia, pasando por su edad adulta; es la historia del cambio estructural de una unidad

**Pollo/ Chicken/ Frango:** Distintas especies de aves entre ellas el Gallus gallus en sus estadios de desarrollo inicial han sido utilizadas como modelos en estudios tanto del desarrollo, como en ciertas patologías o estudios quirúrgicos. Además, el hecho de ser las aves susceptibles a diversos virus se han convertido en objeto de interés para el consiguiente desarrollo de vacunas. El huevo de ave ofrece un mecanismo para el estudio del desarrollo embrionario y la patología de forma muy accesible y detallada, sirviendo como modelo para el estudio de múltiples aspectos ontogénicos y teratogénicos.

(Término MeSH: common name for the species Gallus gallus, the domestic fowl, in the family phasianidae, order galliformes. it is descended from the red jungle fowl of southeast Asia.)

**Proliferación celular/ Cell proliferation/ Proliferação celular:** La proliferación celular es el aumento del número de células por división celular. La proliferación celular es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos. Es característica de

cada tipo celular por lo que está controlada de forma muy específica. El proceso de diferenciación hace que cada tipo celular exprese un perfil de genes característico. Este perfil de expresión marca la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a diferentes estímulos.

(Término MeSH: All of the processes involved in increasing cell number including cell division.)

**Rata/ Mice/ Rato:** Es el roedor más comúnmente utilizado como modelo biológico y biomédico para la investigación científica, debido a su fácil manejo, tamaño apropiado para la crianza, periodos gestacionales cortos, alto número de crías, sistema inmune y genoma similar al humano, se ha hecho popular en los últimos años el uso de ratones transgénicos (aquellos que poseen un fragmento de ADN ajeno a su genoma) y ratones knock- out (aquellos que carecen de la expresión de un gen en particular).

(Término Mesh: The common name for the genus Mus. (Family of the order Rodentia containing 250 genera including the two genera Mus (MICE) and Rattus (RATS), from which the laboratory inbred strains are developed.

**Señalización/ Signaling/ Signage.** Se refiere a los sistemas de comunicación y celular que son determinantes fundamentales de la coordinación y las funciones de los distintos tipos celulares a través del control de la expresión génica y de la función de las proteínas.

# Introducción

La morfogénesis de los elementos craneofaciales en los vertebrados depende de una población de células de la cresta neural (NCC) <sup>(1)</sup>. Varias vías de señalización extracelular regulan la migración, supervivencia, proliferación y diferenciación de las NCC <sup>(2)</sup>. En mamíferos la morfogénesis mandibular comienza con la migración de las NCC hacia el 1er. arco faríngeo (PA1) y luego estas células ocupan parte del primer arco como ectomesénquima. El desarrollo posterior de este ectomesénquima depende de varias señales diferentes a los componentes de la NCC, tales como las provenientes del epitelio y el mesénquima mesodermal <sup>(3)</sup>. La expresión de Shh en el ectodermo oral y el endodermo faríngeo es esencial para la diferenciación temprana de la condensación cartilaginosa mandibular y por consiguiente el desarrollo del cartílago de Meckel <sup>(4)</sup>. El proceso mandibular del PA1, desarrolla algunos componentes óticos, el hueso mandibular, cartílagos de soporte y músculos <sup>(5)</sup>. El cartílago de Meckel (MC) es una estructura de soporte para la osificación del hueso mandibular <sup>(6)</sup>, el desarrollo del MC comienza como una condensación mesenquimal precartilaginosa <sup>(7)</sup>. Esta condensación se elonga para formar una barra de cartílago de Meckel compuesto tanto de NCC y otras células <sup>(8)</sup>. Mientras el cartílago se elonga, el hueso mandibular se comienza a osificar y rodea el MC. El MC se forma alrededor del estadio E12.5 en ratones, alrededor del E16 se inicia la desintegración en la región distal cerca al agujero mentoniano, en la zona proximal al proceso rostral <sup>(9)</sup>. Los mecanismos por los cuales esto ocurre permanecen aún sin esclarecer <sup>(10)</sup>, mientras otras partes pueden experimentar apoptosis <sup>(11)</sup>.

El cartílago de Meckel (MC) se ha considerado clásicamente una estructura transitoria, que desaparece durante el periodo fetal <sup>(12)</sup>; tiene su origen a partir de las células ectomesenquimales de la cresta neural, que migran al primer arco faríngeo para originar huesos craneales, dentina, pulpa y cemento dental, tejidos periodontales, ganglios sensoriales y el pigmento epidérmico <sup>(13)</sup>.

Las células ectomesenquimales se diferencian a condrocitos y se organizan en cartílago con forma de bastón bilateral, rodeado por pericondrio que lo separa de las células osteogénicas vecinas <sup>(14)</sup>.

Se considera que el MC tiene un importante papel como guía para la formación mandibular, gracias a estudios en ratas transgénicas, con alteraciones en la

expresión de *Tgfb2*, *Ctgf*, *Sox9*, *Egfr* y *Shh*, que muestran malformaciones o subdesarrollo del cartílago de Meckel y la mandíbula. <sup>(13)</sup>

Anatómicamente el MC tiene tres porciones, **la porción distal** que contribuirá al desarrollo de la sínfisis mandibular, **la porción media** se degradará y desaparecerá antes del nacimiento, por medio de procesos diferentes para su parte anterior y la parte posterior; la parte anterior de la porción media desaparece; mientras que en la parte posterior los condrocitos se diferenciarán en fibroblastos para dar origen al ligamento esfenomandibular y **la porción proximal** desarrolla por medio de osificación endocondral dos huesecillos del oído medio, martillo y yunque <sup>(13) (14)</sup>. Imagen 1.

Histológicamente corresponde a un cartílago hialino típico, en el que los condrocitos se encuentran embebidos en una matriz extracelular enriquecida con colágeno tipo II y proliferan en las lagunas de cartílago, y experimenta un crecimiento adicional resultante de la actividad de los condrocitos localizados en el pericondrio <sup>(13) (14)</sup>.

Se han desarrollado múltiples estudios en el intento de identificar los mecanismos moleculares responsables de la formación y degeneración del MC, donde se han identificado, gracias a modificaciones genéticas, genes y moléculas que tiene un papel importante en la formación y degradación del cartílago, entre ellos:

**Sox 9 (gen maestro de la condrogénesis)**, se ha identificado la necesidad de su expresión para la iniciación y desarrollo del MC, cuando su expresión es inhibida en las células de cresta neural, hay una ausencia completa del MC, así como de otros cartílagos como el cartílago nasal y precordial y presentan mandíbulas más pequeñas en comparación con los controles <sup>(14) (15)</sup>.

**Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)**, el análisis de su expresión en el MC en desarrollo muestra una alta expresión en la condensación mesenquimal del MC que apenas inicia el desarrollo, desde el extremo más anterior hasta el más posterior, la cual se reduce en el momento de la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, durante la maduración e hipertrofia de los condrocitos, hay una alta re-expresión del factor en la zona anterior y media <sup>(16)</sup>, en ausencia de expresión de CTGF se identifican alteraciones severas de la morfología del MC, incluyendo plegamiento del extremo proximal, que se asocia a su vez con micrognatismo <sup>(14)</sup>.

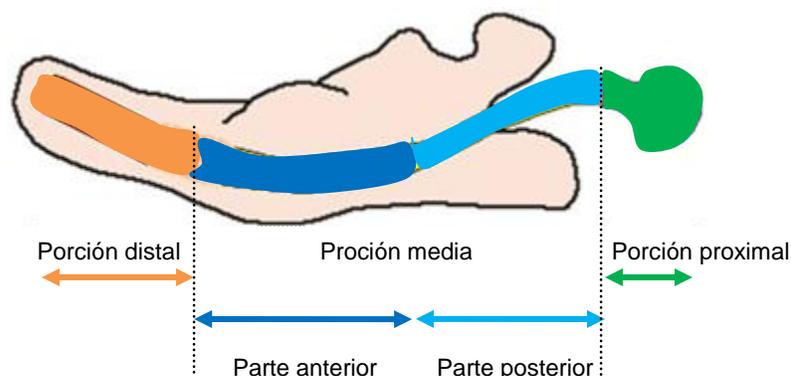
**Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)**. Estudios en pollos muestran que el bloqueo de la señalización del FGFR3, no afecta la formación inicial del MC pero si afecta la futura morfogénesis y elongación del mismo, por el truncamiento del extremo rostral del MC, estos efectos son mediados por la disminución en la proliferación de condroblastos y el daño en la diferenciación de las células condrogénicas que expresan *Sox 9*, de ahí la similitud de los resultados obtenidos

en experimentos para bloquear la expresión *Fgfr3* y la expresión del *Sox9*<sup>(17)</sup>; por otro lado, la sobreexpresión del *Fgf 10* también induce malformaciones en el MC, asociadas a un incremento en el tamaño<sup>(14)</sup>.

**La vía de señalización WNT**, tiene un alto nivel de expresión en el MC en los estadios iniciales de desarrollo, lo que indica su relación con la promoción de la condrogénesis, pero la expresión desaparece en el MC maduro, e inyecciones de WNT en estadios en los cuales no tiene expresión fisiológica, originan reducción o completa desaparición de la mandíbula y el MC<sup>(18)</sup>.

**Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) 2, 4 y 7** han mostrado también jugar un papel importante en el desarrollo primario del MC, después de lo cual su expresión disminuye, en casos de persistencia de la expresión de BMP, se han identificado alteraciones en la morfología del MC que va desde el engrosamiento del MC hasta su bifurcación, dependiendo de la zona y la población de células afectadas; todo esto en relación a la activación de *Msx1* y *Msx2*<sup>(19)</sup>.

Durante el proceso de desaparición del MC se han identificado moléculas indicadoras de autofagia, entre ellas, **Beclin1** que se expresa de manera incrementada en la zona de los condrocitos hipertróficos de la porción central, el **LC3** es identificada principalmente en condrocitos pre e hipertróficos de la porción central del MC, también se reporta la expresión de **caspasa 3** en la población lateral de los condrocitos hipertróficos a lo largo del área de degeneración del MC, lo cual indica que el proceso de autofagia ocurre en el MC y se da en el proceso de degradación, previo a la muerte de los condrocitos<sup>(20)</sup>.



**Imagen1.** Esquema de las tres porciones que componen el MC. Naranja; porción distal del MC, Azul porción media que a su vez se subdivide en otras dos partes parte anterior azul oscuro, parte posterior azul claro; verde: porción proximal. Tomado y modificado de Shimo et al.<sup>(16)</sup>.

Está claro el origen del cartílago de Meckel a partir de células mesenquimales ectodérmicas derivadas de la cresta neural, pero es aún controversial el papel que desempeña el cartílago en el desarrollo mandibular en mamíferos; en los demás vertebrados ya se ha identificado que todo el MC tiene un proceso de osificación endocondral para formar el hueso mandibular, y no participa en la formación del oído en estas especies<sup>(13)</sup>. En cuanto al papel del MC en el desarrollo mandibular de mamíferos existen corrientes opuestas de pensamiento, una de ellas plantea que éste parece ser una estructura innecesaria para la formación mandibular en los mamíferos, ya que los estadios de formación mandibular iniciales son independientes del MC, contrario al proceso experimentado por vertebrados no mamíferos; pero en contraparte existe la corriente que basándose en que la osificación y el desarrollo de la inervación mandibular se produce a lo largo del borde lateral del cartílago, lo postulan como una guía para la formación mandibular, teoría reforzada por estudios en ratones transgénicos que presentan malformaciones o poco desarrollo del MC simultáneamente con la mandíbula<sup>(13)</sup>.

Un tema más controversial aún está dado por el proceso de degradación del MC una vez se han formado las estructuras mandibular y ótica de los mamíferos, pues si bien existe consenso en cuanto a que su porción proximal contribuye al desarrollo de los huesillos del oído medio (yunque y martillo) y que su porción distal se osifica haciendo parte de la sínfisis mandibular, aún hay resultados controversiales en torno a, si en su porción media, simplemente se da un proceso de apoptosis y desaparece (existen estudios a favor y en contra de esta teoría de acuerdo a la evidencia de cuerpos apoptóticos encontrados en cartílago de Meckel en proceso de degradación en estudios sobre embriones animales y humanos) o se da otro tipo de modificación que contribuya a completar el desarrollo mandibular<sup>(20) (21)</sup>.

Es importante finalmente conocer el papel funcional que puede tener el MC en el desarrollo mandibular, debido a que alteraciones en esta estructura (como micrognatismos severos o malformaciones) podrían llegar a tener su origen en los mecanismos moleculares de desarrollo y degradación del cartílago.

### **Pregunta de investigación**

¿Cuáles son los mecanismos moleculares en el proceso de desarrollo y desintegración del Cartílago de Meckel y su relación con la formación mandibular?

# **1. Objetivos**

## **1.1 Objetivo General**

Revisar los mecanismos moleculares en el proceso de desarrollo y desintegración del Cartílago de Meckel y su relación con la formación mandibular, en la literatura científica actualizada de forma sistemática.

## **1.2 Objetivos específicos.**

1. Describir los mecanismos moleculares asociados al proceso de desarrollo del Cartílago de Meckel en vertebrados mamíferos.
2. Describir los mecanismos moleculares asociados al proceso de desintegración del Cartílago de Meckel en vertebrados mamíferos.
3. Describir la relación de los mecanismos moleculares del desarrollo y desintegración del cartílago de Meckel con la formación mandibular en vertebrados mamíferos.



## 2. Metodología

### **PASO 1.**

Para iniciar la identificación de estudios útiles para la revisión se hicieron dos grandes consultas así:

La primera realizada en el mes de septiembre de 2015 (8 de Septiembre, 10 de Septiembre y 28 de Septiembre)

### **Bases de datos usadas:**

1. MedLine
2. Science Direct
3. PubMed
4. J Store
5. Academic Search Complete

### **Revistas electrónicas (Relevantes en el tema):**

1. Development biology
2. Developmental dynamics
3. Journal of Oral Biosciences
4. Journal of dental research
5. Journal of anatomy
6. Early human development
7. Journal of anatomy and embriology
8. Journal of oral biosciences

### **Haciendo Uso de 10 ecuaciones:**

1. Meckel's cartilage AND growth and development
2. Meckel's cartilage AND development
3. Meckel's cartilage AND disintegration
4. Meckel's cartilage AND Molecular
5. Meckel's cartilage AND molecular mechanism
6. Molecular mechanisms AND development AND Meckel's cartilage
7. Molecular mechanisms AND disintegration AND Meckel's cartilage
8. Development AND disintegration AND Meckel's cartilage
  
9. Disintegration AND Meckel's cartilage AND relationship mandibular development
10. Meckel's Cartilage AND development AND Temporomandibular Joint

*Resultados: Obteniendo 57 resultados tras excluir los artículos repetidos*

**La segunda en los meses de Diciembre y Enero de 2015** (30 de Diciembre, 31 de Diciembre 2015, 01 de Enero y 02 de Enero de 2016)

**Bases de datos usadas:**

1. MedLine
2. Science Direct
3. PubMed
4. J Store
5. Academic Search Complete

**Haciendo uso de 22 ecuaciones:**

1. Meckel's Cartilage AND mice
2. Meckel's Cartilage AND chicken
3. Meckel's Cartilage AND human
4. Meckel's Cartilage AND signaling
5. Meckel's Cartilage AND cell proliferation
6. Meckel's Cartilage AND cell differentiation
7. Meckel's Cartilage AND mandible development
8. Meckel's Cartilage AND ontogenesis
9. Meckel's Cartilage AND chondrogenesis
10. Meckel's Cartilage AND mandibular chondrogenesis
11. Meckel's Cartilage AND mandibular ontogenesis
12. Meckel's Cartilage AND disappearance
13. Meckel's cartilage AND growth and development
14. Meckel's cartilage AND development
15. Meckel's cartilage AND disintegration
16. Meckel's cartilage AND Molecular
17. Meckel's cartilage AND molecular mechanism
18. Molecular mechanisms AND development AND Meckel's cartilage
19. Molecular mechanisms AND disintegration AND Meckel's cartilage
20. Development AND disintegration AND Meckel's cartilage
21. Disintegration AND Meckel's cartilage AND relationship mandibular development
22. Meckel's Cartilage AND development AND Temporomandibular Joint

*Resultados: Obteniendo 104 resultados tras excluir los artículos repetidos*

En total en bases de datos y revistas electrónicas se obtuvieron 161 artículos, de los cuales se recuperó el resumen, usado como primer filtro: título y resumen

Usando la lista de bibliografía de artículos y capítulos de libros relevantes en el tema y realizando búsqueda por autores que fueron identificados como importantes en esta área se obtuvieron 22 artículos.

Teniendo como elegibles 183 artículos

## PASO 2.

De 183 artículos elegibles, debieron ser excluidos 38 artículos por la imposibilidad para ser conseguidos en formato de texto completo.

En las bases de datos de la universidad y por solicitud a la hemeroteca nacional se rescataron 145 artículos en texto completo, que se sometieron a un nuevo filtro teniendo en cuenta el formato “valoración de estudios, cumplimiento de inclusión y exclusión”.

Artículo/autores/revista/año/idioma	Artículos de investigación: -básica experimental. -aplicada, -revisiones de literatura	Base de datos de donde se extrajeron los artículos/ otras fuentes	Periodo de búsqueda/ 1980 - 2016	¿En qué idiomas fueron buscados?	Revista arbitrada de donde se extrajeron los artículos	Ecuación de búsqueda	Fecha de búsqueda	Revisor No. 1 (Mónica Urrea) Revisor No. 2 (Clementina Infante)	O t r o
-------------------------------------	---	---	----------------------------------	----------------------------------	--	----------------------	-------------------	--	------------------

145 artículos fueron sometidos a la evaluación por medio del formato “valoración de estudios, cumplimiento de inclusión y exclusión” \*\* a la luz de las condiciones planteadas inicialmente:

### *Criterios de inclusión:*

- Artículos publicados desde 1980 a la actualidad
- Artículos publicados en inglés, español o portugués
- Estudios realizados en humanos, pollos, ratas y ratones.

### *Criterios de exclusión:*

- Estudios realizados en peces, anfibios y moscas
- Artículos no específicos para cartílago de Meckel

Ante este filtro fueron excluidos 34 artículos debido a:

- No abordar el tema de la presente revisión: 23 artículos
- Usar modelos diferentes a los aceptados en los criterios de inclusión: 7 artículos
- Tratar de evolución del cartílago de Meckel y no abordar el tema de su desarrollo o desintegración en el ámbito molecular: 3 artículos
- No corresponder a un artículo sino una publicación como comentario de editor: 1 artículo
- Corresponder a una publicación en un idioma diferente a los aceptados para inclusión: 1 artículo en francés

## PASO 3.

Teniendo entonces 111 artículos como elegibles, fueron leídos en su totalidad, con el fin de identificar su utilidad teniendo en cuenta la descripción detallada de la metodología del artículo y su contribución a los objetivos del estudio (mecanismo

moleculares de **desarrollo** y **desintegración** del cartílago de Meckel y su **relación con el desarrollo mandibular**); para esto se realizó una descripción del contenido de cada referencia, construyendo un resumen de cada artículo teniendo en cuenta:

- Introducción
- Propósito principal del artículo
- Metodología utilizada
- Resultados principales
- Conclusiones

En esta etapa se excluyeron 50 artículos debido a:

- No contribuir a los objetivos del trabajo por no abordar específicamente el tema del cartílago de Meckel: 46 artículos
- Usar modelos diferentes a los aceptados en los criterios de inclusión: 4 artículos.

Teniendo 61 artículos elegidos, en texto completo y cumpliendo con los criterios de inclusión

#### **PASO 4.**

A los 57 artículos en texto completo elegidos finalmente para la revisión se les somete a un análisis de calidad y se les agrupa por temas (teniendo en cuenta los tres objetivos del trabajo) y por subtemas de acuerdo al tema específico abordado.

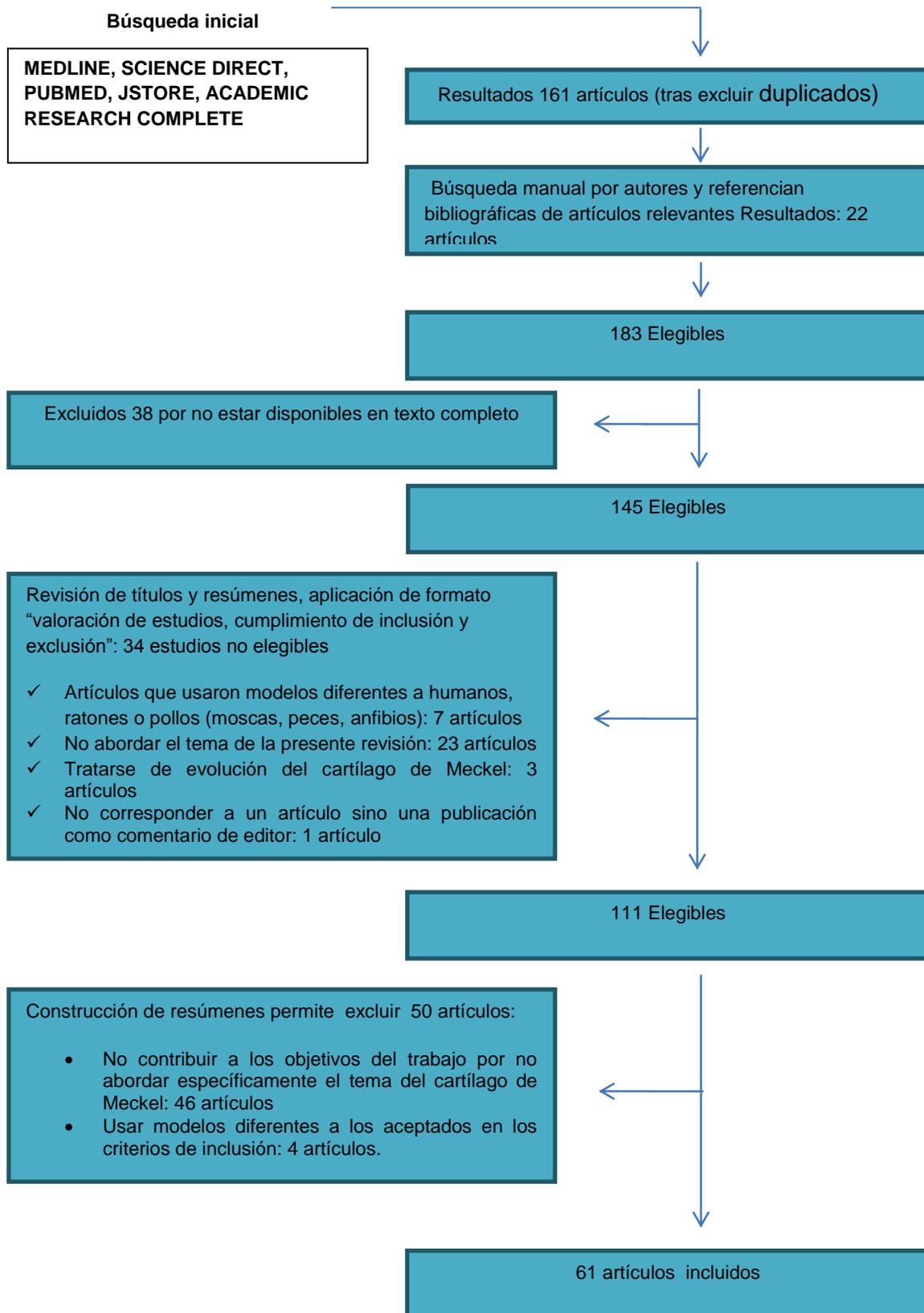
Formato de evaluación de calidad\*\*:

Título	Tipo de estudio	Diseño de estudio	Información sobre resultados de acuerdo a los objetivos	Calidad metodológica/ grado de recomendación
--------	-----------------	-------------------	---	--

Ante el cuál resultaron:

- 38 artículos útiles para describir el desarrollo del cartílago de Meckel. 33 con recomendación fuerte y 4 con recomendación débil.
- 17 artículos que son útiles para describir la desintegración del cartílago de Meckel. 14 con recomendación fuerte y 2 con recomendación débil.
- 4 artículos que son útiles para describir la relación del cartílago de Meckel con la mandíbula. Con recomendación Fuerte.
- 2 artículos que son útiles para la introducción.

*\*\* Los formatos utilizados para la elección de los estudios fueron definidos de común acuerdo por las dos investigadoras, una vez el investigador #1 (Mónica Urrea Franco) realizó el diligenciamiento de los mismos para cada uno de los artículos de acuerdo a la etapa del proceso, el investigador #2 (Clementina Infante) realizó la revisión de los mismos como par revisor.*



## 3. Resultados

### Capítulo 1. Generalidades del Cartílago de Meckel.

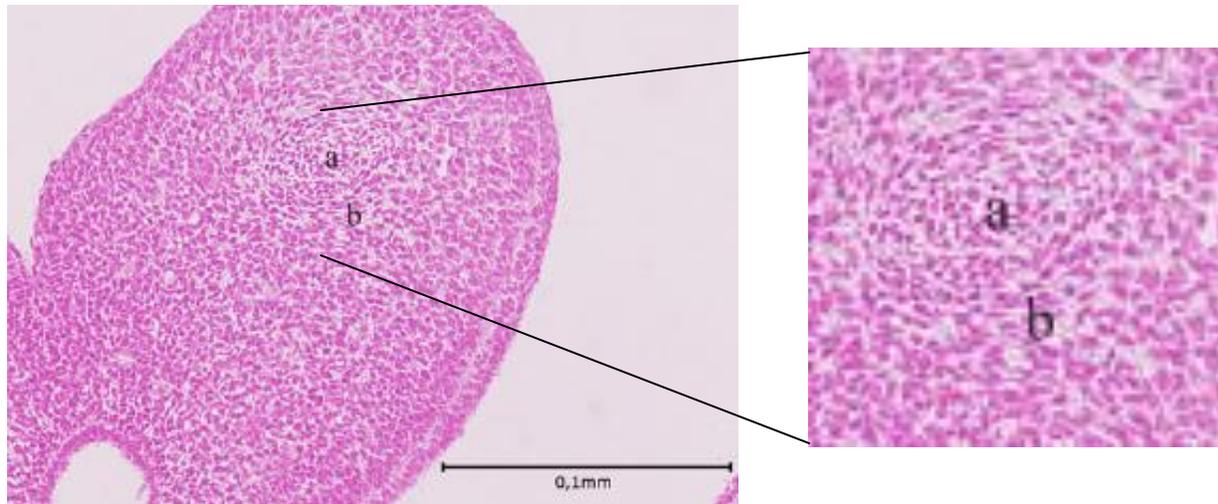
El cartílago de Meckel fue descubierto por el anatomista alemán Johann Friedrich Meckel II, en el volumen IV de su trabajo denominado “Manual de anatomía humana (*Handbuch der menschlichen Anatomie*), publicada entre 1815 y 1820, realiza la primera descripción del cartílago de la mandíbula embrionaria, denominado posteriormente MC<sup>(13)</sup>.

Tiene su origen a partir de células ectomesenquimales de la cresta neural; las células de la cresta neural son una población de células pluripotentes, que dan origen a una gran cantidad de células. La cresta neural es inducida en la región dorsal de los pliegues neurales, entre el ectodermo superficial y la placa neural, proceso en el que están involucradas proteínas como BMP, FGF y WNT, en este proceso de inducción, las células de la cresta neural sufren un proceso de transformación epitelial a mesenquimal, que las conduce a la delaminación y consecuente migración a los sitios específicos; las células de la cresta se dividen en cuatro poblaciones axiales distintas que se denominan células de la cresta neural craneales, cardíacas, vagues y del tronco; a su vez, las células de cresta neural craneales se subdividen en CCN prosencéfalicas, CCN mesencéfalicas y CCN romboencefalicas, lo que se logra gracias a la acción de los centros de organización neuroepitelial y FGF, ácido retinoico y WNT, los cuales especifican el carácter de las células localizadas en estos tres centros; posteriormente, se establecen dos dominios, definidos por la expresión de genes *Hox* así, una zona *Hox* positiva a lo largo del eje craneal caudal que define el neuroepitelio del romboencéfalo posterior, y una *Hox* negativa en prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo anterior, estableciéndose los dominios específicos de la cresta neural, un dominio rostral *Hox* negativo (que origina el esqueleto facial) y uno caudal<sup>(14)</sup>.

A la llegada de las células de cresta neural craneales, su actividad proliferativa origina los arcos branquiales y la prominencia frontonasal, el primer arco branquial y la prominencia dan origen la mayoría de las estructuras de la cara <sup>(14)</sup>.

La condensación de células mesenquimales craneales se da a nivel de primer molar (lo que constituye el primer paso para la formación del MC), las células mesenquimales se diferencian en condroblastos y se organizan en un cartílago en forma de vara bilateral, antes de cualquier señal de osificación mandibular <sup>(14)</sup> <sup>(22)</sup>.

Wyganowska et al., llevaron a cabo un estudio en embriones y fetos humanos, a cerca de los cambios morfológicos experimentados por el MC durante el desarrollo embrionario, identificaron la aparición del MC como una condensación oval de células pequeñas que están rodeadas por una capa de células fusiformes, en embriones en estadio de desarrollo 13 (que corresponde a 32 días de vida intrauterina, con una longitud de 4 a 6 mm) <sup>(22)</sup>. Imagen 2



**Imagen 2.** Tinción con hematoxilina-eosina de un corte mandibular de embrión humano de 32 días de VIU, en el que se aprecia la primera aparición del MC como una condensación de células pequeñas (a) rodeadas por una capa de células fusiformes(b), Tomado de Wyganowska et al. <sup>(22)</sup>.

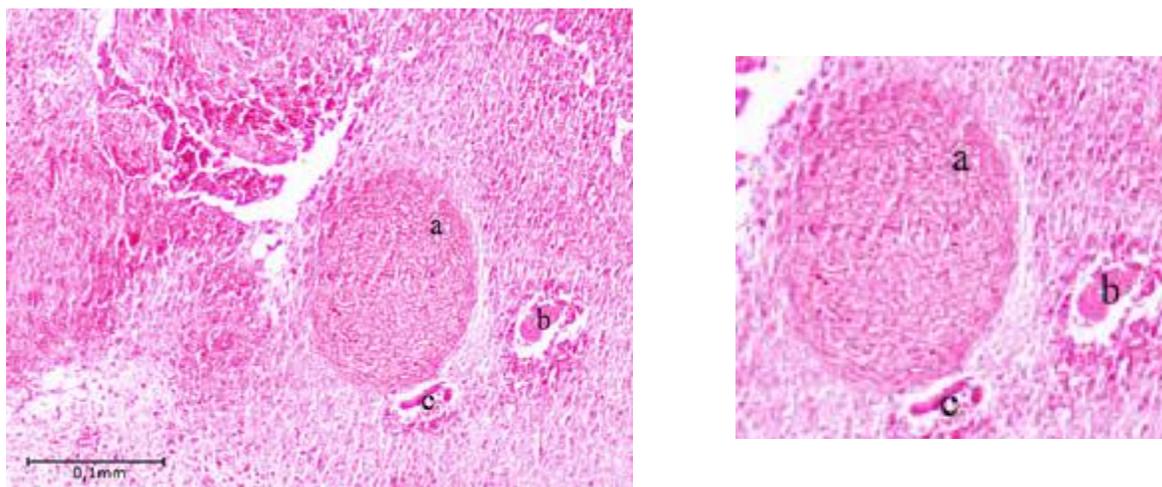
Para el estadio 14 (33 días de VIU, 5 a 7 mm) se observa que el primordio del MC se ha desplazado medialmente en el proceso mandibular; en el primordio se observan espacios intercelulares que rodean un centro claramente definido <sup>(22)</sup>.

Durante el estadios 15 (36 días de VIU ) las células ovoides que forman el MC están densamente agrupadas y son evidentemente más pequeñas que la capa de células que las rodean, la condensación de células centrales representan el centro del cartílago en desarrollo, mientras que la zona libre de células en la periferia corresponde al pericondrio en desarrollo <sup>(22)</sup>.

En el estadio 16 (39 días de VIU), en cartílago se extiende a lo largo del esbozo del hueso mandibular <sup>(22)</sup>.

En el estadio 17 (correspondiente a 41 días de VIU) en MC se extiende desde la vesícula ótica hacia la sínfisis mandibular, en el margen inferior del MC y en proximidad al nervio mentoniano es evidente el centro de osificación de la mandíbula; los cartílagos contralaterales se separan en la línea media por una delgada capa de mesénquima; cerca a la vesícula ótica la condensación mesenquimal asemeja la forma del yunque y el martillo<sup>(22)</sup>. Imagen 3.

Para el estadio de desarrollo 18 (44 días de VIU), el MC se observa agrandado y se flexiona hacia arriba en la región de la sínfisis, el espacio entre los cartílagos se amplía en el borde inferior; las fibras de los músculos geniogloso, genihioideo y milohioideo están unidos en el borde inferior del MC. El yunque y martillo son cartílagos visibles<sup>(22)</sup>.



**Imagen 3.** Estadio de desarrollo 17, se observa ya el inicio de la calcificación mandibular (c), entre el MC (a) y el nervio mentoniano (b). Tomado de Wyganowska et al.<sup>(22)</sup>.

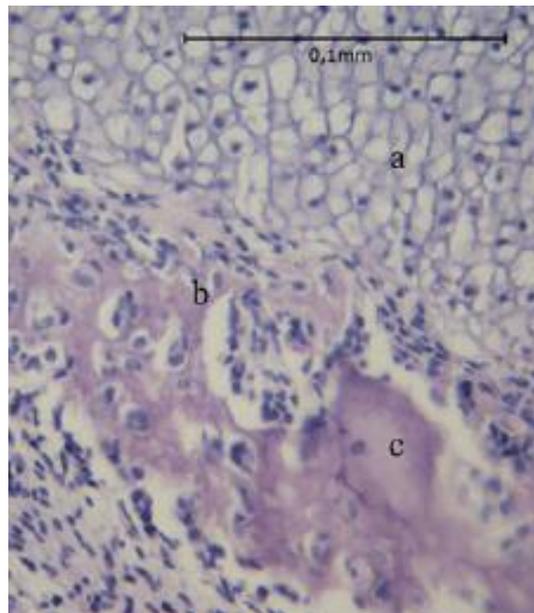
Durante los estadios de desarrollo 19 y 20 (46 a 49 días de VIU) los cartílagos opuestos se amplían en la zona de la sínfisis y continúan separados por una capa de mesénquima, en el extremo posterior, el MC se flexiona hacia abajo y se continúa con el martillo, la osificación mandibular se observa a lo largo del borde lateral del MC; a los 49 días, se observa osificación hacia la región mental, zona en la cual, el cartílago empieza a ser rodeado por hueso a lo largo de la superficie anterior y posterior<sup>(22)</sup>.

En el estadio 21 (51 días de VIU), en la región de la sínfisis, donde el MC está agrandado, proyecciones del hueso mandibular en desarrollo entran en el cartílago, el cual pierde su contorno regular y suave, aunque cartílago y hueso en desarrollo están separados por una capa de mesénquima<sup>(22)</sup>.

Estadio 22 (correspondiente a 53 días de VIU) los extremos de los cartílagos contralaterales en la parte posterior se separan aún más, mientras que en la zona de la sínfisis se mantienen en estrecho contacto, las células pericondrales contralaterales casi se tocan, solo algunas células fusiformes están visiblemente separadas (es el contacto más estrecho de ambos lados durante todo el desarrollo); en el sitio del centro

de osificación primaria, el MC está envuelto por hueso caudal, lateral y ventralmente <sup>(12)</sup>, la mandíbula en proceso de osificación permanece en estrecho contacto con el cartílago en el borde inferior. Las células del MC se tornan vacuoladas y acarióticas <sup>(22)</sup>. Imagen 4.

En el estadio 23 (56 días de VIU), el MC se alarga, se observan condrocitos hipertróficos, principalmente en proximidad al centro de osificación primaria, hay vasos sanguíneos dentro del MC, las células se redondean y se tornan altamente vacuoladas y acarióticas. Empieza la aparición de células policarióticas (indicando en inicio de la formación de las cavidades medulares típicas de la osificación endocondral); el periostio mandibular se mantiene en estrecho contacto con el cartílago. Los cartílagos contralaterales entran en contacto; en el sitio del centro de osificación primaria los cartílagos están rodeados por hueso completamente <sup>(22)</sup>, en la superficie caudal y lateral del MC se evidencian condrocitos hipertróficos y aumento de la densidad de la matriz del cartílago, en su base inicia la osificación pericondral <sup>(12)</sup>.



**Imagen 4.** Estadío 22. Se observan las células acarióticas (a), prolongaciones óseas penetrando en el cartílago (b). (c) corresponde a la lámina ósea. Tomado de Wyganowska et al. <sup>(22)</sup>.

Durante el periodo fetal se inicia el proceso de degradación del MC, éste inicia en la semana 9<sup>a</sup> de VIU, en este momento el MC es maduro, transversalmente tiene forma redondeada, rodeado de periostio; para el final de la 10<sup>a</sup> semana, los músculos se mueven desde el cartílago hasta la mandíbula (los músculos pierden su inserción al MC), el MC pierde su contacto con la mandíbula y su sección transversal disminuye, en la sínfisis el MC entra en contacto con el proceso de osificación de la sínfisis mandibular, así, el segmento distal se incorpora a la mandíbula <sup>(12)</sup>. Avanza la vacuolización de los condrocitos en el borde interno, el pericondrio se adelgaza

progresivamente y gran cantidad de células policarióticas aparecen en el centro del MC y los condrocitos pierden su forma (todo corresponde al proceso de osificación pericondral, que se da alrededor de caninos e incisivos laterales; en el sitio de osificación primaria el MC se aplana. Durante la semana 11 el hueso es visible en el lado anterior y posterior del MC; en la semana 12 la osificación del cartílago es visible principalmente en su extremo inferior<sup>(22)</sup>, se da la degeneración de un gran número de condrocitos hipertróficos cuyas áreas se ocupan por estructuras vasculares<sup>(12)</sup>; solo unas pequeñas áreas del MC permanecen sin osificar cerca de la línea media mandibular<sup>(12)</sup>.

El proceso de degradación del MC comprende además la reabsorción de la matriz de cartílago calcificada por parte de los condroclastos (células fagocíticas multinucleadas), regulada por el sistema inmune<sup>(13)</sup>.

En cuanto a los cambios histológicos que involucra la degeneración del MC, se ha observado la transición del colágeno tipo II a colágeno tipo I y el inicio de la expresión de colágeno tipo X y fosfatasa alcalina

## Capítulo 2.

### Mecanismos moleculares del desarrollo del cartílago de Meckel.

Los mecanismos moleculares de desarrollo y desintegración del MC, comprenden un amplio campo de investigación que se ha venido desarrollando en las últimas décadas, consiguiendo hallazgos importantes gracias a la manipulación genética de ratas y pollos, que han permitido esclarecer algunos aspectos del desarrollo embrionario y en específico del desarrollo mandibular y del cartílago de Meckel, en relación a moléculas y genes implicados en el proceso, así como las consecuencias de la supresión o sobre expresión de los mismos.

Como producto de la revisión de 38 artículos relacionados con el objetivo de identificar los mecanismos moleculares de desarrollo del MC, se obtiene información acerca de genes como *Prx1*, *Prx2*, *Hand2*, *Msx1*, *Msx2*, *Col2a1*, *Hoxa2*, *Fuz*; vías de señalización claves como SHH y End1, y moléculas en general TGF  $\beta$  y específicamente BMP2, BMP4, FGF8, FGF10, CTGF (CCN), Hsp, PTHrP, DPP6, HGF, PTP, EGF, CTPR3, CD47, MMP, proteoglicanos y colágeno, relacionadas con el proceso de desarrollo del MC incluyendo eventos ocurridos desde la migración de las células de la cresta neural hasta que los condrocitos llegan a su estadio maduro e inicia su proceso de degradación.

#### 2.1 Factor de crecimiento transformante Beta (TGF $\beta$ )

Los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  median una gran cantidad de actividades biológicas que incluyen la diferenciación y

proliferación celular, la formación de matriz extracelular, lo que indica su importante papel en el desarrollo embrionario; durante la condrogénesis se estimula la proliferación e inhibe la diferenciación terminal de condrocitos, lo que se demuestra con la ablación del gen *Tgfb2* (de las tres isoformas del TGFβ 1,2 ó 3 en mamíferos, únicamente la ablación de *Tgfb2* causa defectos mandibulares) que ocasiona anomalías en el desarrollo mandibular, que incluyen mandíbulas pequeñas, procesos coronoides y condilares disminuidos y un proceso angular desaparecido <sup>(23)</sup>.

Experimentos llevados a cabo por medio de ratas mutantes con supresión de la expresión de *Tgfbr2* en todas las células de cresta neural, estudio realizado por Oka et al., muestra en las observaciones histológicas, en E13.5 el pericondrio del MC presenta disrupciones; en E14.5 la forma del MC está alterada presentando áreas curvas, de espesor y formas no uniformes; los defectos en el MC y el hueso mandibular en ratas modificadas genéticamente puede deberse a que <sup>(23)</sup>:

- La expresión de *Msx1* está reducida; los genes *Msx* son conocidos por su papel en la regulación del destino de las células de cresta neural y ontogénesis durante el desarrollo craneofacial <sup>(23)</sup>.
- La pérdida de la expresión de TGF-β en el pericondrio resulta en un subdesarrollo del mismo y consiguientes malformaciones en el MC <sup>(23)</sup>.
- La expresión del *Ctgf*, que fisiológicamente existe en el pericondrio del cartílago de Meckel, se ve reducida en ratas mutantes para *Tgfb2*; induciendo una disminución en la proliferación celular; en este aspecto se observó además que el CTGF exógeno puede rescatar los defectos de proliferación celular en el MC en estas ratas <sup>(23)</sup>.
- La expresión *Ihh* (marcador de la maduración de condrocitos) estuvo expandida en las ratas mutantes, indicando también una alteración en el proceso de diferenciación de los condrocitos del MC <sup>(23)</sup>.

### 2.1.1 Proteína Morfogenética ósea (BMP)

Las Proteínas morfogenéticas óseas, son factores de crecimiento multifuncionales, pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta <sup>(24)</sup> <sup>(19)</sup>, a excepción de la BMP1; son proteínas altamente inductoras de formación de hueso endocondral y cartílago, controlan la diferenciación de condrocitos y promueven su hipertrofia <sup>(25)</sup>; tanto en desarrollo embriológico como posnatal; además funcionan mediando la morfogénesis y diferenciación gracias a la transmisión de señales inductivas en la interacción epitelio mesénquima <sup>(19)</sup> <sup>(26)</sup>, en vertebrados e invertebrados; son expresados en múltiples tipos de células como monocitos, células epiteliales y células mesenquimales; en procesos como el

desarrollo de extremidades, osificación endocondral, odontogénesis entre otros<sup>(24)</sup>.

Algunas BMP como la BMP-2, BMP-4 y BMP-7 inducen la diferenciación de células mesenquimales multipotentes hacia un linaje celular condrogénico o hacia un linaje de célula precursora de osteoblastos, gracias a la inducción de la expresión de *Sox9*<sup>(27)</sup>.

BMP actúa mediante la unión a receptores tipo I y II (receptores de membrana serina/ treonina, kinasa) conduciendo a la activación de la vía de señalización Smad y MAPK<sup>(25)</sup>.

Noggin y el factor de crecimiento epidermal (EGF) se cuentan entre los antagonistas de las BMP; Noggin se une a BMP-2, BMP-4, BMP-7 y previene su señalización. En ratas mutantes en las que se restringe la expresión *Noggin*, el desarrollo del MC se altera, observándose muy agrandado con respecto a los controles con expresión *Noggin* normal, en la porción media del MC, el proceso de diferenciación condrogénica continúa y se da osificación endocondral en lugar de ocurrir la degeneración<sup>(25)</sup>; el EGF actúa como un inhibidor de la diferenciación de condrocitos tanto endógena como ectópicamente por su competencia para la vía de señalización Smad1<sup>(26)</sup>, experimentación en cultivos de micromasa mandibular con aplicación de EGF exógeno, demuestran que con el incremento de sus concentraciones el MC es progresivamente (dosis dependiente) más pequeño y menos maduro, sus componentes se evidencian acortados, más delgados y menos maduros (constatado por la reducción de la cantidad de condroitin sulfato en presencia de EGF), en comparación con el MC en ausencia de EGF exógeno el cuál exhibe una morfología normal<sup>(26)</sup>.

Las proteínas morfogenéticas óseas representan un factor de crecimiento crucial en el desarrollo del MC gracias a su actividad condrogénica, pero bajo estrictos parámetros de expresión espacial y temporal definidos, cuyas alteraciones conllevan a malformaciones o ausencia del cartílago<sup>(26)</sup>.

Wang y colaboradores examinaron la expresión de BMP-2, BMP-4 y BMP-7 en el MC, en ratas, por medio de hibridación in situ, lograron identificar la expresión fisiológica de los genes *Bmp*<sup>(25)</sup> que codifican para los factores mencionados:

*Bmp 2.*: Es expresada en el MC en el estadio E11.5, expresión que aumenta en E12.5, ya para E13.5 la expresión en el cartílago de Meckel ha desaparecido y solo se observa un bajo nivel de expresión en los alrededores del mesénquima mandibular y el hueso mandibular<sup>(25)</sup>.

*Bmp 4.*: No se observó expresión de *Bmp4* en ningún estadio en el MC, si hubo expresión en los alrededores del mesénquima mandibular y el hueso mandibular en estadios 11.5, 12.5 y 16.5<sup>(25)</sup>.

Barlow y Francis identificaron la expresión de *Bmp4* en pollos; para el HH 20, su expresión es restringida al epitelio de la región media del primordio mandibular y la parte anterior del primordio maxilar, observando una correlación entre la expresión epitelial del *Bmp4* y la expresión mesenquimal de *Bmp-2*, *Msx1* y *Msx2*; para el estadio HH24 (antes de la diferenciación del cartílago) la expresión epitelial de *Bmp-4* esta confinada aún a la parte media del primordio mandibular y el extremo distal del primordio maxilar; durante el estadio HH 28, tanto epitelio como mesénquima expresan *Bmp-4*, la cual es asociada con la expresión de *Bmp2*, *Msx1* y *Msx2* <sup>(19)</sup>.

*Bmp7*: es hallada en el MC y los alrededores del mesénquima mandibular en niveles bajos durante E11.5 y E12.5; para E13.5 su expresión desaparece del MC y se detecta únicamente en el hueso mandibular adyacente, tampoco se evidencia su expresión en etapas posteriores E14.5 y E16.5 tanto para MC como para estructuras adyacentes <sup>(25)</sup>.

Ensayos en ratas mutantes, con supresión de la actividad de *Noggin*, demuestran una actividad BMP, en el MC, extendida en periodos de desarrollo donde normalmente no son expresadas, básicamente después del estadio E13.5, conllevando a alteraciones en el desarrollo y morfología del cartílago de MC; así como el papel de la BMP en el desarrollo del MC es crucial para la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos y estimulación de la proliferación condrocítica, gracias a su expresión en estadios tempranos, también es indispensable su supresión para permitir un desarrollo normal del MC, y el destino final de los condrocitos, principalmente en la porción media del cartílago <sup>(25)</sup>.

Además de una especificidad en la expresión temporal de los factores de crecimiento, también existe una expresión espacial específica, cuya alteración conlleva a pérdida o malformaciones de las estructuras relacionadas, en este caso el MC específicamente, Barlow y Francis realizaron experimentación en pollo, con aplicación ectópica de BMP-2 y BMP-4 en el primordio mandibular; cuando se realizó la aplicación de BMP-2 en el estadio HH 20, se evidencia una pérdida total del cartílago de Meckel si el factor es localizado lateral al primordio, de manera que la activación de *Msx1* es débil a lo largo del mismo; cuando la localización del factor se realiza muy medial en el primordio, el MC está presente pero con alteraciones de forma, se observan en él excrescencias, debido a que el dominio *Msx1* se extiende lateral y posteriormente; la manipulación de la expresión en el primordio maxilar tiene también repercusiones sobre el MC, cuando el factor es aplicado en él, se observa la bifurcación del cartílago de Meckel (donde la rama bifurcada se orienta hacia el primordio maxilar) debido a la expresión de *Msx1* en el extremo distal del primordio mandibular <sup>(19)</sup>.

Wang et al., sostienen que si bien la señalización BMP es esencial para un desarrollo normal del MC (principalmente su porción media), ya que la supresión de la expresión BMP conlleva a la detención de la diferenciación condrogénica, también es indispensable el cese de su expresión en el periodo establecido, ya

que una elevación en su expresión o mantenimiento de su actividad altera el desarrollo del cartílago, manteniendo la diferenciación condrogénica e induciendo la osificación endocondral de la porción media del MC <sup>(25)</sup>.

## 2.2 Vía de señalización Endotelina 1 (End1)

End 1 es un iniciador clave del patronaje dorsal-ventral de las células de la cresta neural, la alteración en su expresión conduce a una transformación homeótica de estructuras mandibulares en maxilares; estudios experimentales con delección de la expresión *End1* resultan en una hipoplasia severa del MC (28).

## 2.3 Vía de Señalización Sonic Hedgehog

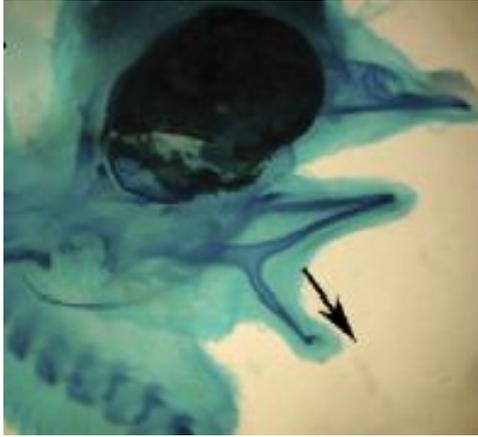
La familia de moléculas de señalización Hedgehog se ha conservado a través de la evolución con tres proteínas: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) y el Desert Hedgehog (Dhh); es una vía esencial para el desarrollo facial y craneal, ya que la pérdida de su función ocasiona una gran variedad de defectos craneofaciales, como holoprosencefalia, ciclopía entre muchas otras <sup>(24)</sup> <sup>(29)</sup>; además tiene un importante papel morforegulatorio en el desarrollo embrionario, participando en la proliferación, supervivencia y diferenciación celular y en el patrón de formación de numerosos tejidos embrionarios (sistema nervioso, extremidades, pulmón) <sup>(29)</sup>.

El importante papel de la señalización Hh en el desarrollo embrionario craneofacial es corroborado por estudios experimentales con ratas nulas para *Shh* que presentan una ausencia completa de estructuras esqueléticas craneofaciales; la aplicación de anticuerpos anti *Shh* en pollos exhibe de manera similar, una significativa reducción del desarrollo mandibular <sup>(30)</sup>.

La remoción de la señalización Hh tiene un papel crucial en el desarrollo posmigratorio craneofacial, es decir en la proliferación y supervivencia de las células mesenquimales, lo que indica que las alteraciones sobre el MC en rata nulas para *Shh* son debidas a un insuficiente número de células derivadas de la cresta hacia el arco mandibular, por otro lado, teniendo en cuenta que el *Shh* apoya la supervivencia celular en las primeras etapas de desarrollo y promueve su proliferación en etapas posteriores, su ausencia repercute en un incremento de la apoptosis que ocasiona una aplasia en el MC <sup>(30)</sup>, mientras que su sobreexpresión, estudiada en embriones de pollo conduce a la bifurcación del cartílago de Meckel, el cartílago ectópico se localiza en una angulación de 45 grados con respecto al principal <sup>(29)</sup>. Imagen 5.

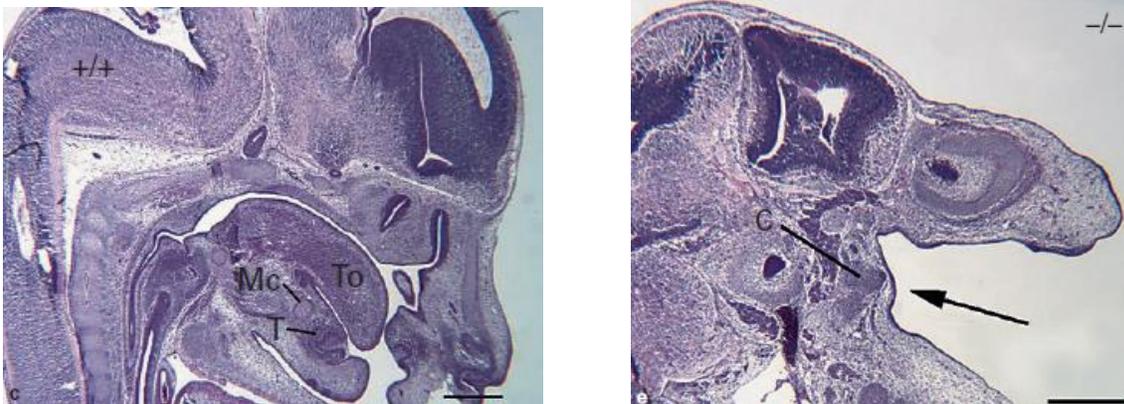
Melnick et al., experimentaron con ratas nulas para *Shh*, haciendo observaciones comparativas con ratas normales, con respecto al desarrollo craneofacial, en donde encontraron anomalías craneofaciales en todos los estadios analizados

para las ratas *Shh* nulas, que soportan el papel indispensable de *Shh* en el desarrollo del MC, las estructuras mandibulares en general <sup>(30)</sup>.



**Imagen 5.** Muestra la formación de cartílago ectópico (Flecha) adyacente al cartílago de Meckel, en casos de sobreexpresión de *Shh*. Tomada de Haworth et al. <sup>(29)</sup>.

Para el estadio 13.5 en ratas normales se evidencia la presencia del MC, primordio de lengua y brotes dentales, mientras que en las ratas *Shh* nulas solamente es visible una pequeña condensación mesenquimal en la zona del arco mandibular <sup>(30)</sup>. Imagen 6.



**Imagen 6.** Comparación de las estructuras presentes en la región mandibular durante E13.5, en ratas normales (izquierda) donde se evidencia el Cartílago de Meckel (Mc), el primordio de la lengua (To) y los brotes dentales (T); y ratas *Shh* nulas que en la misma zona presentan solamente una pequeña condensación celular (C). Tomado de Melnick et al. <sup>(30)</sup>.

Durante E15.5 en ratas normales ya se evidencia el hueso mandibular alrededor del MC, mientras en las ratas experimentales todas las estructuras mandibulares están ausentes <sup>(30)</sup>; para E18.5 las ratas normales exhiben todas las estructuras mandibulares bien diferenciadas pero las ratas Shh nulas solo presentan un remanente de arco mandibular no diferenciado <sup>(30)</sup>.

Con el fin de identificar el papel del Shh en la condrogénesis del MC, por medio de experimentación sobre mandíbulas embrionarias tratadas con ciclopamina, Bringas et al., encontraron resultados que permiten sugerir que la señalización Hh es esencial para la transición de condroblastos a condrocitos en la región anterior del MC, pero no en la posterior, en E15; mientras que el ensayo con mandíbulas en E12, no arroja diferencias en el desarrollo de las estructuras ni en el promedio de proliferación celular también medido en este momento <sup>(30)</sup>; lo que permite concluir que la diferenciación Hh es esencial principalmente en las primeras etapas del desarrollo del MC (La señalización Hh regula la condrogénesis del MC de una manera “etapa- dependiente”, debido al efecto de su ausencia, evidentemente menor, en las etapas de desarrollo más avanzadas) <sup>(29)</sup>.

## **2.4 Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)**

Los factores de crecimiento fibroblástico representan una familia de moléculas de señalización implicadas en varios aspectos del desarrollo craneofacial de los vertebrados; se ha identificado su esencial papel en la morfogénesis mandibular (media en las interacciones epitelio-mesénquima que promueven el crecimiento, participa en la formación de las bolsas faríngeas y en la supervivencia del mesénquima mandibular) <sup>(17)</sup>.

### **2.4.1 Factor de crecimiento fibroblástico- 3 (FGF-3)**

Experimentos en embriones de pollos llevados a cabo por Havens et al., que incluyeron la alteración en la expresión de FGF-3, muestran, en estadíos de desarrollo HH17 a 20, defectos en el crecimiento y extensión del MC, incluyendo truncamiento del extremo rostral y acortamiento del cartílago y en algunos casos, ausencia completa de los hueso mandibulares, en sí, no hay una afectación de la formación inicial del MC, pero si hay una alteración en la promoción de su morfogénesis y elongación; para estadíos más tempranos, HH15, se presenta una baja tasa de supervivencia, aquellos embriones que sobreviven tienen las características antes mencionadas para estadíos posteriores de desarrollo; debido a que no se identificaron cambios en los patrones de expresión de los genes reguladores, se considera que las alteraciones del desarrollo mandibular se deben a alteraciones en el MC que a la vez controla el desarrollo mandibular, lo cual se corrobora con la disminución de la expresión de Sox-9 que origina la formación de una condensación condrogénica más pequeña de lo normal para el MC (debido a

la disminución en el número de células proliferativas), sumado a un aumento en el número de células apoptóticas en el mesénquima<sup>(17)</sup>.

#### **2.4.2 Factor de crecimiento fibroblástico-8 (FGF-8)**

El Factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF-8) juega un importante papel en el desarrollo de hueso intramembranoso y endocondral (debido a que promueve la diferenciación de condrocitos hipertróficos terminales, paso clave en la formación de hueso endocondral)<sup>(30)</sup>.

Durante la embriogénesis, el *Fgf8* induce la expresión de los genes homeobox *Lhx6*, *7*, *Dlx1*, *-2* y *Barx1*, en ausencia de su expresión, el primer arco faríngeo es gravemente reducido en tamaño y la expresión de los genes homeobox se pierde<sup>(29)</sup>.

La pérdida de la expresión del *Fgf8* a partir del ectodermo oral, resulta en un truncamiento del desarrollo mandibular, debido a que éste es indispensable para la supervivencia y proliferación de las células mesenquimales del primer arco faríngeo<sup>(29)</sup>.

FGF8 juega un papel importante en el desarrollo del arco mandibular, lo que se evidencia por la ausencia o hipoplasia severa del MC en ratas con *Fgf* hipomorfo o por una ablación de éste en el primer arco faríngeo<sup>(30)</sup>, resultando en la formación de mandíbulas pequeñas, extensa apoptosis del mesénquima mandibular y pérdida de elementos esqueléticos en la región caudal de la mandíbula (incluyendo la ATM)<sup>(17)</sup>; Melnick et al., lo identificaron como una molécula de rescate para los fenotipos alterados de MC en mandíbulas cultivadas con ciclopamina, ya que observaron que en aquellas muestras tratadas con FGF 8 exógeno se observa tinción con rojo alizarin de los dos tercios anteriores del MC, lo que indica mineralización, y en la porción posterior, que no se altera por la ciclopamina; con la aplicación del FGF exógeno se observa un aumento del tamaño de la zona, además, la zona del pericondrio, intacta en el MC de ratas normales, se ve interrumpido por la penetración del hueso mandibular osificando hacia el MC<sup>(30)</sup>.

El FGF-8 actúa sinérgicamente con el Shh en el desarrollo del esqueleto facial, FGF-8 regula positivamente la expresión del *Hh* y Shh regula la expresión de *Fgf8* (ya sea induciendo su expresión o manteniendo el dominio de su expresión)<sup>(30)</sup>.

#### **2.4.3 Factor de crecimiento fibroblástico- 10 (FGF-10)**

El factor de crecimiento fibroblástico 10 es expresado en el mesénquima mandibular, jugando un importante papel en el desarrollo dental y del hueso

mandibular; Terao et al., experimentaron con la sobre expresión del *Fgf10*, en cultivos de micromasa mandibular de ratas, identificando la asociación espacial de éste con la sobre- expresión de los genes que regulan el desarrollo del MC (entre ellos *Sox 9*, *Col2a1*), el experimento les permitió observar que la alteración en la expresión del FGF10 conlleva a una alteración de tamaño (elongación) y forma del MC cuando la sobre- expresión de FGF 10 se realiza en la porción lateral de la mandibular, mientras que cuando el área afectada es la porción media mandibular no se observan alteraciones morfológicas del MC, indicando el papel del FGF-10 durante la morfogénesis temprana, gracias al control de diferenciación celular en la parte lateral del proceso mandibular en desarrollo <sup>(31)</sup>.

## 2.5 Proteína de Shock térmico (Hsp)

Su expresión ha sido hallada en el cartílago de las placas de crecimiento (en roedores), éstas son expresadas por células (en mamíferos) en respuesta al estrés biológico incluyendo altas temperaturas, infecciones virales, químicos tóxicos, inflamación, tumores malignos, alcohol <sup>(32)</sup>, exposición a metales, fuerzas mecánicas y hormonas <sup>(11)</sup>; aunque éstas proteínas están también presentes en células no sometidas al estrés, indicando su papel fisiológico en la función celular normal, que incluye plegamiento de proteínas y transporte de proteínas entre organelos <sup>(11)</sup>; se ha identificado la Hsp 70 en condrocitos del MC a través del desarrollo del mismo, indicando que ésta no solo se relaciona con el fenómeno de degradación de condrocitos <sup>(32)</sup>.

Durante E12, estando presente la condensación mesenquimal que formará el MC, donde se evidencia una débil inmunoreactividad para Hsp25; para E13 con la porción intermedia del MC desarrollada y los condrocitos bien diferenciados, hay una inmunoreactividad moderada en el citoplasma de los condrocitos; en E14, hay una intensa inmunoreactividad para Hsp 25 en los condrocitos de la porción anterior e intermedia del cartílago mas no en la porción posterior, donde no hay inmunoreactividad; para E15 la inmunoreactividad disminuye sustancialmente, en E16 ya la inmunoreactividad ha desaparecido <sup>(32)</sup>.

Shimada et al., experimentaron con la inhibición de la expresión de Hsp 25, los defectos en el MC fueron evidentes, incluyendo ausencia completa de la porción anterior y media del MC, lo que no ocurrió con la parte posterior; estos hallazgos indican el papel de la Hsp 25 en el desarrollo del MC, consistente en diferenciación de condroblastos desde la condensación mesenquimal condrogénica y la proliferación de condrocitos y síntesis de su matriz, sin tener ningún papel biológico en la conversión de condrocitos <sup>(32)</sup>.

## **2.6 Proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP)**

Fue identificada inicialmente como un factor patógeno en hipercalcemia humoral, pero su producción ya ha sido detectada en el desarrollo de células endoteliales, músculos, glándulas adrenales, queratinocitos, sistema nervioso central y páncreas; tiene un importante papel como factor de crecimiento y diferenciación de cartílago, ya que ante la alteración de su expresión, se presentan anomalías generalizadas en la osificación endocondral y disminución de la proliferación de condrocitos<sup>(33)</sup>, un fenotipo condrodisplásico caracterizado por un cráneo en forma de cúpula, mandíbula corta y extremidades desproporcionadamente cortas<sup>(34)</sup>.

Análisis inmunohistoquímicos llevados a cabo por Yamazaki et al., en 1997, con modelo de ratas, muestran la relación espacial y temporal de la expresión de la PTHrP con las etapas de desarrollo del MC, durante su estudio identificaron que la porción rostral del cartílago no presenta expresión de PTHrP en ningún momento del desarrollo embrionario, pero si es expresada en la zona de condrocitos hipertróficos (maduros) con un fenotipo proliferativo, en E13 se observa una débil expresión de PTHrP en condrocitos del MC; en E16, correspondiente al estadio de elongación e iniciación de la osificación endocondral del MC, la PTHrP es localizada en los condrocitos del área que muestra crecimiento intersticial y en y alrededor de los núcleos de condrocitos hipertróficos sometidos a osificación endocondral y para E18 PTHrP se localiza en los osteoblastos adyacentes a la matriz calcificada y ha desaparecido de los condrocitos del MC, estos hallazgos le permiten a los autores considerar que la PTHrP funciona como una señal de direccionamiento para la prolongación de la supervivencia de células condrocíticas<sup>(33)</sup>, lo que se corrobora con los hallazgos de Ishii.-Suzuki et al., quienes experimentando con ratas nulas para PTHrP, hallaron cambios dramáticos en el destino de la porción media del MC, la cual en condiciones fisiológica origina el ligamento esfenomandibular, en ratas mutantes se evidencia como se degenera y rodea por una capa de matriz ósea, debido a que la deficiencia de PTHrP altera la dirección de la diferenciación celular en condiciones normales<sup>(34)</sup>.

## **2.7 Proteínas de Señalización CCN**

Son un grupo de moléculas encargadas de promover el crecimiento y desarrollo de los tejidos mesenquimales, incluyendo hueso y cartílago<sup>(35)</sup>; se asocian a procesos de diferenciación celular, morfogénesis y migración y proliferación celular<sup>(16)</sup>. Esta familia de moléculas de señalización está compuesta por 6 miembros CCN1 ó Cyr61, CCN2 ó factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), Nov, WISP-1, WISP-2 y WISP-3.

### **2.7.1 CCN2 ó Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF)**

Es una molécula asociada a eventos fisiológicos durante el desarrollo y crecimiento de varios órganos y tejidos, tiene el potencial de acelerar la regeneración de tejidos dañados, incluyendo hueso y cartílago, por otro lado se considera un mediador de trastornos fibróticos y determinante del fenotipo en ciertos tumores malignos <sup>(35)</sup>.

Durante el desarrollo de tejidos orofaciales tiene actuación en procesos de osificación intramembranosa, formación y mantenimiento del cartílago auricular y articular, participa en la formación dental y del MC y en la osificación endocondral, donde promueve la capacidad de proliferación y deposición de matriz extracelular de los condrocitos, se acumula en condrocitos hipertróficos para acelerar su hipertrofia y apoptosis, su actividad angiogénica promueve la invasión vascular al cartílago <sup>(35)</sup>.

Durante el desarrollo del MC, la CCN2 es fuertemente expresada en su primordio, antes de que la estructura cartilaginosa sea evidente, indicando su contribución a la formación del cartílago, se ha identificado como una molécula de señalización corriente abajo del TGF  $\beta$ , apoyando la proliferación de condrocitos que forman el MC <sup>(23)</sup>; posteriormente funciona como una molécula de señalización liberada por el MC para el reclutamiento de osteoblastos, durante su osificación <sup>(35)</sup>.

Observaciones en embriones de ratas demuestran que en E12 hay una muy alta expresión de CTGF en las tres porciones del MC, la cual disminuye significativamente en E15 en los condrocitos neodiferenciados, para E18 la expresión aumenta de nuevo en los condrocitos de la región anterior y el segmento rostral de la región central; estos hallazgos sugieren la expresión dinámica del CTGF en el desarrollo del MC, influye en la diferenciación de células condrogénicas y la maduración de condrocitos, ayuda a la condrogénesis actuando corriente abajo del TGF y en la estimulación de las interacciones célula a célula <sup>(16)</sup>.

## **2.8 Proteína tipo Dipeptidil – peptidasa 6 (DPP 6)**

Es una proteína miembro de la familia dipeptidil aminopeptidasa, tiene diferentes funciones en el desarrollo embrionario y en tejidos adultos, determinadas por la expresión de tres diferentes isoformas; durante el desarrollo embrionario, está implicado en el desarrollo del sistema nervioso central y se ha detectado en los procesos maxilofacial y mandibular durante el desarrollo facial en ratones <sup>(36)</sup>.

Du et al., analizaron la expresión de DPP6 en el MC durante los estadios de desarrollo 11.5 a 13,5, identificando que para E11.5, la expresión de DPP6 es más fuerte para el MC en sí, que para los tejidos que lo rodean, en E13.5 la expresión

de DPP6 en el MC aumenta y aún se presenta con mayor intensidad que para los tejidos circundantes, finalmente en E15.5 se detecta la expresión de DPP6 en el proceso mandibular, los hallazgos permiten a los autores establecer que DPP6 está involucrada en el desarrollo mandibular, gracias a su regulación en el desarrollo del MC <sup>(36)</sup>, en dónde su papel específico no ha sido esclarecido.

## 2.9 Expresión del gen *Hoxa2*

Los genes *Hox*, en combinación con los *Dlx* son los encargados de la identidad anteroposterior y dorsoventral de las células derivadas de cresta neural craneal, así, la expresión ectópica del *Hoxa2* en células de cresta neural craneal *Hox* negativas resulta en distintos fenotipos en diferentes subpoblaciones de células, por ejemplo, mientras la expresión ectópica de *Hoxa2* tiene la capacidad de transformar morfológica y molecularmente las estructuras derivadas del primer arco faríngeo a estructuras del tipo del segundo arco faríngeo, no provoca transformación de otras subpoblaciones de células derivadas de cresta neural craneal, pero si perjudica gravemente su desarrollo <sup>(37)</sup>.

En ratas experimentales con expresión ectópica de *Hoxa2* hay una transformación del extremo proximal del cartílago de Meckel y del martillo hacia un proceso estiloides supernumerario <sup>(37)</sup>.

## 2.10 Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

El factor de crecimiento de hepatocitos es un potente mitógeno para hepatocitos maduros en cultivos, puede actuar como un desencadenante de la regeneración del hígado, tiene también efecto mitógeno en varios tipos de células epiteliales, mejora la motilidad de varios tipos de células, actuando como un factor de dispersión (molécula capaz de causar disociación y migración de células epiteliales), es un mediador de la interacción epitelio – mesénquima <sup>(38)</sup>.

Estudios llevados a cabo por Amano et al., con la aplicación de HGF en cultivos de mandíbulas de ratón, se observa que el MC se encuentra ligeramente agrandado, es decir, se presenta un incremento en el volumen del MC ante la presencia de HGF exógeno; estos resultados y similares hallazgos en cartílago de huesos largos permiten afirmar que el HGF es un importante factor autocrino – paracrino en la morfogénesis de cartílago (incluyendo el MC) y hueso durante el desarrollo embrionario mandibular <sup>(38)</sup>.

## 2.11 Proteína Tirosin Fosfatasa (PTP)

Augustine et al., evaluaron los efectos de la pérdida de función de PTP durante el desarrollo embrionario de mandíbulas de ratas, observando, específicamente para el MC, un patrón anormal de desarrollo del cartílago, con un aumento en el tamaño de la región condrogénica; se identifica un segmento dorsal bilateral del cartílago agrandado, en muchos casos se observa también ausencia de la porción media del cartílago y disrupción del segmento ventral; en general el tamaño de los segmentos presentes está aumentado; lo que permite a los autores establecer que la PTP tiene la capacidad de regular la tasa de proliferación condroblástica en el esqueleto cartilaginoso, durante el desarrollo esquelético temprano<sup>(39)</sup>.

## 2.12 Factor de crecimiento epidermal (EGF)

Se definió inicialmente como un estimulante de la proliferación de células epiteliales, aunque ya se tiene clara su potente capacidad mitogénica para varios tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos y mioblastos; tiene además participación en el proceso de morfogénesis y erupción dental, formación del paladar y maduración pulmonar, además se ha reportado que mejora la síntesis y la actividad mitótica en condrocitos, facilitando la proliferación celular<sup>(40)</sup>.

Su papel en el desarrollo del MC está enfocado en la capacidad que pueda tener para inducir las células del MC a cambios fenotípicos en fibroblastos que originen el ligamento esfenomandibular a partir de células del tejido no calcificado localizado en la parte posterior de la porción media del MC<sup>(40)</sup>.

Ishizeki et al., analizaron la actividad del EGF sobre cultivos de condrocitos de Meckel, identificando que el número de células fibroblásticas es mayor para los cultivos con EGF que para los controles, la tasa de proliferación celular es mayor para los cultivos tratados con EGF y dependiente de la dosis manejada para cada muestra; la densidad de células sintetizando ADN fue mayor para los cultivos tratados que para los controles, confirmando su papel en la síntesis de ADN y proliferación del MC; se identificó que el EGF inhibe cualitativa y cuantitativamente la síntesis de colágeno tipo I, aunque no hay evidencia de que éste inhiba completamente la polimerización de las fibras de colágeno tipo I; el efecto de la inhibición de la calcificación de la matriz del MC por parte del EGF, no es esencial, es este aspecto, el EGF actúa inhibiendo la actividad de la fosfatasa alcalina (enzima asociada a la calcificación de la matriz de tejidos duros). En sí, el EGF en el MC, estimula la proliferación celular y cambios morfológicos en los condrocitos, suprime la diferenciación condrocítica, y la expresión de la fosfatasa alcalina<sup>(41)</sup>, por lo que se establece que el EGF puede ser uno de los factores que induce la

transformación fenotípica de condrocitos para la formación de células fibroblásticas del ligamento <sup>(40)</sup> <sup>(41)</sup>.

## 2.13 CTRP3/cartducin

CTPR3/Cartducin es un miembro de la familia C1q/proteína relacionada con factor de necrosis tumoral (TNF), es expresada en el linaje de células condrogénicas en el esclerotoma y en condrocitos proliferando en la placa de crecimiento; tiene un papel importante en la regulación de precursores condrogénicos y condrocitos <sup>(42)</sup>.

Yokohama-Tamaki et al., analizaron la expresión del CTRP3/Cartducin durante el desarrollo del MC, identificaron que en E11.5 no hay expresión de la proteína en la condensación de células mesenquimales del futuro MC; en E14, cuando el cartílago de Meckel ya está bien formado, se detectó la expresión de CTRP3/Cartducin en los condrocitos del cartílago, mas no en el pericondrio; para E16, no hay detección de la proteína en los condrocitos hipertróficos o en el pericondrio, en modelos de experimentación con cultivos de órganos manipulados para inhibir la expresión de CTRP3/Cartducin, se observa una alteración en la forma del MC (curvatura), hay una pérdida del pericondrio que es reemplazado por una matriz metacromática, que según los autores corresponde a una matriz metacromática que se formó alrededor del MC, los condrocitos del MC se observan muy separados en comparación con controles, además se da la inhibición de la formación de tejido muscular y osteoide alrededor del MC (observada en los controles); lo que confirma la importancia del CTRP3/cartducin en el mantenimiento del pericondrio del MC, que ante la ausencia de la proteína no puede mantener su estructura y se convierte en cartílago; debido a que la principal función del pericondrio radica en soportar físicamente el MC, formando una envoltura alrededor de este, ante la ausencia de éste, el cartílago no puede soportar solo las fuerzas fisiológicas y se curva como lo muestran las observaciones histológicas, además de que tampoco se da la formación fisiológica de hueso y musculo a su alrededor <sup>(42)</sup>; en sí, el papel de la CTRP3/Cartducin radica en el mantenimiento del pericondrio y los inconvenientes para el desarrollo del MC que puede acarrear su ausencia <sup>(42)</sup>.

## 2.14 Expresión del gen CD47

CD47 está involucrado en el incremento de las concentraciones de calcio intracelular, después de que las células se han adherido a la matriz extracelular <sup>(43)</sup>.

Durante el desarrollo del MC se observa una expresión de CD47 que incrementa significativamente de manera tiempo dependiente, en estadíos E13 a E15 las

células CD47 positivas son células tipo condrocito que se localizan debajo de la lengua, que se consideran son el MC <sup>(43)</sup>.

Análisis del silenciamiento de la expresión de CD47, muestra un incremento en la masa ósea y disminuye la función de osteoclastos; incremento en los factores de transcripción para *Runx2*, *Dlx5*, *Msx2* y *Sp7* relacionados con metabolismo óseo y maduración, sugiriendo que el CD47 regula a la baja estos factores de transcripción <sup>(43)</sup>.

CD47 regula a la baja la vía de señalización TGF $\beta$  <sup>(43)</sup>.

## 2.15 Expresión del gen *Fuz*

El gen *Fuz* puede coordinar la ciliogenésis y secreción, dos procesos que pueden afectar una variedad de vías de señalización. Juega un rol esencial en las vías de señalización Wnt y Hh, la pérdida de su expresión conlleva a importantes defectos en el desarrollo craneofacial, es requerido para la formación de ojos, hueso, lengua e incisivos <sup>(44)</sup>.

Zhang et al., llevaron a cabo estudios en ratas nulas para *Fuz* con el fin de aclarar su papel en el desarrollo craneofacial.

Se identificó una disminución de la expresión Hh en las ratas mutantes, lo que conlleva a una pérdida la proliferación celular y formación de brotes dentales (hay ausencia de la formación dental), aparecen defectos en la formación del cerebro y paladar fisurado, aunque los efectos craneofaciales de estas ratas no se parecen a los de ratas nulas para la señalización Hh; particularmente, *Fuz* parece no regular el crecimiento del cartílago de Meckel pero si afecta su colocación en la mandíbula; presentan un incremento en la señalización Wnt5a, lo que implica a su vez un incremento en el crecimiento del cartílago de Meckel; el incremento de la expresión de Sox 9 se relaciona con un incremento en el crecimiento del cartílago de Meckel, este agrandamiento del cartílago causa a su vez un aumento de la osificación endocondral <sup>(44)</sup>.

## 2.16 Matriz de Metaloproteinasas (MMP)

El análisis de los efectos de la inhibición de la MMP permite establecer que estas cuentan con un papel importante en el desarrollo mandibular, debido al compromiso del desarrollo del MC dado en cultivos con inhibidor de metaloproteinasas, en los que el segmento anterior del MC está ausente ó exhibe una reducción en el contenido de proteoglicanos; la reducida tinción de las varas laterales del MC indican una inhibición o reducción del desarrollo en este segmento <sup>(45)</sup>.

Con base en estos datos, Chin sugiere que las MMP tiene un papel esencial en la morfogénesis del MC <sup>(45)</sup>.

## 2.17 Expresión de genes *Prx1* y *Prx2*

Son miembros de la familia de los Homeobox, que están estrechamente relacionados entre sí y que se co expresan en varios sitios durante el desarrollo embrionario.

En el proceso mandibular, los genes *Prx* son co-expresados en altos niveles en el mesénquima de la región medial <sup>(46)</sup>, en el proceso maxilar y frontonasal <sup>(47)</sup>; ratas nulas para *Prx2* no muestran anomalías craneales o esqueléticas obvias, mientras que las ratas nulas para *Prx1* muestran defectos en los elementos esqueléticos derivados del proceso maxilar y de la parte caudal del proceso mandibular; las ratas nulas para ambos, *Prx1* y *Prx2* mueren algunas horas después del nacimiento debido a anomalías muy penetrantes entre ellas graves malformaciones de la mandíbula en desarrollo; dando evidencia del rol esencial de *Prx* en la morfogénesis mandibular; estas ratas doble mutantes son asociadas con un cambio en la expresión *Fgf 8*, *Bmp4* y *Shh* en el epitelio mandibular medial <sup>(46)</sup>.

Balic et al., analizaron los efectos de la supresión selectiva de *Prx1* y *Prx2* sobre el desarrollo de las estructuras mandibulares encontrando que:

El proceso mandibular en ratas normales ó nulas para *Prx 1* ó *Prx2* contenía hueso, dos gérmenes molares, dos gérmenes incisivos y cartílago sinfisial entre el proceso mandibular, por el contrario, las ratas doblemente mutantes tienen mandíbulas con tamaño muy reducido, 56 a 65 % más pequeñas con respecto al control, que fueron fusionadas en la línea media (fusión del segmento rostral <sup>(47)</sup>), con un cartílago sinfisial ausente, exhiben gérmenes molares pero no gérmenes incisivos o eventualmente solo uno (debido a que los *Prx* funcionan manteniendo la expresión de *Pax 9* y *patches*, esenciales en el desarrollo de los incisivos y cuya expresión disminuye en ratas doblemente mutantes) y el MC está deficiente <sup>(46)</sup> <sup>(47)</sup>, al parecer estos efectos se deben a que *Prx* tiene una función de mantenimiento y supervivencia en las células del mesénquima mandibular; aún en estas condiciones, las células de cresta neural tienen la capacidad de migrar hacia el proceso mandibular (ya que *Prx* no es expresado en células premigratorias) pero posteriormente desaparecen <sup>(46)</sup>.

Los defectos del desarrollo mandibular asociados a la supresión de *Pax1* y *Pax 2*, se pueden soportar en la alteración de la expresión de varios genes adicionales que participan en el desarrollo mandibular y se ven afectados por la mutación genética, entre estos genes se cuentan:

- *Hand1* (*eHand*) y *Hand2* (*dHand*). Cuya expresión normal, durante el desarrollo mandibular, se observa en solapamiento en la región media del proceso mandibular para *Hand2* y en la misma zona pero específicamente hacia a línea media para *Had1*. Ante la mutación *Prx1* y *Prx2*, la expresión de *Had1* no se altera significativamente, mientras que la de *Hand2* se redujo, indicando que la expresión de *Hand2* es regulada por *Prx*<sup>(46)</sup>.
- *Msx1*, *Msx2*, *Bmp4* han demostrado su papel esencial en la morfogénesis de la región medial mandibular; las observaciones en ratas mutantes indican que existe una alteración en la expresión de *Msx1* y *Bmp4* (aunque Wang Et al., no reportan expresión de *Bmp4* directamente en el MC, ésta si se evidencia en los alrededores del mesénquima mandibular y hueso mandibular<sup>(25)</sup>), mas no de *Msx2*, lo que significa que los genes *Prx* regulan de alguna manera la expresión *Msx1* y *Bmp4*<sup>(46)</sup>.
- La expresión de *Fgf8* se ve afectada ante la mutación de los genes *Prx*, lo que se asocia, junto con la alteración de la expresión de *Pax9*, a la ausencia de los gérmenes de los incisivos<sup>(46)</sup>.

Específicamente para MC, su desarrollo se encuentra ampliamente afectado en ratas mutantes para genes *Prx*, estas alteraciones se han relacionado con defectos en la expresión de *Sox9* y *Col2a1*, que fisiológicamente se expresan en las regiones caudal, medial y rostral del primordio precartilaginoso, pero que ante la mutación pierden expresión en la región medial, que corresponde al cuerpo principal del MC, de esta manera, la pérdida de la mayor porción del MC está relacionada con defectos en el mantenimiento y/o crecimiento aposicional del mesénquima condrogénico<sup>(46)</sup>.

## 2.18 Expresión de Proteoglicanos (PG).

Los proteoglicanos son moléculas que desempeñan un papel esencial en el desarrollo, mantenimiento de la función e integridad en todos los tejidos; son fundamentales en las interacciones célula - célula y célula-matriz extracelular y actúan como receptores en la superficie celular; se considera que gobiernan el proceso de movimiento celular en numerosas condiciones fisiológicas y patológicas<sup>(48)</sup>.

Los PG de cartílago hialino son proteoglicano condroitin sulfatado (el principal), decorin, biglican, fibromodulina y epifican<sup>(48)</sup>.

Los PG participan en el desarrollo embrionario regulando la formación e integridad de los tejidos, específicamente para MC para ser esencial para el mantenimiento del cartílago en un estado no calcificado durante periodos de tiempo determinados<sup>(48)</sup>.

Ababneh y Al-Khateeb, estudiaron la expresión de varios PG, previamente reportados como expresados en MC:

- Versican tiene un papel importante en adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular; ha sido localizada tanto en tejidos fetales como adultos. Es expresado en el mesénquima precondrogénico y cuando la transición a cartílago ocurre su expresión se limita a la periferia del cartílago recién formado; se ha identificado que participa en la regulación positiva de la matriz mesenquimal y la diferenciación de condrocitos, además participa en la agregación precartilaginosa y posterior diferenciación del cartílago <sup>(48)</sup>.

Tradicionalmente, no se ha reportado expresión de versican en condrocitos maduros, a excepción de los del MC, que lo expresan en estadios tardíos de desarrollo entre E18 y E20 <sup>(48)</sup>, aunque Shibata et al., reportan su expresión desde E10 en fetos humanos <sup>(49)</sup>.

- Decorin y Biglican: se han detectado en cartílago fetal y hueso; el decorin está implicado en la organización de fibras de colágeno, modulación del metabolismo de colágeno y en interacción con varias glicoproteínas y factores de crecimiento como el TGF; por otro lado las funciones de biglican no están bien definidas; en el MC el Decorin es expresado por condrocitos y matriz extracelular circundante durante E18 a E20 sin cambios en su intensidad; la expresión de Biglican fue menos intensa pero aumenta gradualmente con el estadio de desarrollo; de esta manera, Decorin y Biglican parecen relacionarse con la inhibición de la mineralización del MC <sup>(48)</sup>.
- La expresión de Lumican incrementa gradualmente a través del desarrollo desde E18 a E20 <sup>(48)</sup>.
- CD44 tiene una débil expresión en los condrocitos del cartílago de Meckel <sup>(48)</sup>.

## 2.19 Expresión de colágeno

El colágeno tipo II es secretado por condrocitos maduros, lo que lo hace el colágeno específico de cartílago en la matriz extracelular. El colágeno tipo X es sintetizado por condrocitos hipertróficos <sup>(50)</sup> como el principal componente de la matriz extracelular en estadios tardíos del desarrollo del cartílago <sup>(51)</sup>, aunque Ekanayake y Hall y otros autores, establecieron que la condición de hipertrofia no es un pre-requisito para la expresión de colágeno tipo X por parte de los condrocitos del MC <sup>(52) (53) (54) (55)</sup>. El colágeno tipo I es el principal colágeno hallado en hueso, aunque también es hallado en pericondrio <sup>(51)</sup>.

Durante el desarrollo del MC, en sus estadios iniciales se identifica la expresión de colágeno tipo II; pero, sus células se convierten gradualmente en sintetizadoras de colágeno tipo I <sup>(51)</sup>, Ishizeki et al., identificaron en cultivos de condrocito del MC la capacidad que tienen éstos para transformarse en células osteocíticas productoras de gruesas bandas de colágeno tipo I, ya que al parecer gracias a su origen en cresta neural, estas células retienen un potencial osteogénico <sup>(56) (57)</sup>.

## Capítulo 3.

### Mecanismos moleculares de desintegración del cartílago de Meckel.

Como producto de la revisión de 16 artículos relacionados con el objetivo de identificar los mecanismos moleculares que participan en el proceso de degradación del MC, se obtiene información acerca de factores pro y antiapoptóticos como P53, Caspasas, Bcl2, indicadores de autofagia como Beclin1 y LC3, OPG, RANKL y del papel de los macrófagos; relacionadas con el proceso de desintegración del MC.

#### 3.1 Factores apoptóticos y antiapoptóticos.

Apoptosis o muerte celular programada, es un proceso fisiológico que en contraste con la necrosis, no es combinado con repuesta inflamatoria; es un poderoso mecanismo de regulación de varios aspectos normales del crecimiento y función de los tejidos <sup>(11)</sup>; además de regular la homeostasis entre proliferación y muerte celular <sup>(21)</sup> actúa ante el daño celular ocasionado por radiación ionizante ó infecciones virales <sup>(11)</sup>.

Morfológicamente consiste en la fragmentación del ADN cromosómico y el citoplasma, en cuerpos, unidos a la membrana, llamados cuerpos apoptóticos que son fagocitados rápidamente <sup>(21)</sup> <sup>(11)</sup> .

En el proceso hay múltiples moléculas implicadas, entre ellas:

- **Caspasas.** Son proteasas que median la muerte celular, existen 14 tipos que se agrupan en pro-apoptóticas (caspasa 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10) y pro-inflamatorias (caspasa 1, 4 y 5) <sup>(21)</sup>.
- **Bcl-2.** Es una familia de proteínas que contiene miembros activadores de apoptosis como bax, bik, bad y bclxs; e inhibidores de apoptosis bcl-2, bcl-xL, bcl-w, y mcl-1. La experimentación muestra que ratas nulas para Bcl2 presentan un aumento en el número de osteoblastos, osteoblastos con forma alterada y un depósito del colágeno desorganizado; mientras que, su sobreexpresión promueve la adhesión y diferenciación de osteoblastos, pero la mineralización ósea está retrasada <sup>(21)</sup>.
- **P53.** Es una proteína activada por el gen supresor de tumores P53, detiene el ciclo celular para realizar la reparación de ADN ó inducir la muerte celular si el daño es irreparable <sup>(21)</sup>.

Proteína de Shock térmico, ya descritas en este trabajo y específicamente Hsp 70 que actúa como inhibidor de apoptosis <sup>(21)</sup>.

Factores pro apoptóticos y antiapoptóticos tiene un papel importante en el desarrollo mandibular y su imbalance está relacionado con alteraciones en la deposición de hueso y anomalías craneofaciales <sup>(21)</sup>.

Brakus et al., identificaron la expresión de factores pro-apoptóticos y antiapoptóticos en la mandíbula en desarrollo y específicamente en el MC en estadios iniciales y describen:

Durante el desarrollo temprano, semana 5 y 6 no hay expresión de factores pro o anti – apoptóticos en el MC a excepción de Hsp 70 que muestra una moderada inmunoreactividad; en la semana 7 bcl-2 muestra una expresión moderada en algunas células del MC, mientras no hay aún reactividad de factores pro-apoptóticos; lo que sugiere que bcl-2 tiene un papel protector en poblaciones de células jóvenes y metabólicamente activas frente a la apoptosis, además de que mejora la proliferación de condroblastos <sup>(21)</sup>.

Trichilis & Wroblewski estudiaron la expresión de P53 y Hsp 70 en estadios posteriores del desarrollo identificando que la expresión de P53 se hace evidente a partir de E15 para condrocitos y pericondrio del MC, la cual incrementa en E18; estos mismos patrones de tinción persisten en animales de 3 días de nacidos, debido a que la expresión de P53 tiene relación temporal y espacial con la identificación de la actividad apoptótica, es posible asociar la expresión de P53 con apoptosis. De acuerdo con los resultados de Brakus et al., <sup>(21)</sup> y Trichilis & Wroblewski <sup>(11)</sup> también identificaron de manera temprana la expresión de Hsp70

en el MC, que incrementa con la edad, persistiendo incluso en la etapa posnatal<sup>(11)</sup>.

En referencia al análisis de células apoptóticas, su presencia para MC es detectada a partir de E14, de manera esporádica en el pericondrio, la cual incrementa para E15 en la parte distal del MC; en la parte proximal aún está confinada al pericondrio, en estadíos E15 a E18 la actividad apoptótica es más alta en proximal y distal, en comparación con la parte media<sup>(11)</sup>.

Gracias a la identificación de la actividad apoptótica y el incremento de la misma en el proceso de desarrollo del MC, se da sustento a la hipótesis de que la desaparición del MC se debe, al menos en parte, a un proceso de muerte celular, Trichilis & Wroblewski identificaron el inicio de la muerte celular en el pericondrio del MC a la vez que se da la formación del hueso mandibular; está aún sin esclarecer si las enzimas expresadas durante el proceso de mineralización mandibular como la fosfatasa alcalina inducen un programa de muerte celular en el pericondrio cercano, teniendo en cuenta que la formación de hueso se observa previamente a la identificación de la actividad apoptótica en el pericondrio; aunque tampoco se puede descartar que el proceso sea al contrario y que sea la apoptosis en el cartílago la que induce la osteogénesis<sup>(11)</sup>.

En contraste a estos hallazgos, Yang et al.,<sup>(20)</sup> y Amano et al.,<sup>(38)</sup> refieren que, de acuerdo a los resultados de sus estudios, la apoptosis no está involucrada en la muerte celular de condrocitos en la desaparición del MC; Amano et al., plantean que la actividad apoptótica detectada en la zona tiene un papel en la diferenciación de condroblastos en el pericondrio del MC y la remoción de células que bloquean el crecimiento lateral del MC<sup>(38)</sup>, Yang et al.,<sup>(20)</sup> identificaron actividad apoptótica solamente en la parte lateral de condrocitos hipertróficos terminales por lo que al igual que Amano et al., consideran que el papel de ésta está involucrado en la diferenciación condroblástica en el pericondrio<sup>(38)</sup>.

## **3.2 Autofagia y sus reguladores en el MC.**

La autofagia es un mecanismo fisiológico que marca organelos intracelulares alterados y disfuncionales, con el fin de liberar sobre ellos lisosomas, para degradarlos y reciclarlos. Beclin 1 y LC3 son los principales reguladores de la vía de señalización de la autofagia<sup>(20)</sup>.

Beclin 1 es un componente importante del completo fosfatidil-inositol 3 kinasa de clase III que inicia la formación de autofagosomas<sup>(20)</sup>.

La prenilación de LC3 (LC3b) está localizado en autofagosomas, haciendo de ésta una proteína marcadora de autofagia<sup>(20)</sup>.

Análisis inmunohistoquímicos llevados a cabo por Yang et al., revelan la expresión de marcadores de autofagia durante en proceso de degradación del MC, principalmente en condrocitos hipertróficos. El proceso de activación del mecanismo de la autofagia, al parecer inicia con un proceso de hipoxia en los condrocitos por medio de la expresión de HIF1 (factor inductor de hipoxia, el cual ha mostrado tener un papel importante en la estabilización de los niveles de oxígeno durante el desarrollo y desintegración del MC <sup>(58)</sup>), que ocasiona alteración en los procesos celulares normales y finalmente inicia la autofagia <sup>(20)</sup>.

### **3.3 Matriz de Metaloproteinasas (MMP) y actividad gelatinolítica**

Las MMP son una familia de metaloendopeptidasas, capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular; la gran familia está compuesta por 25 miembros <sup>(59)</sup> <sup>(60)</sup>, agrupados en subfamilias de colagenasas, de acuerdo a la estructura primaria y sustrato específico de cada enzima; degradan diferentes tipos de colágeno intersticial, durante el desarrollo embrionario y remodelación fisiológica así como en invasión de tumores e inflamación <sup>(61)</sup>.

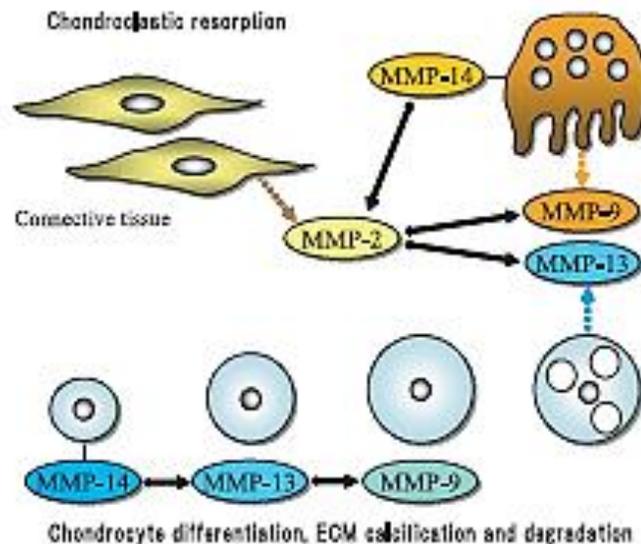
MMP-2 y MMP-9 son las principales MMP con actividad gelatinolítica en el organismo <sup>(60)</sup>.

Ishizeki & Nawa evaluaron el papel de la MMP-1 en la degradación de la matriz extracelular que acompaña la desaparición del MC, mediante microscopía inmunoelectrónica e identificaron la presencia de MMP-1 en estadíos tempranos del desarrollo del MC de manera intracelular, asociada al citoplasma de los condrocitos; en las observaciones para estadíos tardíos del desarrollo del MC, se localiza MMP-1 al interior de los condrocitos hipertróficos y en mayor proporción en la zona de espacios pericelulares, alrededor de condrocitos hipertróficos, al analizar la expresión del inhibidor de metaloproteinasas de tejido 1 (TIMP-1), se identifican niveles de expresión similares que los de MMP-1 en estadíos de desarrollo inicial, los cuales disminuyen significativamente en el cartílago hipertrófico en degradación, sumado a estos cambios de expresión de TIMP-1, se observa un aumento del tamaño de los espacios pericelulares; lo que indica que la actividad de las MMP-1 está presente digiriendo las fibras de colágeno solo cuando la función de TIMP-1 se ha perdido <sup>(61)</sup>.

Con base en la localización de MMP-1 en el citoplasma de los condrocitos en estadíos tempranos, donde no tiene ningún papel resortivo, se ha planteado que los condrocitos producen las MMP y posteriormente las liberan hacia la matriz, donde son activadas por la acción de otras enzimas provenientes de células endoteliales y osteoclastos cercanos, o en ausencia de éste tipo de células, como

es el caso del MC, parecen ser activadas por factores intrínsecos del mismo cartílago<sup>(61)</sup>.

Sakakura et al., también investigaron el papel de las MMP en el proceso de desintegración del MC, específicamente se analizó la expresión de MMP-2, MMP-13, MMP-9 y MMP-14. Identificaron inmunoreactividad de MMP-2 en el pericondrio alrededor del MC<sup>(59)</sup>, Sakakura en otro estudio, reporta, para la misma zona expresión también de MMP 9 y MMP13<sup>(62)</sup>; MMP-13 es localizada en depósitos de matriz ósea, bajo osteoblastos periostales, lo que indica que su expresión se da solo en la fase de cambios morfológicos; MMP-9 y MMP-14 muestran una intensa reactividad en los condrocitos periféricos del cartílago de Meckel; los hallazgos permiten identificar que las MMPs contribuyen a la reabsorción y muerte celular en el MC por una cascada en la que MMP-2 originada en lagunas condrocíticas y desde tejido conectivo está asociada a la activación de otras MMPs, lo que a su vez está regulado por la MMP-14 de los condroclastos, además la MMP-2 activa, actúa hacia la activación de MMP-9, secretada por condroclastos y MMP 13 de los condrocitos hipertróficos vacuolados (Imagen 7). De esta manera, se concluye que, la degradación del MC involucra una cascada de activación de MMP diferente a la que ocurre en la formación de hueso endocondral y por otro lado se puede afirmar que son los mismos condrocitos del MC los responsables de su reabsorción a través de la degradación de la matriz extracelular por medio de la acción de MMP y actividad gelatinolítica<sup>(59) (62) (63) (64)</sup>.



**Imagen 7.** Proceso de activación de MMP a partir de condrocitos. Tomado de Sakakura<sup>(63)</sup>.

### 3.4 RANKL y Osteoprotegerina (OPG)

El RANK es un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral asociado a membrana, que es expresado por células precursoras de osteoclastos y osteoclastos maduros; el RANKL es un miembro de la familia del ligando del factor de necrosis tumoral que se ubica en la membrana celular de osteoblastos y células estromales de médula ósea, tiene el papel de mejorar la diferenciación, activación y supervivencia de los osteoclastos a través del contacto osteoblasto-células estromal<sup>(65)</sup>.

La OPG es un miembro del receptor del factor de necrosis tumoral, producido por osteoblastos y células estromales de médula ósea, tiene la capacidad de unirse al RANKL, incluso con mayor afinidad que el RANK, limitando la acción del RANKL<sup>(65)</sup>.

Por medio de estudios de inmunolocalización de RANKL y OPG, Sakakura et al., detectaron que la interacción de estas dos moléculas contribuye a la reabsorción de la porción media del MC, lo que ocurre en conjunto con la aparición y diferenciación de células TRAP positivas, inducida por el crecimiento y desarrollo del incisivo; dando origen a un proceso de reabsorción del MC sin que éste sufra un proceso de osificación<sup>(65)</sup>.

### 3.5 Papel de los macrófagos

Tsuzurahara et al., identificaron inmunohistoquímicamente una masiva presencia de macrófagos en el MC, en E14 a E16, en E14 los macrófagos rodean el cartílago pero no lo penetran, para E16 gran cantidad de macrófagos penetran el pericondrio del MC y extienden sus procesos celulares hacia los condrocitos<sup>(66)</sup><sup>(40)</sup>, esta infiltración es al parecer una respuesta de los macrófagos a la molécula quimioatrayente IL 1  $\beta$ , secretada por los condrocitos, a la vez que la secreción de la IL 1  $\beta$  por parte de los macrófagos mejora la secreción de la misma molécula por condrocitos, lo que a la vez mejora la expresión de MMP-9 y MMP-13; esta cadena de procesos conduce a la desaparición final del MC<sup>(64)</sup>.

## Capítulo 4.

### Relación del Cartílago de Meckel con el desarrollo mandibular

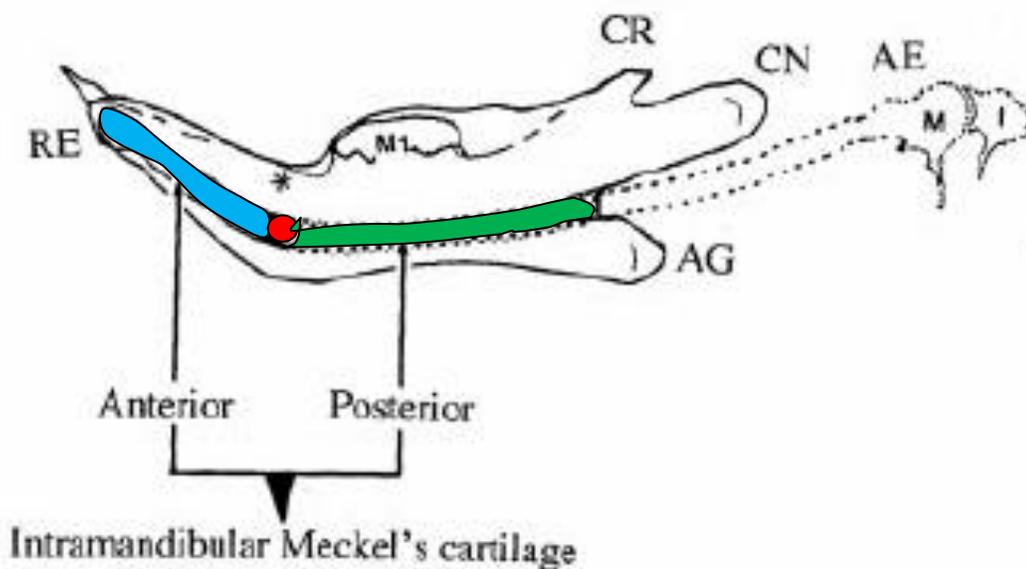
Se ha considerado que el MC tiene un papel importante en el desarrollo mandibular, debido a que alteraciones en la formación y desarrollo del MC conllevan a alteraciones en la morfología mandibular, experimentos en ratas mutantes, con inhibición de la expresión *Cgff* (que en condiciones fisiológicas tiene expresión en el MC desde estadios tempranos, E12.5 a13.5 <sup>(67)</sup>) presentan alteraciones en la formación del MC (debido a una disminución de sus propiedades mecánicas, que lo llevan a deformarse) lo que repercute en un importante acortamiento mandibular <sup>(68)</sup>.

En el proceso de desarrollo mandibular, una vez su osificación ha iniciado, dentro de la mandíbula en desarrollo, permanece un segmento del MC, que es dividido en dos segmentos anterior (azul en la imagen 8) y posterior (verde en la imagen 8) teniendo como referencia el centro de osificación mandibular (rojo en la imagen); se considera que el segmento posterior tiene un cambio fenotípico hacia fibroblastos y forma el ligamento esfenomandibular y que el segmento anterior desaparece; Ishizeki et al., <sup>(10)</sup> plantean que sufre un proceso de osificación y se incorpora a la mandíbula, contribuyendo de esta forma al desarrollo del hueso mandibular; otros autores consideran que la porción anterior desaparece por un proceso de degradación que involucra apoptosis, autofagia, activación de MMP y macrófagos <sup>(20) (60) (61) (64) (65)</sup>.

Aunque Ishizeki et al., establecieron que también la porción posterior intramandibular sufre un proceso de osificación endocondral; lo que les permite concluir que toda la porción intramandibular del MC contribuye a la formación del hueso mandibular, gracias a un proceso de osificación endocondral <sup>(10)</sup>.

Por otra parte, Yang et al., consideran que, si bien durante la desaparición del MC, están presentes una serie de eventos que participan también en el proceso de osificación endocondral, no es éste el destino final de la porción media del MC, ya que identificaron ciertas diferencias entre el proceso de osificación endocondral y la desaparición del MC; durante el proceso de osificación endocondral RANKL es

expresado por los condrocitos hipertróficos, mientras que la OPG es casi negativa en estas células, mientras que en los condrocitos hipertróficos del MC la expresión es alta para ambas moléculas, además en el MC, RANKL no solo es expresado por condrocitos hipertróficos, como ocurre en osificación endocondral, sino que también es expresado por condrocitos maduros e inmaduros <sup>(13)</sup>; además se identificó que la cascada de activación de las MMP para ambos procesos ocurre de manera diferente, por lo que concluyen que el proceso de desaparición del MC es diferente al proceso de osificación endocondral <sup>(20)</sup>.



**Imagen 8.** Porción intramandibular del MC. Tomado de Ishizeki et al. (10)

El mediador de señalización gp130, implicado en el recambio y tamaño óseo, juega un papel importante en el destino del MC intramandibular, lo cual repercute en la morfología mandibular final; en condiciones normales la porción intramandibular del MC, según las observaciones de Choi et al., <sup>(69)</sup> es parcialmente reabsorbida por la acción osteoclásticas y finalmente por medio de un proceso de osificación endocondral se integra a la mandíbula; en condiciones de ablación del gp130, hay un retraso en la maduración de la zona de condrocitos hipertróficos, que origina el plegamiento del MC intramandibular y conlleva a la vez a una flexión de la mandíbula <sup>(69)</sup>.

Frommer & Margolies <sup>(70)</sup>, por medio de observaciones histológicas de embriones de ratas en E12 y hasta el periodo pos-natal, identificaron que el MC no influencia

apreciablemente la longitud o el ancho de la mandíbula por su osificación endocondral, sino que tiene un papel esencial en la inducción y regulación del crecimiento del centro de osificación primario intramembranoso de la mandíbula<sup>(70)</sup>, en esta relación se basan los defectos mandibulares que acompañan las alteraciones de desarrollo del MC<sup>(70)</sup>.

Lorentowicz-Zagalak et al.,<sup>(71)</sup> por las observaciones en su estudio realizado en fetos humanos postulan al MC como una guía de desarrollo de la mandíbula, que forma una plantilla morfogenética y ejerce tensión en los centros de osificación<sup>(71)</sup>.

Lee et al.,<sup>(72)</sup> en observaciones de fetos humanos, detectaron que el proceso de osificación intramembranosa mandibular está estrechamente asociado con una porción del tejido fibroso pericondral del MC; además se observa que el centro de osificación primario mandibular se ubica lateral, en cercanía al MC, el hueso trabecular inicia su desarrollo en el centro de osificación pero posteriormente se aleja del cartílago en dirección facial; de acuerdo a estos hallazgos, los autores consideran que el MC tiene una función importante en la osificación inicial de la mandíbula. De manera particular, Lee et al.,<sup>(72)</sup> en observaciones en humanos no identificaron un proceso de osificación endocondral en el MC, a diferencia de los hallazgos en animales observados por Ishizeki et al.,<sup>(10)</sup> y de Yamazaki et al.,<sup>(33)</sup>.

Otra hipótesis de la relación del MC con el desarrollo mandibular fue planteada por Ramaesh & Bard<sup>(9)</sup>, con base en sus observaciones del patrón de osificación mandibular (el cuál se extiende medialmente y hacia el MC), consideran que el papel del MC radica en la expresión de una señal (un factor de crecimiento) que dirige la osificación mandibular medialmente y luego hacia sí mismo; aunque ante la ausencia de evidencia de secreción de factores de crecimiento por parte del MC, se podía considerar que se trata mejor de la expresión de factores de transcripción del tipo *Msx1* y *osterix* (factor de diferenciación de osteoblastos); aunque estas afirmaciones son solo una hipótesis y los autores proponen la necesidad de futuros estudios para corroborar la expresión de moléculas de señalización por parte del MC, la presente revisión no encontró un artículo que haya abordado el tema<sup>(9)</sup>.

## 4. Análisis de resultados

El proceso de desarrollo del MC, incluye una serie de acontecimientos que inician con la migración de células de cresta neural hacia el primer arco faríngeo en donde forman la condensación de células ectomesenquimales que se diferenciarán hacia condroblastos, los cuales maduran a condrocitos, proliferan y forman el MC, hasta llegar a un estadio de maduración donde son sometidos a un proceso de hipertrofia y finalmente desaparecen ; en cada uno de estos sucesos hay una serie de factores moleculares implicados en las vías de señalización claves para que el normal desarrollo del proceso se lleve a cabo.

Durante el primer paso del desarrollo del MC que implica **la señalización a células de cresta neural para que migren hacia su destino final, el arco mandibular**, se ha identificado como indispensable para el primer paso del desarrollo del MC, la expresión de los genes *End1*<sup>(28)</sup> y *Hox*<sup>(37)</sup>, ya que son ellos los encargados de determinar el destino de las células hacia el desarrollo de estructuras maxilares o mandibulares.

Implicados en la migración de las células de cresta neural también se han identificado a la señalización *Msx1*<sup>(46)</sup>, *Shh* (*Shh* actúa sinérgicamente con *FGF*<sup>(30)</sup>, cuya expresión a la vez, está modulada por los genes *Prx1* y *Prx2*<sup>(46)</sup>).

La alteración en alguno de los componentes de la vía de señalización que regula la migración de células de cresta neural, que ocurre en estadios muy tempranos en el desarrollo, origina además de otras alteraciones en el desarrollo de las estructuras craneofaciales, una ausencia o hipoplasia severa en el MC, ya que el número de células que logran migrar y dar origen a las estructuras está restringido o es insuficiente<sup>(30)</sup>; de acuerdo al nivel de afectación y a la molécula o gen implicado en sí, es decir, una alteración en la base de la señalización siempre implicará efectos más devastadores en comparación con los arrojados por la alteración de las moléculas que participan “corriente abajo” en las vías de señalización; como ejemplo, si la alteración está implicando la expresión de genes *Hox* o *End1*, es decir, si se da una expresión ectópica de *Hox* (es de recordar, como se aclaró al inicio de este trabajo que las estructuras del esqueleto facial son *Hox* negativas) o una supresión en la expresión de *End1*, es probable identificar alteraciones severas en el desarrollo como transformaciones homeóticas, casos en los que las estructuras mandibulares son reemplazadas por estructuras maxilares o viceversa<sup>(28)</sup>, contrario a lo ocurrido cuando la alteración de expresión está limitada a *Msx1*, presentándose disrupciones del pericondrio y alteraciones en la forma del MC<sup>(23)</sup>.

Adicionalmente, los efectos adversos asociados a la alteración de la normoexpresión de genes y proteínas dependerán del estadio de desarrollo en el que aparezca la alteración, ya que varias moléculas participan en diferentes momentos del desarrollo regulando diferentes procesos; de esta manera no es igual la restricción de la expresión de la señalización Shh durante el proceso de migración de las células de cresta neural que puede conducir a una hipoplasia severa del MC y en sí de todas las estructuras craneofaciales <sup>(30)</sup> o incluso una ausencia completa de ellas <sup>(14)</sup> <sup>(15)</sup>; a la restricción de la misma proteína en el estadio de proliferación de condrocitos, que de manera menos grave conduce a una disminución del tamaño del MC.

Una vez las células de cresta neural craneal han alcanzado su destino en el primer arco faríngeo, forman la condensación de células estomesenquimales, que por acción de múltiples moléculas se **diferencian a condroblastos**, en este periodo de desarrollo aparecen los genes *Msx1* y *Sox 9*, cuya expresión está regulada por *Prx1*, el TGF  $\beta$ , la BMP y el FGF8; participa también el CTGF o CCN, Hsp 25 y Versican <sup>(48)</sup>. En esta etapa, se pueden observar alteraciones en la formación del MC bien sea por la supresión de la expresión o por una sobreexpresión de las moléculas.

La inhibición de la expresión de Hsp25 ocasiona incluso pérdida completa de alguno de los segmentos del MC, debido a que ésta tiene un papel importante en la diferenciación de condroblastos; por otra parte, una sobreexpresión de *Sox9*, inducida por la sobreexpresión de FGF10 conduce a un incremento del tamaño del MC cuando se afecta la porción lateral de la mandíbula en desarrollo, o presenta alteraciones de forma cuando la sobreexpresión afecta la parte central <sup>(31)</sup>.

Cuando los **condrocitos están maduros inician la proliferación y formación de la matriz cartilaginosa**, este proceso, al igual que los anteriores, tiene una serie de moléculas implicadas en él; que son en sí muchas de las que se expresan en otros estadios de desarrollo, de ahí que la alteración de la expresión de alguna de ellas tendrá diferentes repercusiones en el desarrollo del MC, básicamente porque cada una de ellas tiene diferentes funciones, asociada al estadio de desarrollo que se esté dando.

Asociadas a la proliferación de condrocitos para la formación del MC se ha identificado la acción de Shh, regulado por la expresión de FGF8 <sup>(30)</sup>, también es afectado por el gen *Fuz*, el cuál puede inducir su sobreexpresión provocando el agrandamiento del MC <sup>(44)</sup>, se ha observado también la expresión de Hsp25 <sup>(32)</sup>, PTP <sup>(39)</sup>, CTGF ó CCN (que actúa como un mediador “corriente abajo” del TGF  $\beta$ , por lo que tiene la capacidad de rescatar de los defectos por alteración en la proliferación a ratas nulas para *Tgfb* <sup>(35)</sup>), HGF (que actúa en la regulación de la morfogénesis del MC, su sobreexpresión incrementa el volumen del mismo <sup>(38)</sup>), EGF (ante su aplicación exógena se incrementa la proliferación celular <sup>(40)</sup>).

En general, en este estadio una inhibición de las moléculas participantes ocasiona aplasia del MC o acortamiento del mismo dependiendo de la molécula afectada y el grado de limitación que se presente; mientras que la sobreexpresión de los factores conlleva a una duplicación o aumento del volumen del MC.

Al final del periodo de desarrollo, se da la hipertrofia de los condrocitos que representa el estadio terminal de ellos para sufrir finalmente un proceso de osificación endocondral o simple desaparición; entre los factores identificados para regular este proceso están PTHrP (33), Ccn ó CTGF <sup>(23)</sup>, como inhibidor del proceso se identificó el EGF <sup>(26)</sup>.

En los últimos años, gracias a la innovación en las técnicas de laboratorio, ha sido posible ampliar el conocimiento del área que involucra el desarrollo del MC, pero aún hay varios aspectos por aclarar con respecto a los eventos que conducen a que el proceso se dé, está aún pendiente por definir el papel de moléculas como el DPP6 <sup>(36)</sup>, que han mostrado expresión en el proceso pero cuyo papel aún no está esclarecido.

Una vez el cartílago ha madurado, el destino de cada porción del MC toma lugar, de manera que la porción proximal origina, por osificación endocondral el martillo y yunque; la porción distal se incorpora a la sínfisis en desarrollo; la parte posterior de la porción media contribuye a la formación del ligamento esfenomandibular, pero la parte anterior sufre un proceso de desaparición, cuyos mecanismos aún permanecen en estudio, en la presente revisión se identificaron algunas moléculas participantes en el proceso.

Se ha planteado la posibilidad de que se dé un proceso de **apoptosis**, el Bcl2, un factor antiapoptótico se ha identificado con un papel protector en células jóvenes <sup>(21)</sup>, Hsp70 se identifica con marcada expresión en estadios tardíos de desarrollo e incluso etapas posnatales indicando la presencia de apoptosis <sup>(11)</sup>, aunque se ha planteado la hipótesis de que el fenómeno de apoptosis no está relacionado con la degradación del MC, sino con la diferenciación de condroblastos a partir del pericondrio y con la remoción de células que bloquean su crecimiento <sup>(38)</sup> <sup>(20)</sup>; marcadores de **autofagia**, entre ellos Beclin1 y LC3 también se han identificado en condrocitos hipertróficos, sugiriendo el papel de este fenómeno en la desaparición del cartílago <sup>(20)</sup>; la acción de las MMP con potencial gelatinolítico se ha planteado también como mecanismo de **reabsorción**, cuya producción inicia en los condrocitos, que libera las MMP en el momento indicado, lo que a su vez desencadena la activación de otros tipos de MMP que contribuirán a la **desintegración** del MC, mediante la degradación de la matriz extracelular <sup>(59)</sup> <sup>(62)</sup> <sup>(63)</sup> <sup>(64)</sup>, OPG y RANKL han demostrado también participar en el proceso por medio de la **activación de osteoclastos** <sup>(65)</sup>; finalmente también se ha asignado un papel a los macrófagos en el proceso de degradación, los cuales son atraídos al MC gracias a la IL1 $\beta$ , sustancia quimioatrayente secretada por los condrocitos <sup>(64)</sup>.

El proceso de desaparición del MC, específicamente de la parte anterior de la porción media, ha sido controversial, hay autores como Ishizeki et al., (1999) que consideran que el MC sufre, en esta zona, un proceso de osificación endocondral; en contraparte, Yang et al., en 2012 concluyen que el proceso de osificación endocondral y de desaparición del MC son diferentes, y que el MC no sufre osificación endocondral, sino que desaparece por mecanismos que involucran autofagia, apoptosis y actividad de macrófagos <sup>(64)</sup>. Es necesario tener en cuenta que las conclusiones obtenidas por Isizeki et al., corresponden a un estudio realizado en 1999 <sup>(10)</sup> y que posterior a este momento, en 2005 y 2007, Sakakura et al., identifican las diferencias entre los dos procesos, en la expresión de RANKL y OPG <sup>(65)</sup> y en la activación de MMP <sup>(59)</sup>, respectivamente; por lo que es posible, considerar que la evidencia es más fuerte para concluir que el MC, en su porción media no sufre un proceso de osificación endocondral, si no de degradación.

El conocimiento referente a los mecanismo moleculares que regulan el proceso de desarrollo y desaparición del MC se han ampliado considerablemente, pero permanecen aún vacíos que impiden esclarecer completamente el proceso y establecer una vía de señalización que logre involucrar todas las moléculas implicadas, en gran parte debido a la carencia de estudios con respecto a las moléculas en específico o la diferencia de resultados obtenidos por diferentes autores.

## 5. Conclusiones

- Los mecanismos moleculares que participan en el proceso de desarrollo del cartílago de Meckel tiene una expresión temporal y espacialmente definida, y la alteración de su expresión, sea por factores externos o internos, conlleva a malformaciones del cartílago.
- Son múltiples los factores moleculares que están implicados en el desarrollo del MC, haciendo parte de una compleja red de señalización que permite que se dé cada uno de los pasos necesarios para la formación del MC; la alteración en la expresión de alguno de los factores conlleva a alteraciones en el desarrollo del cartílago, de manera más o menos grave, de acuerdo al nivel en el que el factor afectado esté implicado (migración de células mesenquimales, diferenciación a condroblastos, etc.)
- El MC puede considerarse una plantilla para el desarrollo mandibular, dado que éste ocurre a lo largo del cartílago, además de que la atrofia o ausencia del MC se relacionan con alteraciones en la formación mandibular; además de que tiene un papel inductor para el proceso de osificación intramembranosa, pero no contribuye a la formación mandibular, ya que no sufre un proceso de osificación endocondral.

# Bibliografía

1. Gammill L.S., Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(10): p. 795-805.
2. Schneider RA., Helms J.A. The cellular and molecular origins of beak morphology. *Science.* 2003; 299(5606): p. 565-568.
3. Ferguson C., Tucker A., Sharpe P. Temporospatial cell interactions regulating mandibular and maxillary arch patterning. *Development.* 2000; 127(2): p. 403-412.
4. Billmyre K.K., Klingensmith L. Sonic hedgehog from pharyngeal arch 1 epithelium is necessary for early mandibular arch cell survival and later cartilage condensation differentiation. *Dev Dyn.* 2015; 244(4): p. 564-576.
5. Chai Y., Jiang X., Ito Y., Bringas P., Han J., Rowitch D.H., Et al. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn.* 2006; 235: p. 2353-2375.
6. Radlanski R.J., Renz H. Genes, forces, and forms: mechanical aspects of prenatal craniofacial development. *Dev Dyn.* 2006; 235(5): p. 1219-1229.
7. Chai Y., Maxson Jr. R.E. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development.* 2000; 127: p. 1671-1679.
8. Ito Y., Bringas Jr. P., Mogharei A., Zhao J., Deng C., Chai Y. Receptor-regulated and inhibitory Smads are critical in regulating transforming growth factor beta-mediated Meckel's cartilage development. *Dev Dyn.* 2002; 224(1): p. 69-78.
9. Ramaesh T., Bard J. B. The growth and morphogenesis of the early mouse mandible: a quantitative analysis. *J. Anat.* 2003; 203: p. 213-222.
10. Ishizeki K., Saito H., Shinagawa T., Fujiwara N., Nawa T. Histochemical and immunohistochemical analysis of the mechanism of calcification of Meckel's cartilage during mandible development in rodents. *Journal of anatomy.* 1999; 194(2): p. 265-277.
11. Trichilis A., Wroblewski J. Expression of p53 and hsp70 in relation to apoptosis during Meckel's cartilage development in the mouse. *Anat Embryol.* 1997; 196: p. 107-113.
12. Rodríguez JF, Mérida JR., Mérida JA., Sánchez I., Espín J., Jiménez J. Development of Meckel's Cartilage in the Symphyseal Region in Man. *Anat Rec.* 1997; 249(2): p. 249-254.

13. Amano O., Doi T., Yamada T., Sasahi A., Sahiyama K., Kanegae H. Meckel's Cartilage: Discovery, embryology, and evolution- Overview of specificity of Meckel's cartilage-. *J.Oral Biosci* 52 (2). 2010;; p. 125-135.
14. Chai Y., Parada C. Mandible and Tongue development. *Curr Top Dev Biol.* 2015; 115: p. 31-58.
15. Mori-Akiyama Y., Akiyama H, Rowitch DH., De Crombrughe B. Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 ; 100(16): p. 9360–9365.
16. Shimo T., Kanyama M., Wu C, Sugito H., Billings PC., Abrams WR., Et al. Expression and Roles of Connective Tissue Growth Factor in Meckel's Cartilage Development. *Develop Dyn.* 2004; 231: p. 136 - 147.
17. Havens B., Velonis D., Kronenberg M., Lichtler A, Oliver B, Mina M. Roles of FGFR3 during morphogenesis of Meckel's cartilage and mandibular bones. *Developm Biol.* 2008; 316: p. 336-349.
18. Hosseini-Farahabadi S., Geetha-Loganathan P., Fu K., Nimmagadda S., Joong Yang H., Richman J. Dual functions for WNT5A during cartilage development and in disease. *Matrix Biol.* 2013; 32: p. 252-264.
19. Barlow A., Francis-West F. Ectopic application of recombinant BMP-2 and BMP-4 can change patterning of developing chick facial primordia. *Develop.* 1997; 124: p. 391-398.
20. Yang R., Zhang Ch., Liu Y., Zhou H., Bing Li Z. Autophagy Prior to Chondrocyte Cell Death During the Degeneration of Meckel's Cartilage. *The Anatomical record.* 2012; 295: p. 734-741.
21. Brakus M., Govorko K., Vukojevic K., Jakus A., Carev D., Petricevic J. y cols. Apoptotic and anti-apoptotic factors in early human mandible development. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118: p. 537-546.
22. Wyganowska-Swiatkowska M., Przystanska A. The Meckel's cartilage in human embryonic and early fetal periods. 2011; 86: p. 98-107.
23. Oka K., Oka S., Sasaki T., Ito Y., Bringas P., Nonaka K. The role of TGF- $\beta$  signaling in regulating chondrogenesis and osteogenesis during mandibular development. *Developmental Biology* 303 (2007) 391–404. 2007; 303: p. 391-404.

24. Silva K.B., Silva M.G., Gomes S.M., Modolo F., MiKo G, Daumas F. Differential Shh, Bmp and Wnt gene expressions during craniofacial development in mice. *Acta histochemica* 112 (2010) 508—517. 2010;: p. 508-517.
25. Wang Y., Zheng Y., Chen D., Chen YP. Enhanced BMP signaling prevents degeneration and leads to endochondral ossification of Meckel's cartilage in mice. *Developmental Biology*. 2013; 381: p. 301-311.
26. Nonaka K, Shum L, Takahashi I, Takahashi K, Ikura T, Dashner R, Nuckolls G.H., Slavkin H.C. Convergence of the BMP and EGF signaling pathways on Smad1 in the regulation of chondrogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 1999; 43: p. 795-807.
27. Wan M., Cao X. BMP signaling in skeletal development. *BBRC*. 2005; 328: p. 651-657.
28. Tavares AL., Garcia EL., Kuhn K., Woods CM., Williams T., Clouthier DE. Ectodermal-derived Endothelin1 is required for patterning the distal and intermediate domains of the mouse mandibular arch. *Developmental biology*. 2012; 371(1): p. 47-56.
29. Haworth K., Wilson J., Grevellec A, Cobourne M., Healy C., Helms J., y colaboradores. Sonic hedgehog in the pharyngeal endoderm controls arch pattern via regulation of Fgf8 in head ectoderm. *Developmental Biology*. 2007; 303: p. 244-258.
30. Melnick M., Witcher D., Bringas P., Carlsson P., Jakoll T. Meckel's Cartilage Differentiation Is Dependent on Hedgehog Signaling. *CTO*. 2005; 179: p. 146-157.
31. Terao F., Takahashi I., Mitani H., Haruyama N., Sasano Y., Suzuki O. Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats. *Developmental biology*. 2011; 350: p. 337-347.
32. Shimada M., Yamamoto M., Wkayama T., Iseki S., Amano O. Different expression of 25-kDa heat-shock protein (Hsp25) in Meckel's cartilage compared with other cartilages in the mouse. *Anat Embryol*. 2003; 206: p. 163 a 173.
33. Yamazaki,K., Suda N., Kuroda T. Immunohistochemical localization of Parathyroid hormone-related protein in Developing mouse meckel's cartilage and Mandible. *Archs oral Biol.* 1997; 42 (12): p. 787-794.
34. Ishii-Suzuki M., Suda N., Yamazaki K., Kuroda T., Senior P., Beck F.,Hammond V. Differential Responses to Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) Deficiency in the Various Craniofacial Cartilages. *The anatomical recod*. 1999; 255: p. 452-457.
35. Kubota S. CCN2 in orofacial tissue development and remodeling. *Japanese Dental Science Review*. 2012; 48: p. 101-113.

36. Du J., Fan Z., Ma X., Wu Y., Liu S., Gao Y. y colaboradores. Expression of DPP6 in Meckel ' s cartilage and tooth germs during mouse facial development. *Biotechnic & Histochemistry*. 2014; 89 (1): p. 14 - 18.
37. Kitazawa T., Fujisawa k., Narboux-Nême N., Arima Y, Kawamura., Tsuyoshi I. Distinct effects of Hoxa2 overexpression in cranial neural crest populations reveal that the mammalian hyomandibular-ceratohyal boundary maps within the styloid process s. *Developmental Biology* 402(2015)162–174. 2015; 402: p. 162-174.
38. Amano O., Koshimizub U., Nakamura T., Iseki S. Enhancement by hepatocyte growth factor of bone and cartilage formation during embryonic mouse mandibular development in - vitro. *Archives of Oral Biology*. 1999; 44: p. 935-946.
39. Augustinea K., Rossia R., Silbigera S., Bucayb N., Duryeac D., Marshall W. Evidence that the Protein Tyrosine Phosphatase (PC12,Br7,Sl) Gamma (-) isoform modulates patterning and growth chondrogenic. *Int. J. Dev. Biol.* 2000; 44: p. 361 - 371.
40. Ishizeki K., Takahashi N., Nawa T. Formation of the sphenomandibular ligament by Meckel's cartilage in the mouse: possible involvement of epidermal growth factor as revealed by studies in vivo and in vitro. *Cell Tissue Res*. 2001; 304: p. 67-80.
41. Ishizeki K., Kagiya K., Fujiwara N., Otsu K., Harada H. Biological Significance of Site—specific Transformation of Chondrocytes in Mouse Meckel's Cartilage. *J. Oral Biosci.* 2010; 52(2): p. 136-142.
42. Yokohama-Tamaki T., Maeda T., Tanaka T., Shibata S. Functional analysis of CTRP3/cartducin in Meckel's cartilage and developing condylar cartilage in the mouse mandible. *J. Anat.* 2011; 218: p. 517-533.
43. Shimada K., Nakajima A., Ikeda K., Ishibashi K., Shimizu N., Ito K. CD 47 regulates the TGF  $\beta$  signaling pathway in osteoblast in is distributed in Meckel's cartilage. *Journal of Oral Science*. 2011; 53 (2): p. 169-175.
44. Zhang Z., Wlodarczyk B., Niederreither K., Venugopalan S., Florez S., Finnell R. The expanded Meckel's cartilage would cause increased endochondral Specific Responses to Signaling Factors. *Plos One*. 2011; 6 (9): p. 1-16.
45. Chin J. WZ. Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development*. 1997; 124: p. 1519-1530.
46. Balic A., Adams D., Minaa M. Prx1 and Prx2 cooperatively regulate the morphogenesis of the medial region of the mandibular process. *Dev Dyn*. 2009; 238

(10): p. 2599-2613.

47. Lu M., Cheng H., Kern M., Potter S., Tran B., Diekwisch T. prx-1 functions cooperatively with another paired-related homeobox gene, prx-2, to maintain cell fates within the craniofacial mesenchyme. *Development*. 1999; 126: p. 495-504.
48. Ababneh KT., Al-Khateeb TH. Immunolocalization of Proteoglycans in Meckel's Cartilage of the Rat. *The Open Dentistry Journal*. 2009; 3: p. 177-183.
49. Shibata, S., Sakamoto Y., Yokohama-Tamaki T., Murakami G., Cho B. H.. Distribution of matrix proteins in perichondrium and periosteum during the incorporation of meckel's cartilage into ossifying mandible in midterm human fetuses: an immunohistochemical study. *The Anatomical Record*. 2014; 297(7): p. 1208-1217.
50. Chung KS., Nishimura I. Maintenance of regional histodifferentiation patterns and a spatially restricted expression of type X collagen in rat Meckel's cartilage explants in vitro. *Archives of oral biology*. 1999; 44(6): p. 489-497.
51. Ishizeki K., Kubo I., Yamamoto H., Nawa T. Immunocytochemical expression of type I and type II collagens by rat Meckel's chondrocytes in culture during phenotypic transformation. *Archives of Oral Biology*. 1998; 43(117-126).
52. Ekanayake S., Hall B. Hypertrophy is not a prerequisite for type X collagen expression or mineralization of chondrocytes derived from cultured chick mandibular ectomesenchyme. *Int.J. Deb. Biol*. 1994; 38: p. 638-694.
53. Chung KS., Park HH., Ting K., Takita H., Apte, SS., Kuboki Y., Nishimura I. Modulated expression of type X collagen in the Meckel's cartilage with different developmental fates. *Developmental biology*. 1995; 170(2): p. 387-396.
54. Ishizeki K., Hiraki Y., Kubo M., Nawa T. Sequential synthesis of cartilage and bone marker proteins during transdifferentiation of mouse Meckel's cartilage chondrocytes in vitro. *Int.J.Dev.Biol*. 1997; 41: p. 83-89.
55. Ishizeki K., Takigawa M., Nawa T., Suzuki F. Mouse Meckel's cartilage chondrocytes evoke bone-like matrix and further transform into osteocyte-like cells in culture. *The Anatomical Record*. 1996; 245(1): p. 25-35.
56. Ishizeki K., Shinagawa T., Nawa T. Origin-associated features of chondrocytes in mouse Meckel's cartilage and costal cartilage: an in vitro study. *Ann Anat*. 2003; 185: p. 403-410.

57. Ishizeki K. Imaging analysis of osteogenic transformation of Meckel's chondrocytes from green fluorescent protein-transgenic mice during intrasplenic transplantation. *Acta Histochemica*. 2012; 114: p. 608-619.
58. Sakakura Y., Shibui T., Irie K., Yajima, T. Metabolic mode peculiar to Meckel's cartilage: immunohistochemical comparisons of hypoxia-inducible factor-1a and glucose transporters in developing endochondral bones in mice. *Eur J Oral Sci*. 2008; 116: p. 341-352.
59. Sakakura Y., Hosokawa Y, Tsuruga E., Irie K., Nakamura M., Yajima T. Contributions of matrix metalloproteinases toward Meckel's cartilage resorption in mice: immunohistochemical studies, including comparisons with developing endochondral bones. *Cell Tissue Res*. 2007; 328: p. 137-151.
60. Gkantidis N., Katsaros C. Detection of gelatinolytic activity in developing basement membranes of the mouse embryo head by combining sensitive in situ zymography with immunolabeling. *Histochem Cell Biol*. 2012; 138.
61. Ishizeki K., Nawa T. Further evidence for secretion of matrix metalloproteinase-1 by Meckel's chondrocytes during degradation of the extracellular matrix. *Tissue & Cell*, 2000 32 (3) 207–215. 2000; 32 (3): p. 207-215.
62. Sakakura Y., Hosokawa Y., Tsuruga E., Irie K., Yajima T. In situ localization of gelatinolytic activity during development and resorption of Meckel's cartilage in mice. *Eur J Oral Sci*. 2007; 115: p. 212-223.
63. Sakakura Y. Role of Matrix Metalloproteinases in Extracellular Matrix Disintegration of Meckel's Cartilage in Mice. *J. Oral Biosci.* 2010; 52 (2): p. 143-149.
64. Tsuzurahara F., Soeta S., Kawawa T., Baba K., Nakamura M. The role of macrophages in the disappearance of Meckel's cartilage during mandibular development in mice. *acta histochemica*. 2011; 113: p. 194-200.
65. Sakakura Y., Tsuruga E., Irie K., Hosokawa Y., Nakamura H., Et al. Immunolocalization of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in Meckel's cartilage compared with developing endochondral bones in mice. *J. Anat*. 2005; 207: p. 325-337.
66. Tsuzurahara F., Nakamura M. Macrophages Are Key Cells for the Initiation of Meckel's Cartilage Disappearance. *J. Oral Biosci*. 2010; 52 (2): p. 150-154.
67. Parada C., Li J., Iwata J., Suzuki A., Chai Y. CTGF mediates Smad-dependent transforming growth factor  $\beta$  signaling to regulate mesenchymal cell proliferation during

- palate development. *Molecular and cellular biology*. 2013; 33(17): p. 3482-3493.
68. Ivkovic S., Yoon B.S., Popoff S.N., Safadi F.F., Libuda D.E., Stephenson R.C., et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development*. ; 130(12): p. 2779-2791.
  69. Choi J.W., Kim J.T., Park J.H., Park E.K., Kim S., Kwon T., et al. gp130 is important for the normal morphogenesis of Meckel's cartilage and subsequent mandibular development. *Experimental and molecular medicine*. 2007; 39(3): p. 295-303.
  70. Frommer J., Margolies M. Contribution of Meckel's Cartilage to Ossification of the mandible in mice. *Journal of dental research*. 1971; 50(5): p. 1260-1267.
  71. Lorentowicz-Zagalak M., Przysłańska A., Woźniak, W. The development of Meckel's cartilage in staged human embryos during the 5th week. *Folia Morphol*. 2005; 64(1): p. 23-28.
  72. Lee S. K., Kim Y.S., Oh H.S., Yang, KH., Kim, EC., Chi, JG. Prenatal development of the human mandible. *The Anatomical Record*. 2003;263(3): p314-325

## ANEXO 1

### HOMOLOGÍA ENTRE ESTADÍOS DE DESARROLLO EMBRIONARIO DE HUMANOS, RATAS Y POLLOS

