



Determinación inmunohistoquímica del factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento transformante beta-3 en pacientes con labio y paladar hendido*

Immunohistochemical determination of epidermal growth factor and transforming growth factor Beta-3 in cleft lip and palate patients*

CD Carolina López González,** Dra. Santa Ponce Bravo,***
CDCOMF María Luisa López Salgado****

Palabras clave:

Labio y paladar hendido, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante $\beta 3$, determinación inmunohistoquímica.

Key words:

Cleft lip and palate, epidermal growth factor, $\beta 3$ transforming growth factor, immune-histochemical determination.

* Ganador en el Concurso de Trabajos Libres. Congreso de la Asociación Mexicana de Labio y Paladar Hendido y Anomalías Craneofaciales, A.C.
** Hospital General «Doctor Manuel Gea González». División de Estomatología-Ortodoncia. México, D.F. Facultad de Odontología, UNAM.
*** División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM. Departamento de Patología Bucal. México, D.F.
**** Hospital para el Niño. DIF Toluca. Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial. Toluca, Estado de México.

RESUMEN

En este estudio transversal identificamos la presencia y tipo de expresión de los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) en la mucosa de pacientes de ambos sexos con labio y paladar hendido, de un mes a 14 años de edad, sometidos a cirugía para el cierre de estos defectos. Establecimos como variable independiente el tipo de expresión de los factores de crecimiento y la variable dependiente del tipo de hendidura. Los tejidos se procesaron para su tinción con hematoxilina-eosina e inmuno-histoquímica por técnica de Avidin-Biotin-Streptavidina con factores de crecimiento epidérmico y transformante $\beta 3$ para su observación al microscopio óptico. Obtuvimos 49 muestras de tejidos blandos de la zona de la hendidura tomadas durante la cirugía de 24 pacientes con labio y paladar hendido completo, 16 con labio hendido y 9 con hendiduras de paladar. Las mayores reacciones con inmunohistoquímica se observaron en las hendiduras más pequeñas y las de menor grado en las hendiduras más grandes, concluyendo que los factores de crecimiento epidérmico y de crecimiento transformante $\beta 3$ son esenciales durante la formación del epitelio labial y del paladar.

ABSTRACT

In this cross sectional study we identified the type of manifestations and presence of epidermal growth factor and transforming growth factor beta-3 in the mucous membrane of male and female patients ranging in age from 1 month to 14 years who received corrective surgery for cleft lip and palate. We established as an independent variable, growth factor type manifestations and the cleft type as a dependent variable. Tissue samples were tinted with hematoxylin-eosin and immune-histochemical dyes, use of the Avidin-Biotin-Streptavidin method with epidermal growth factors and transforming growth factor beta-3 for visual analysis with an optical microscope. We obtained 49 samples of soft tissue in the area of the cleft during surgery on 24 patients with full cleft lip and palate, 16 with cleft lip and 9 with cleft palate. The greatest reactions with immunohistochemical were observed in small clefts and the lesser in the larger fissures, concluding that epidermal growth and $\beta 3$ transforming growth factors are essential during the formation of the lip and palate epithelium.

INTRODUCCIÓN

El labio y paladar hendido son defectos del desarrollo embrionario producidos por herencia poligénica o multifactorial.^{1,2} Según Sapp,³ es un trastorno del desarrollo que habitualmente afecta al labio superior y se caracteriza por un defecto en forma de cuña como resultado o consecuencia de la ausencia de fusión de las dos partes del labio

en una sola estructura. Desde el punto de vista embrionario, el labio hendido superior deriva de la ausencia de fusión entre el proceso nasal medio y los dos procesos maxilares, y en los raros casos de labio hendido inferior se debe a la falta de fusión de los procesos mandibulares en la línea media.^{4,5}

El paladar hendido es un defecto en su desarrollo que se caracteriza por la falta de fusión total de las dos crestas palatinas, que se podría



deber al pequeño tamaño de éstas, a su falta de ascenso, a la inhibición del propio proceso de fusión, o a la presencia de micrognatia que hace que la lengua no descienda entre las crestas, produciendo una comunicación con la cavidad nasal.⁵

Estos defectos del desarrollo están influenciados por la disminución en la expresión de factores de crecimiento, que son pequeños fragmentos proteicos biológicamente activos que pertenecen al grupo de las citoquinas, y en unión con las hormonas y neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular.^{6,7}

Entre los factores de crecimiento que intervienen en la fusión del labio y paladar se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF)⁷ y el factor de crecimiento transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$), y se ha observado que ambos intervienen directamente en la fusión de las crestas palatales.⁸ El EGF actúa sobre la proliferación de tejidos epiteliales y el TGF- $\beta 3$, actúa sobre el epitelio de fusión del paladar. Esta disminución de factores de crecimiento se descubrió por medio de estudios de inmunohistoquímica, ya que estas técnicas han ayudado a observar y determinar con gran precisión estructuras celulares y antígenos en tejidos que manifiestan distintas patologías.⁷⁻⁹

Machida, en 1999, aseguró que durante mucho tiempo el labio y el paladar hendidos han sido objeto de innumerables estudios a nivel mundial, poniendo atención en la identificación de los posibles factores etiológicos.¹⁰⁻¹² Sin embargo, en sus estudios Alappat,¹³ y Dudas,¹⁴ detectaron la presencia inhibitoria de la señalización para la activación de algunos factores de crecimiento, entre los que destaca el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta 3$), importantes para la formación del paladar,¹³⁻¹⁵ y Nawshad,¹⁶ refirió que el TGF- $\beta 3$ regula la transformación del epitelio del borde medio a mesénquima para producir la confluencia palatal.

El objetivo de este trabajo fue identificar la presencia cualitativa de los factores de crecimiento EGF y TGF- $\beta 3$ en la mucosa de las hendiduras labiales y palatinas y correlacionarla con el tipo de hendidura.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio en 49 muestras de tejido blando labio-palatino obtenidas todas ellas del tejido sobrante de la zona quirúrgica de unión que los cirujanos desecharon sin implicar riesgo adicional para los pacientes: 16 de pacientes con labio hendido, 9 con paladar hendido, y 24 con labio y paladar hendido completo.

El tipo de expresión de los factores de crecimiento (según la escala ordinal)⁹ se consideró como variable independiente y el tipo de hendidura como variable dependiente, como labio hendido, paladar hendido, y labio y paladar hendido combinados, de acuerdo con la clasificación de Kernahan y Stark,¹⁷ que utiliza bases embriológicas para describir la hendidura.

Incluyó a pacientes de cualquier sexo y edad, con diagnóstico de labio hendido, paladar hendido, o labio y paladar hendido completo o incompleto, que no se hubieran sometido a cirugías previas, con hemoglobina de 10 g/dL o superior. Se excluyó a pacientes con labio fisurado y paladar hendido sindrómicos, con enfermedades sistémicas o desnutrición infantil.

El tejido de las hendiduras se procesó para teñirse con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica con técnica de avidin-biotin-streptavidina con EGF y TGF $\beta 3$, para su observación al microscopio óptico.

Se utilizaron reactivos y anticuerpos:

Reactivos. Paraformaldehído, agua bideshidratada, tinción hematoxilina-eosina (H-E) y Hematoxilina de Gill, xilol, alcohol absoluto, alcohol 96°, buffer de fosfatos, buffer de citratos, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio básico, solución de albúmina, solución proteína bloqueadora (BSA) 2%, PBS, y resina (Entelan).

Anticuerpos. Anticuerpos primarios contra: Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) Santa Cruz, factor de crecimiento transformante $\beta 3$ (FCT- $\beta 3$) Santa Cruz, Anticuerpo secundario LSAB+ SYS HRP Lg (Marca DAKO), Suero libre de proteína bloqueadora (Marca DAKO) y Cromógeno DBA+Lg (Marca DAKO).

En este estudio no hubo ningún conflicto de interés con ninguna empresa, directivo o institución.

RESULTADOS

Los pacientes con labio y paladar hendido completo fueron 24 (49%), con labio hendido 16 (33%) y con hendidura de paladar 9 (18%). El rango de edad fue de 1 mes a 14 años (*Figuras 1 y 2*): 31 hombres (63%) y 18 mujeres (37%).

Resultados histológicos

Labio hendido unilateral completo

Los hallazgos histopatológicos con H-E demostraron recubrimiento epitelial estratificado, escamoso, paraqueratinizado, en la mayoría de los casos; los clavos epiteliales fueron profundos, anchos y proliferativos. También

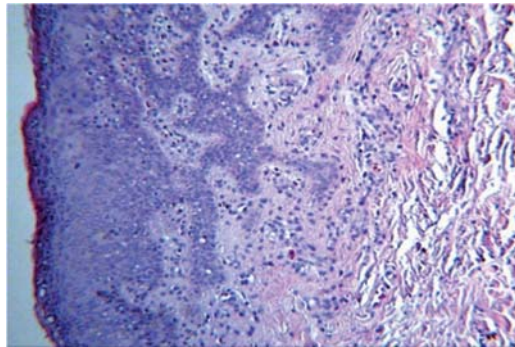


Figura 1. Labio hendido unilateral completo. Corte histológico teñido con H-E de niño de 1 mes de edad. En el tejido conjuntivo se observa una zona de fibrosis con haces gruesos de fibras colágenas e infiltrado linfocitario.

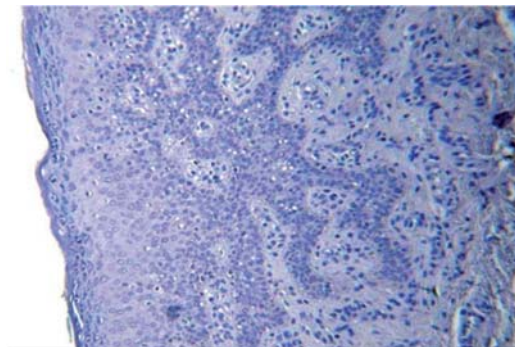


Figura 2. Labio hendido unilateral completo. La inmunohistoquímica fue positiva con reacción leve con el FCE.

se observaron cuerpos de inclusión, edema intracelular y espongiosis en otros cortes. El estroma fue fibroso denso en unos casos, en otros laxo y en otros hialino. Los haces de fibras de colágena anchas, infiltrado inflamatorio de leve a moderado, de tipo linfocitario y plasmocitario; abundantes glándulas sebáceas, así como folículos pilosos y haces musculares densos. La reacción inmuno-histoquímica con EGF fue negativa en la mayoría de las muestras, con TGF β 3 moderada (*Figuras 1 a 3 y Cuadro I*).

Labio hendido unilateral incompleto

Con H-E se observó epitelio estratificado escamoso paraqueratinizado; zonas hiperplásicas en el estrato basal, de tipo poliédricas en la zona del estrato espinoso en las capas más profundas; hacia la superficie de forma ovalada con edema intracelular y vacuolas y estrato granuloso escaso, con pocos clavos epiteliales. El estroma adyacente laxo, el epitelio se encontró atrófico con estroma fibroso denso así como abundantes vasos sanguíneos en los sitios cercanos a la hendidura. La reacción inmuno-histoquímica con el EGF fue de leve a moderado y con TGF- β 3 fue de moderada a intensa en la mayoría de las muestras (*Cuadro II*).

Labio hendido bilateral completo

Con H-E se observó en su mayoría epitelio estratificado escamoso paraqueratinizado, con espongiosis y edema intracelular que abarcaba estrato espinoso y granuloso, con cuerpos de inclusión en los queratinocitos cercanos a la hendidura y los clavos epiteliales eran anchos. El estroma fibroso laxo en algunas zonas y en otras denso. La inmunohistoquímica realizada con EGF fue leve en la mayoría de los casos y moderada con el FCT- β 3 (*Cuadro I*).

Paladar hendido completo

Con H-E se observó atrofia epitelial, con epitelio estratificado escamoso paraqueratinizado, con hiperplasia en la capa basal e hiperchromatismo nuclear; cuerpos de inclusión en los queratinocitos del estrato espinoso y ausencia de clavos epiteliales. Estroma fibroso con abundante infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario en la

mayoría de los casos, con abundantes vasos sanguíneos. La respuesta inmuno-histoquímica con el factor EGF fue negativa en la mayoría de los casos y con TGF- β 3 intensa, mostrándose en el citoplasma celular de los queratinocitos (*Cuadro I*).

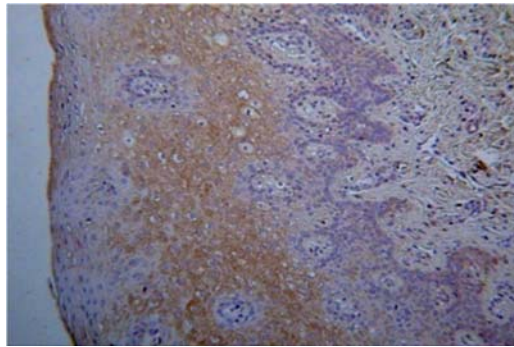


Figura 3. Labio hendido unilateral completo. La inmunohistoquímica fue moderada con FCT β 3.

Paladar hendido secundario incompleto

Con H-E se observó atrofia epitelial cerca de la zona de la hendidura, con epitelio estratificado escamoso paraqueratinizado, áreas de hiperplasia en la capa basal y ausencia de clavos epiteliales. El estroma fibroso tenía infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario con abundantes vasos sanguíneos, yemas capilares y zonas de hemorragia antigua. La reacción inmuno-histoquímica con EGF en la mayoría de los casos fue moderada; la respuesta inmunológica con el TGF- β 3 fue intensa en forma homogénea en el citoplasma celular de los queratinocitos, desde la capa basal hasta el estrato granular (*Cuadro I* y *Figuras 4 a 6*).

Paladar hendido completo

Con H-E se observó que el revestimiento epitelial estaba constituido por epitelio escamoso estratificado queratinizado, sin clavos

Cuadro I. Corte histológico teñido con H-E de niño de tres meses de edad con paladar hendido secundario incompleto. Histológicamente se observa que el epitelio cercano a la hendidura es atrófico; hacia la zona de tejido sano el epitelio es hipertrófico con edema intracelular, el estroma es hialino con áreas de tejido laxo poco celular, conductos glandulares y vasos sanguíneos abundantes.

Tipo de hendidura	Grado de tinción			
	Negativo	Leve	Moderado	Intenso
Labio hendido	0	3	8	5
Paladar hendido	0	0	3	6
Labio y paladar hendido	0	6	5	13
	0 (0%)	9 (18%)	16 (33%)	24 (49%)

Cuadro II. Paladar hendido secundario incompleto. La inmunohistoquímica con FCE fue moderada con distribución homogénea.

Tipo de hendidura	Grado de tinción			
	Negativo	Leve	Moderado	Intenso
Labio hendido	9	6	1	0
Paladar hendido	3	1	5	0
Labio y paladar hendido	6	8	7	3
	18 (37%)	15 (31%)	13 (26%)	3 (6%)

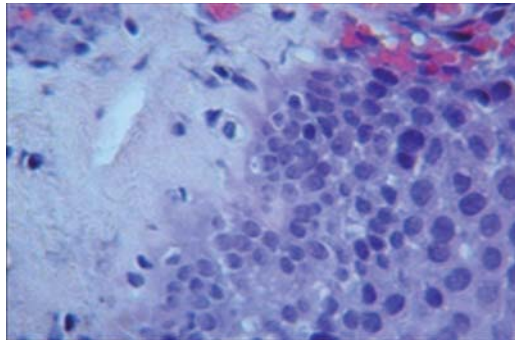


Figura 4. Paladar hendido secundario incompleto. La inmunorreacción con FCE fue intensa con el FCTβ3 principalmente en la capa basal y las capas suprabasales del estrato espinoso.

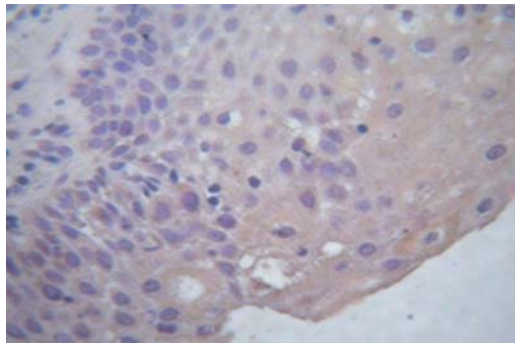


Figura 5. Corte histológico teñido con H y E, de niña de tres años de edad con labio y paladar hendido bilateral completo. Histológicamente se observa epitelio queratinizado, estroma fibroso denso, fibroblastos activos y abundantes vasos sanguíneos.

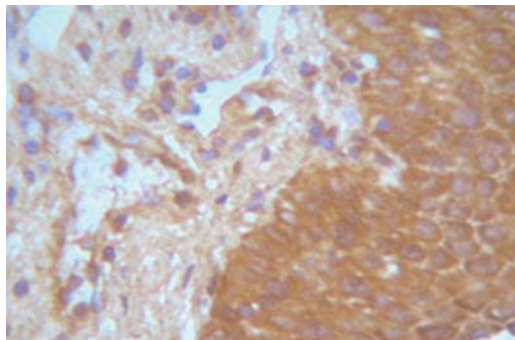


Figura 6. Labio y paladar hendido bilateral completo. La respuesta al factor FCE inmunohistoquímicamente fue leve con distribución homogénea.

epiteliales. Estroma fibroso laxo y denso poco celular en diferentes zonas, con haces gruesos de colágena y vasos sanguíneos abundantes, infiltrado inflamatorio en la mayoría de los casos y lisis celular. La respuesta inmunológica a EGF fue moderada en la mayoría de los casos, con distribución uniforme en todas las capas epiteliales, con una reacción más intensa en la capa basal y córnea. La reacción con TGF-β3 fue intensa (*Cuadros I y II*).

Labio y paladar hendido unilateral completo

Con H-E se reveló la presencia de epitelio estratificado escamoso paraqueratinizado hacia la zona de la mucosa bucal y queratinizado hacia la zona del bermellón, con queratinización individual, clavos epiteliales profundos, anchos y zonas de espongirosis. El estroma fue fibroso denso, con abundantes vasos sanguíneos y yemas capilares. Hacia la cavidad bucal, el epitelio era hiperparaqueratinizado hiperplásico y presencia de glándulas accesorias de secreción mixta. La inmuno-histoquímica con EGF tuvo respuesta leve de forma homogénea e intensa en algunos casos con distribución heterogénea (*Cuadros I y II*).

Labio y paladar hendido bilateral completo

Con H-E el epitelio se encontró formado por estratos: el córneo paraqueratinizado hacia la zona de la mucosa bucal y queratinizado hacia la zona del bermellón, con queratinización individual y clavos epiteliales anchos y profundos. En algunos casos presentaban hacia la cavidad bucal epitelio estratificado escamoso hiperparaqueratinizado, con zonas hipertróficas, y el epitelio del bermellón se encontró atrófico y en las zonas de transición hiperplásico. El estroma en general fue fibroso denso con abundantes vasos sanguíneos y capilares, con zonas focales de respuesta inflamatoria crónica. Algunas muestras tenían colonias bacterianas adyacentes a la zona de hendidura. La reacción de inmuno-histoquímica con el factor EGF fue leve y con TGF-β3 moderada (*Cuadros I y II* y *Figuras 7 a 9*).

DISCUSIÓN

Existe una profusión de estudios clínicos que reportan la prevalencia de defectos en el cierre

de los procesos labiales y palatinos, y el más frecuente es del labio y paladar combinado unilateral completo izquierdo,¹⁸ lo que coincide con los hallazgos encontrados en este trabajo.

A diferencia de otros estudios fundamentados en el análisis sanguíneo para la detección de genes, el nuestro lo hace realizando la detección de factores de crecimiento directamente en la zona tisular afectada.^{7,8,12-14,16,18}

Dentro de la población estudiada, la mayor cantidad de niños sometidos a procedimientos quirúrgicos para el cierre de los defectos de hendidura es a temprana edad, esto debido a la campaña de concientización hacia la población afectada. Se registró un mayor porcentaje entre la población de un mes a 14 años de edad, en pacientes sometidos a cirugía para el cierre del defecto. Las edades con mayor predominio fueron de un mes a 11 meses de edad (67%), con la mayor incidencia en niños con labio y paladar hendido de tres meses de edad. Como se mencionó previamente, en edades tempranas se pueden reducir en gran medida los problemas como la desnutrición del niño afectado con hendiduras de labio y paladar e inadecuada fonación, además de contribuir en su tratamiento ortopédico.¹⁷

Es importante señalar que las muestras obtenidas dentro del universo de trabajo no resultaron iguales en número en cada uno de los tipos de hendidura, esto debido a que la mayor cantidad de la población que sufre este tipo de defecto corresponde a los de labio y paladar hendido completo, como lo señala la literatura, enfocándose en pacientes del sexo femenino,⁵ a diferencia de este estudio, donde

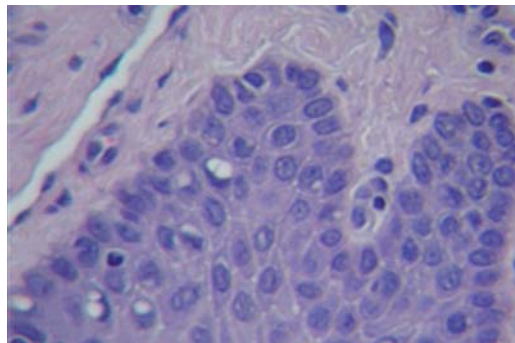


Figura 7. Labio y paladar hendido bilateral completo. La inmunohistoquímica fue leve a moderada con el FCT β 3.

la mayor cantidad de niños atendidos fueron varones. Esto no se puede inferir dado que en las brigadas de atención que se realizan en los estados, la mayor cantidad son varones, por la ideología que prevalece dentro de las zonas de atención. Un alto número de pacientes pertenecen a las instituciones dedicadas a la atención infantil, como es el caso del Hospital para el Niño DIF de Toluca, Estado de México, seguido por brigadas encaminadas al cierre de la hendidura labial y palatal, que son del conocimiento público en estados como Chiapas, Estado de México y Quintana Roo, principalmente, estados que cuentan con un alto número de pacientes con defectos de hendidura.^{19,20} Se sabe bien que este problema de

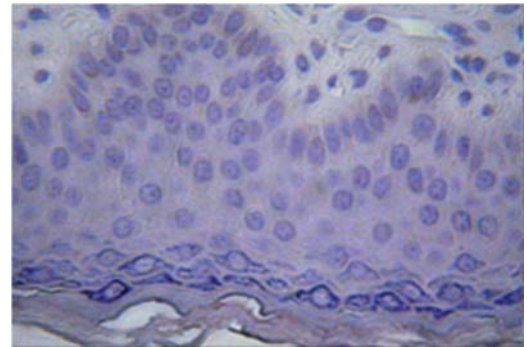


Figura 8. Resultados de la inmunohistoquímica con EGF. Por tipo de hendidura y número de casos. Muestra el mayor número de tinción de tipo negativo en fisuras labiales, lo que se traduce en fisura labial de menor grado.

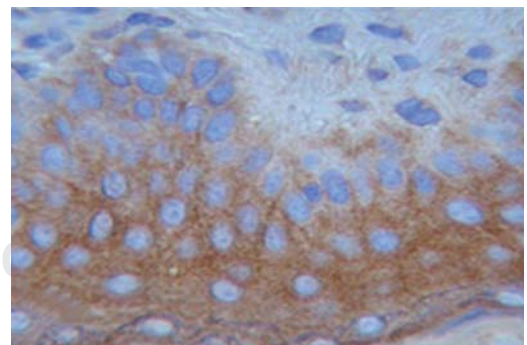


Figura 9. Resultados de la inmunohistoquímica con TGF β 3. Por tipo de hendidura y número de casos. Muestra el mayor número de tinción de tipo intenso en hendiduras de labio y paladar, seguido por paladar.

salud es multifactorial, en la mayoría de origen genético y en otras adquirido.²¹

También la posibilidad de encontrar una menor cantidad de factores de crecimiento, aunado a la cirugía realizada puede marcar la diferencia entre el éxito y el fracaso o el desarrollo de una fístula en el proceso de cicatrización, con recidivas constantes. En este estudio encontramos que la presencia y tipo de expresión (según la escala ordinal) de los factores de crecimiento EGF y TGF- β 3 en la mucosa de las hendiduras labiales y del paladar hendido de pacientes de ambos sexos, de cualquier edad, que fueron sometidos a cirugía para el cierre de estos defectos, mostraron desde el punto de vista inmuno-histoquímico diferentes valores. Los factores de crecimiento EGF y TGF- β 3 en la mucosa de las hendiduras labiales fue de menor intensidad con el EGF, que el otro factor, el cual presentó una mayor intensidad en la respuesta. A diferencia de la presencia de los factores de crecimiento EGF y TGF- β 3 en la mucosa de las hendiduras palatinas, se encontró una mayor reacción con ambos factores. El TGF- β 3 en estudios realizados en modelos experimentales se encontró en menor expresión; esto no concuerda con lo encontrado en este estudio, porque se encontró una respuesta inmune intensa en las muestras de mucosa palatina, debido a que las estructuras maxilares aún presentan potencial de crecimiento incluso después del nacimiento.¹⁶⁻¹⁸ Los resultados en relación con EGF concuerdan con lo expresado por Alappat,¹³ y Dudas,¹⁴ quienes refirieron la inhibición de la señalización para la activación de algunos factores. En este estudio se encontró inhibición del factor EGF, no así el del TGF- β 3. La presencia de diversos factores estimulantes (EGF y TGF- β 3) en los distintos tipos de expresión (leve, moderado, intenso y negativo) está directamente relacionada con la falta de fusión de la hendidura labial y el tamaño de la misma, además de los pliegues palatales; a menor hendidura mayor reacción e inversamente con las otras hendiduras. En lo referente a la reacción inmuno-histoquímica, es importante señalar que el EGF tuvo un mayor número de casos con reacciones de tipo negativo, encontrando 19 muestras sin reacción (37%), 2 con respuesta inmunológica intensa (6%), 13 con respuesta moderada (26%) y 15 leve

(31%), mientras que el TGF- β 3 presentó una respuesta inmunohistoquímica más intensa en 23 casos (47%), 17 de tipo moderado (35%) y 9 con reacción leve (18%). Es posible que la acción de uno de los factores, en este caso el TGF- β 3, no se encontró inhibido, no así EGF, que mostró poca respuesta del EGF en la mayor parte de las muestras.^{22,23}

Un hallazgo histológicamente importante fue la presencia de coilocitos, que se encontraron distribuidos en todas las capas del epitelio, así como la presencia de respuesta inflamatoria en cinco casos con presencia de colonias bacterianas adyacentes a la zona de la hendidura. Otro hecho fue la característica del epitelio atrófico cercano a la hendidura y en la parte distal al mismo la reacción hiperplásica en algunos casos y en la mayoría el epitelio se observó hipertrófico, así como la espongiosis y el edema intracelular que abarcaban las capas espinosa, granulosa y córnea.

CONCLUSIONES

En cuanto a los resultados de la inmunohistoquímica del EGF, las mayores reacciones leves se observan en las hendiduras más pequeñas, mientras que las hendiduras más grandes se observaron con un menor grado de tinción. En la inmunohistoquímica del TGF- β 3 se observó una gran reacción en todas las muestras. Detectamos una tinción intensa en el paladar hendido, y la reacción menos marcada en el labio, ya que se detectaron grados, de leve a moderado, encontrando mayor reacción en el labio hendido bilateral completo. Analizando ambos resultados concluimos que se detecta un mayor grado de tinción mientras más pequeña es la hendidura del labio.

Observamos que en el labio el factor que menos presenta tinción (reacción leve) es el EGF y el paladar tiene una mayor reacción.

En cuanto a la reacción que se presenta con el TGF- β 3, la tinción que más predomina en el labio hendido es la moderada, manejándose una reacción bastante intensa en el paladar hendido.

Estos hallazgos tienen un valor pronóstico en el tipo y tamaño de hendidura labial que se presente, ya que mientras mayor sea la expresión del EGF, las hendiduras presentarán menor grado de severidad. En relación al TGF- β 3, en

donde se observa una reacción disímil a la anterior, se continuarán realizando más estudios para observar su grado de expresión.

REFERENCIAS

- Regezi J, Sciubba J. Enfermedades metabólicas y genéticas de los maxilares. En: Regezi J, Sciubba J. *Texto de Patología Bucal. Correlaciones clínico-patológicas*. México: Ed. McGraw-Hill Interamericana, 3ra ed. 2000; Capítulo 15, pp. 420-449.
- Ibáñez J, Ruiz MI, Cajigal L, Lara J, Rus J. Labio leporino unilateral y bilateral. *Manual de Cirugía Plástica*. SECPRE. Tema 23. 2007.
- Sapp J, Eversole L, Wysocki G. Alteraciones del desarrollo de la región oral. En: Sapp J, Eversole L, Wysocki G. *Texto de patología oral y maxilofacial contemporánea*. España: Ed. Harcourt-Mosby 2003, Capítulo 1; pp. 1-37.
- Sadler T. Embriología especial. Cabeza y cuello. En: Sadler T. *Langman embriología médica con orientación clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana 8va. ed. 2002; Capítulo 15, pp. 334-369.
- Neville, D, Allen, Bouquet. Developmental defects of the oral and maxillofacial region. En: Neville D, Allen, Bouquet. *Oral and maxillofacial pathology*. W.B. Saunders Company 2da. ed. 2002, Capítulo 1, pp. 1-48.
- Arquero P. Factores de crecimiento y rejuvenecimiento facial. *Rev Med Est*. 2003; 7(1). <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n34/fce.html>
- Cui X, Shiomi N, Chen J, Saito T, Yamamoto T, Ito Y et al. Overexpression of Smad2 in TGF- β -null mutant mice rescues cleft palate. *Develop Biol* 2005; 278(1): 193-202.
- Sasaky Y, O'Kane S, Dixon J, Dixon M, Ferguson M. Temporal and spatial expression of Pax9 and Sonic hedgehog during development of normal mouse palates and cleft palates in TGF- β null embryos. *Archives of Oral Biology* 2007; 52(3): 260-267.
- Moreno A, López S, Corcho A. Principales medidas en epidemiología. *Salud Pública de México* 2000; 42(4): 337-348.
- Corbo RMT, Marimón TME. Labio y paladar fisurados. Aspectos generales que se deben conocer en la atención primaria de salud. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2001; 17(4): 379-385.
- Trigos I, Saavedra D. Consideraciones generales en las malformaciones congénitas. En: Coiffman F. *Cirugía Plástica Reconstructiva y Estética*. Editorial Científico Técnica 1986. Tomo 1; pp. 675-719.
- Machida J, Yoshiura K, Funkhauser C, Natsume N, Kawai T, Murray J. Transforming Growth Factor- α (TGFA): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in non-syndromic cleft lip/palate and cleft palate only. *Genomics* 1999; 61: 237-242.
- Alappat S, Zhang Z, Suzuki K, Zhang X, Liu H, Jiang R, Yamada G, Chen Y. The cellular and molecular etiology of the secondary palate in Fgf10 mutant mice. *Developmental Biology* 2005; 277(1): 102-113.
- Dudas M, Kim J, Li W, Nagy A, Larsson J, Karlsson S, Chai Y, Kaartinen V. Epithelial and ectomesenchymal role of the type I TGF- β Receptor Alk5 during facial morphogenesis and palatal fusion. *Develop Biol* 2006; 296(2): 298-314.
- Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry* 2007; 48: 193-216.
- Nawshad A, La Gamba D, Hay E. Transforming growth factor- β (TGF β) signaling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch Oral Biol* 2004; 49(9): 675-689.
- Kernahan y Stark. Aspectos Generales. Clasificación de Labio y Paladar Hendido. En: Rozen I. *Texto de labio y paladar hendido*. Conceptos básicos. México: Compu edición y Cuidado 2000. Capítulo 1, pp. 17-35.
- Bianchi F, y cols. Environment and genetics in the etiology of cleft lip and cleft palate with reference to the role of folic acid. *Epidemiol Prev* 2000; 24(1): 21-27.
- Montanari D, Penchaszadeh V. *Estudio epidemiológico sobre defectos de cierre del tubo neural. Detección del polimorfismo C677T en pacientes con mielomeningocele, del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan", sus madres y población general, entre los años 1999 y 2001*. Repositorio Digital Institucional "José María Rosa" [Tesis de maestría, en epidemiología, gestión y políticas de salud] [Buenos Aires, Argentina]: Universidad Nacional de Lanús 2002, pp. 1-144. http://www.repositoriojmr.unla.edu.ar/descarga/Tesis/MaE-GyPS/05702_Montanari.pdf
- Gómez R, Lara R. Incidencia de labio y paladar hendido en México: 2003-2006. *Revista ADM* 2008; LXV(6): 309-313.
- González C, Medina C, Pontigo A, Casanova J, Escoffié M, Corona M, Maupomé G. Estudio ecológico en México, sobre labio y/o paladar hendido y factores socio-demográficos, socioeconómicos y de contaminación asociados. *An Pediatr (Barc)* 2011; 74(6): 377-387.
- Gálvez F, Sandoval A, Armendáriz J. El factor de crecimiento transformante β 3 como blanco terapéutico. *Salud Pública Mex* 2004; 46 (1): 341-350.
- Dávalos I, Ramírez E, Mena J, Ledezma V, Dávalos N, Mercado M et al. Variante C677T del gen metileno-tetrahidrofolato reductasa en niños mexicanos con labio y paladar hendido no sindrómico. *Rev Med Inst Mex Seg Soc* 2009; 47(5): 549-552.

Correspondencia:

CD. Carolina López González

Cerrada 10 de Ojo de Agua Núm. 7,

Col. Lomas de San Bernabé,

Del. Magdalena Contreras, 10350, México, D.F.

Tel: 40003093

Cel: (044) 5532241517

E-mail: caroleta21@hotmail.com