

Universidad Nacional Autónoma de  
Nicaragua  
Unan- León  
Facultad de Ciencias Médicas



**TITULO:**  
**INMUNODETECCION DE CITOQUERATINAS, VIMENTINA, CADHERINA-  
E Y ACTINA MUSCULAR ALFA EN LOS PROCESOS PALATINOS DEL  
EMBRIÓN HUMANO EN DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DE  
PALATOGÉNESIS.**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MASTER EN MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA  
CELULAR.**

AUTORA:

Dra. Darling Valverde Luna.  
Patóloga.

TUTORA:

Dra. María Angélica Montenegro.  
Profesor Titular Instituto de Investigaciones  
Biomédicas- Universidad de Chile.

ASESOR:

Lic. Edel María Paredes.  
Profesor Titular.  
Departamento de Ciencias Morfológicas

## **INMUNODETECCIÓN DE CITOQUERATINAS ,VIMENTINA ,CADHERINA E Y ACTINA MUSCULAR ALFA EN LOS PROCESOS PALATINOS DEL EMBRIÓN HUMANO EN DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DE PALATOGENESIS.**

**Valverde D\* , Montenegro M.A\*\* ,Paredes,E.M\*\*\***

El desarrollo del paladar secundario en mamíferos requiere que las células epiteliales y mesenquimales lleven a cabo patrones específicos de diferenciación celular que permitan a los procesos palatinos reposicionarse y fusionarse. En el paladar embrionario, ésta conversión fenotípica involucra:

- a. Una reorganización del citoesqueleto como: aparición de vimentina y pérdida de citoqueratinas.
- b. Cambios en la interacción celular: pérdida en las uniones celulares y cambios en las moléculas de adhesión. Algunos compuestos de la placa desmosomal como caderina-E se pierden o experimentan redistribución.

Cambios en la matriz extracelular como pérdida de la lámina basal. Laminina y colágeno tipo IV son reemplazados por fibronectina y colágeno tipo I.

En éste estudio se pretendía establecer las características de la transformación epitelio-mesénquima durante le proceso de fusión palatina ,que permitieran conocer la expresión de marcadores propios del epitelio y el mesénquima y su modificaci{on durante éste proceso dinámico ,an embriones humanos y compararlos con lo observado en embriones de ratón ; estudiando las características de los filamentos intermedios ,de actina muscular alfa y de una molécula de adhesión celular de las células epiteliales del paladar embrionario humano.

Se utilizaron 3 embriones de 6 semanas de gestación, 3 embriones de 7 semanas, 5 embriones de 8 semanas y 4 embriones de 8 ½ semanas.

1. La inmunotinción con anticuerpo antipancitoqueratina AE1 fue positiva en todas las etapas del proceso de palatogénesis estudiadas, resultados similares se observaron con el anticuerpo anticadherina –E.

2. La identificación de la isoforma alfa de actina de músculo liso fue negativa en el epitelio del borde medial en las diferentes etapas.
3. Las características de inmunotinción con marcadores epiteliales ( antipanticoqueratina AE1 y anticadherina – E ) en embriones humanos se corresponde a las observadas en etapas similares de la palatogénesis en ratón .
4. La falta de expresión de antiactina alfa de músculo liso en epitelio de los procesos palatinos , difiere de las observaciones en ratón .

\*Patóloga ,profesor de la facultad de Medicina ,UNAN –León ,Nicaragua .

\*\*Profesor titular Instituto de Investigaciones biomédicas ,Universidad de Chile .

\*\*\*Profesos titular Departamento de ciencias morfológicas UNAN-León

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo del paladar secundario en mamíferos requiere que las células epiteliales y mesenquimales lleven a cabo patrones específicos de diferenciación celular que permitan a los procesos palatinos reposicionarse y fusionarse (Walter and Fraser, 1956; Coleman 1965; Pourtois, 1972; Ferguson and Honing, 1984; Ferguson, 1988; Shuler et al., 1991, 1992).

El evento final en la fusión del paladar secundario requiere que una subpoblación específica de células epiteliales palatinas, la lámina epitelial media (LEM), se descontinue y eventualmente desaparezca para así permitir la confluencia mesenquimal (Pourtois, 1966; Smiley, 1970; Morgan, 1976; Shuler et al., 1991, 1992). (Ver Anexo 1)

Este proceso puede ser el resultado de tres mecanismos distintos:

- a. Muerte celular programada o apoptosis en algunas células superficiales (Shapiro and Sweney, 1969; Hudson and Shapiro, 1973; Pratt and Martin 1975; Pratt and Greene, 1976; Pratt et al., 1984; Shuler, 1995).
- b. Transformación de células epiteliales (principalmente basales) en células mesenquimáticas (Fitchett and Hay, 1989; Shuler et al., 1991; Montenegro y Rojas, 2002). (Ver Anexo 2)
- c. Migración de células de la LEM al epitelio oral y nasal superficial (Ferguson, 1988).

La transformación epitelio-mesénquima es un proceso celular crítico que conduce a la morfogénesis de un número considerable de órganos y tejidos, como la formación de mesodermo durante la gastrulación, la separación y migración de la cresta neural, la involución del conducto de Müller en el macho, la formación de válvulas y septos cardíacos y la fusión del paladar, entre otros (Trelstad et al., 1982; Shuler et al., 1991; Duband et al., 1995; Hay, 1995; Markwald et al., 1995; Viebahn, 1995; Montenegro y Rojas, 2002). Este proceso está acompañado de cambios moleculares en las células epiteliales y en la composición de la matriz extracelular (Moscona and Monroy, 1984; Greene, 1989; Pelton et al., 1990; Fitzpatrick et al., 1990; Geris et al., 1991; Shuler et al., 1992).

Un epitelio corresponde a una capa de células íntimamente unidas con una polaridad apical-basal. Las superficies epiteliales laterales de células adyacentes están unidas por medios de unión específicos y contienen moléculas de adhesión propias de los epitelios. Por otra parte, una típica célula mesenquimática tiene usualmente una forma alargada con prolongaciones y produce componentes de matriz extracelular, éstas células interactúan con la matriz extracelular (MEC) a través de receptores distribuidos en toda la superficie celular y no forman uniones.

Durante la morfogénesis se producen cambios celulares dramáticos de un estado de diferenciación a otro y algunos epitelios se transforman en mesénquima junto con su habilidad de migrar y formar tejido conectivo inducido por la matriz extracelular o por factores de crecimiento.

En el paladar embrionario, ésta conversión fenotípica involucra:

- c. Una reorganización del citoesqueleto como: aparición de vimentina y pérdida de citoqueratinas.
- d. Cambios en la interacción celular: pérdida en las uniones celulares y cambios en las moléculas de adhesión. Algunos compuestos de la placa desmosomal como caderina-E se pierden o experimentan redistribución.
- e. Cambios en la matriz extracelular como pérdida de la lámina basal. Laminina y colágeno tipo IV son reemplazados por fibronectina y colágeno tipo I.

Las principales moléculas de adhesión son: caderina-E, una glicoproteína integral de membrana (Takeichi, 1995) y el sindecán-1, un proteoglicano de heparán-sulfato (Bernfield and Sanderson, 1990). Las principales uniones son la zónula ocluyente, la zónula adherente y la mácula adherente o desmosoma.

La caderina-E está distribuida como un complejo de cateninas A y B, sobre superficies epiteliales laterales interactuando sobre células adyacentes (Cowin and Burke, 1996), aunque también se identifica sobre la superficie basal, pero a este nivel su función aun se desconoce. Se ha demostrado que la molécula de caderina-E es modificada en la LEM previo al cambio en la morfología celular coincidiendo con el momento en que se produce la adhesión del paladar.

Investigaciones recientes han comprobado que durante la fusión palatina no sólo ocurre la pérdida de moléculas de caderina-E, sino de todos los componentes de uniones adherentes, incluyendo desmosomas. La pérdida temprana de los componentes del complejo caderina-catenina, puede representar un evento crítico en la transdiferenciación epitelio-mesénquima de la LEM (Schmid and Shuler, 2002).

Los efectos del TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), están mediados a través de receptores específicos de las superficies celulares y éstos pueden ser autocrinos y paracrinos. El rango de actividad inducido por estos TGF- $\beta$ s sugiere que ellos podrían jugar su papel en la desaparición de la LEM en la línea media del paladar (Shuler, 1995) algo que ha podido ser demostrado en ratones donde el TGF- $\beta$ 3 induce a la transformación epitelio-mesénquima (Shuler, 1995).

El entendimiento completo de los distintos mecanismos subyacentes a los diferentes destinos de la lámina epitelial media (LEM) puede ser crítico en la comprensión del modo de acción de teratógenos cráneo-faciales y de la etiología de los defectos presentes al nacimiento.

La interrupción de la secuencia de eventos de desarrollo de tejidos y células que ocurren durante la palatogénesis puede resultar en un defecto de fisura palatina (Ferguson, 1991; Shuler et al., 1991).

## ANTECEDENTES.

El desarrollo del paladar es un evento complejo y que frecuentemente se altera produciendo fisura palatina y constituye un buen modelo experimental para estudiar las interacciones tisulares que se producen durante la palatogénesis. Esto se debe a que aparece relativamente tarde en la embriogénesis y los procesos palatinos se pueden disecar fácilmente y cultivar *in vitro* bajo condiciones controladas, donde se fusionan normalmente.

La transformación epitelio-mesénquima es un mecanismo clave para la confluencia y fusión del paladar en el ratón. Durante este proceso, el borde epitelial medio forma una lámina que subsecuentemente se transforma en células mesenquimales (Sun et al., 1998), lo que pudo ser demostrado mediante microscopía electrónica (Fitchett and Hay, 1989) y confirmada por estudios de lineajes celulares (Hay, 1995) realizados inicialmente en embriones de ratón de 14 y 15 días de desarrollo.

El colorante vital DIL ha sido usado para determinar el lineaje celular de otros tipos celulares en los que se produce la transformación epitelio-mesénquima, como en las células de la cresta neural (Serbedzija et al., 1989, 1990, 1992). Esta experiencia ha servido de base para estudiar el proceso de fusión palatina *in vitro* e *in vivo*; y así caracterizar el destino de la LEM usando estudios de lineajes celulares combinados con inmunohistoquímica y examen ultraestructural para caracterizar la morfología de la LEM en diferentes estadios del proceso de fusión palatina. Estos estudios han determinado que en la LEM hay células que permanecen en la línea media y luego adoptan un fenotipo mesenquimal (Shuler et al., 1991, 1992; Griffith and Hay, 1992). La naturaleza lipofílica del colorante (DIL), permite su incorporación en la membrana plasmática de las células que están en contacto con DIL y no pasa a otras células.

El examen ultraestructural también identifica cambios específicos en la morfología celular consistente con la transformación de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal, las células protruyen a través de la membrana basal y entran en contacto con la matriz extracelular mesenquimal, pierden sus uniones celulares específicas y adoptan morfología fibroblástica (Fitchett and Hay, 1989; Shuler et al., 1991; Griffith and Hay, 1992).

Durante el desarrollo cráneo-facial normal y defectuoso, el nivel de expresión de la molécula de adhesión celular caderina-E, se incrementa con la edad y diferenciación (Luning et al., 1994).

Estudios realizados en el ratón con sindecán-1 y caderina-E (que son moléculas que promueven el fenotipo epitelial), muestran expresión en la LEM en su superficie basolateral el día 14, pero la expresión se pierde de forma abrupta y simultánea cuando ocurre la transformación epitelio-mesénquima demostrando de esta manera que este mecanismo es clave para la fusión y confluencia del paladar en el ratón (Sun et al., 1998).

Otros estudios inmunohistoquímicos que analizan el patrón de distribución de algunas proteínas de filamentos intermedios como queratina y vimentina y la molécula de adhesión caderina-E en distintos estados de desarrollo del paladar secundario en dos cepas con diferente susceptibilidad a los glucocorticoides, demostró que la inmunotinción con antipancitoqueratina (AE1) era más intensa en la LEM de la cepa susceptible a la fisura palatina (Montenegro et al., 2000).

Los experimentos de separación y recombinación de capas celulares *in vitro* han demostrado que el epitelio palatino medio juega un rol pasivo en este proceso recibiendo las instrucciones desde el mesénquima subyacente (Pourtois, 1972). La señal de esta interacción es compleja e involucra tanto a las moléculas de la MEC como a factores de crecimiento.

Varios epitelios se transforman en mesénquima *in vitro* cuando se suspenden en colágeno tipo I, por otra parte caderina-E induce a los fibroblastos para formar desmosomas y un epitelio estratificado (Vanderburg, 1995).



## **JUSTIFICACION.**

En este estudio se pretende establecer las características de la transformación epitelio- mesénquima durante el proceso de fusión palatina, que permita conocer la expresión de marcadores propios del epitelio y del mesénquima y su modificación durante este proceso dinámico, en embriones humanos y compararlos con lo observado en embriones de ratón.

## **HIPOTESIS.**

Durante la desaparición de las células del epitelio palatino medio que reviste los procesos palatinos del embrión humano, se produce un cambio en la expresión de algunas moléculas que se han demostrado determinantes de este proceso en embriones de ratón: citoqueratinas, vimentina, actina muscular y caderina-E.

## **OBJETIVOS.**

### **GENERAL.**

Estudiar las características de los filamentos intermedios, de actina muscular alfa y de una molécula de adhesión celular de las células epiteliales del paladar embrionario humano, durante la fusión de los procesos palatinos.

### **ESPECÍFICOS:**

1. Identificar los filamentos intermedios de citoqueratina y vimentina en las células del epitelio palatino medio en las distintas etapas del proceso de palatogénesis del embrión humano: cuando los procesos palatinos están verticales, cuando están horizontales pero sin fusionar y durante la formación y desaparición de la lámina epitelial media.
2. Identificar caderina-E (una molécula de adhesión) y actina muscular alfa en las células del epitelio palatino medio en las distintas etapas del proceso de palatogénesis del embrión humano: cuando los procesos palatinos están verticales, cuando están horizontales pero sin fusionar y durante la formación y desaparición de la lámina epitelial media.
3. Relacionar estas observaciones con las obtenidas en embriones de ratón en las etapas correspondientes.

## MARCO TEÓRICO.

El proceso de palatogénesis es una de las etapas del desarrollo embrionario donde la transformación epitelio-mesenquimática (TEM) ha sido muy bien analizada (Fitchett and Hay, 1989; Shuler et al., 1991, 1992; Carette and Ferguson, 1992; Griffith and Hay, 1992; Shuler, 1995; Kaartinen et al., 1997; Sun et al., 1998).

El proceso de formación de la lámina epitelial es un fenómeno interesante del desarrollo:

1. Las células epiteliales del borde medial, las que fueron originalmente superficiales, desarrollan moléculas de adhesión celular y son las células principales de la lámina epitelial.
2. Las adherencias de las células epiteliales de la lámina medial son específicas, el epitelio de la lámina epitelial normalmente no se puede fusionar con otros epitelios como por ejemplo el piso de la boca o de la lengua (Ferguson et al., 1984).

Recientemente se ha demostrado en el ratón, que células epiteliales de la lámina medial forman rápidamente desmosomas y acumulan desmoplaquina (una de las proteínas de la placa desmosomal) en sus membranas celulares superficiales, justo antes que éstas se pongan en contacto. Esto sugiere que los componentes desmosomales se organizan rápidamente, especialmente en las células de la lámina epitelial media y éste puede ser uno de los mecanismos que confiere especificidad a la adherencia de las células epiteliales de la lámina medial. Además, se ha favorecido un mejor estudio de este fenómeno con el empleo de anticuerpos monoclonales que reconocen las moléculas de superficie de las células epiteliales del paladar (Dixon et al., 1993; Ferguson, 1988). Estas moléculas varían en distribución en cada región del paladar, en las diferentes capas del epitelio y de acuerdo al momento del desarrollo (Ferguson, 1988).

Durante el desarrollo de la región orofacial humana, este proceso de palatogénesis consta de varias etapas de acuerdo a la posición de los procesos palatinos en la cavidad oral.

<b>EDAD</b>		<b>LONGITUD</b>	<b>PRINCIPALES CARACTERISTICAS</b>
Semanas – Días		Coronilla-nalga (mm)	
6	36-42	9-15	Paladar primitivo y procesos palatinos crecen verticales a ambos lados de la lengua
7	43-49	15-20	Procesos palatinos horizontales, sin fusionar mediante rotación y reorientación a una posición horizontal sobre la lengua
8	50-56	20-30	Procesos palatinos fusionados pero con lámina epitelial. Los epitelios contactan y se adhieren. Algunas células del periderma experimentan muerte celular programada y son eliminadas antes de la adhesión.

A medida que la cabeza crece, principalmente en altura, la lámina epitelial media se adelgaza a una capa de células, se rompe en pequeños islotes y luego desaparece, permitiendo la continuidad del tejido mesenquimático en ambos procesos. (Montenegro y Rojas, 2002).

Un número importante de células, (alrededor del 50%) parecen migrar dentro del mesénquima del paladar, arrastrando desde un inicio fragmentos de sus membranas basales rotas (Fyfe and Ferguson, 1988). Estos fragmentos desaparecen después de unas pocas horas; las células pierden su tinción para citoqueratina y expresan tinción para los filamentos intermedios de vimentina, volviéndose rápidamente indistinguible de otras células del mesénquima del paladar.

En la literatura, por casi 30 años, se ha considerado que el destino de la lámina epitelial media era la muerte celular programada o apoptosis, sin embargo como ya se mencionó anteriormente las células pueden permanecer viables y migrar al epitelio oral y nasal o transformarse a un fenotipo mesenquimal (Shuler, 1995).

En conclusión, los experimentos de recombinación epitelio-mesénquima han demostrado que la diferenciación epitelial nasal, medial, y oral del paladar es específica para el mesénquima y que la señalización de la diferenciación de la lámina epitelial medial, ocurre en los diferentes vertebrados en una forma especie-específica.

En teoría, hay 4 rutas principales en las cuales el mesénquima podría inducir la diferenciación epitelial:

1. Moléculas de la matriz extracelular;
2. Factores solubles;
3. Contacto directo célula-célula y
4. Una combinación de los anteriores.

En la diferenciación epitelial palatina, participan mecanismos complejos y se producen interacción dinámica entre factores de crecimiento soluble y la matriz extracelular. En este modelo, se cree que el mesénquima produce factores de crecimiento que podrían actuar directamente en el epitelio para inducir un fenotipo (Gehris et al., 1991) o por estimulación autocrina de producción de matriz extracelular por células del mesénquima y éstas moléculas de la matriz extracelular pudieran influenciar directamente la diferenciación epitelial. Adicionalmente la matriz extracelular puede modular la respuesta del epitelio a factores de crecimiento o viceversa. El sistema puede autoregularse vía una respuesta bifásica del epitelio y el mesénquima al mismo factor de crecimiento, por ejemplo, el factor puede afectar directamente al epitelio y al mesénquima, las moléculas de la matriz extracelular producidas por el mesénquima pueden entonces modular los efectos directos del factor sobre el epitelio.

Las células del mesénquima del paladar son heteróneas, no sólo en términos de producción de moléculas de la matriz extracelular y de respuesta a factores solubles, sino también la producción de factores de crecimiento (Heine et al., 1987; Ferguson, 1988).

Los filamentos intermedios son una gran familia de proteínas fibrosas que incluyen citoqueratinas, las cuales son características de los epitelios (Moll et al., 1982) y

vimentina las cuales son típicas de células de origen mesenquimal (Steinert and Roop, 1988).

Las citoqueratinas son los principales filamentos intermedios de todas las células epiteliales y comprenden dos grandes grupos de polipéptidos: ácidas y básicas. Cualquier epitelio usualmente expresa más de una citoqueratina y la complejidad del perfil de citoqueratinas se correlaciona positivamente con la complejidad del epitelio (Dixon et al., 1993). La vimentina es el filamento intermedio principal, en una variedad de tipos celulares mesenquimales y de otras células derivadas del mesénquima.

En el paladar embrionario del ratón, estas moléculas han sido inmunolocalizadas en diferentes estadios del proceso de palatogénesis (Carette et al., 1991; Gibbins et al., 1999). La queratina está presente en el borde epitelial medial precontacto y en otras áreas del epitelio del paladar y persiste en la lámina epitelial medial. Las células del borde epitelial medial expresan citoqueratinas 5 y 14 antes de la fusión y en el epitelio nasal en la base del vomer, el cual se fusiona con el paladar para formar el septo nasal, pero no expresa citoqueratinas 8, 18, y 19.

Las células de la lámina epitelial medial se tiñen con queratina y laminina, pero no se tiñen con vimentina. La vimentina está presente solamente en el mesénquima.

Cuando la lámina epitelial se rompe en pequeños islotes, éstas células no se tiñen con queratinas pero se tiñen con vimentina. También hay tinción para vimentina en el epitelio del paladar que podría después fusionarse con el septo nasal.

Los filamentos intermedios especialmente las citoqueratinas, son marcadores de diferenciación de los tejidos embrionarios y se ha sugerido que en aquellos órganos que comienzan a funcionar tempranamente en el embrión, como el mesonefros y la red vascular, el citoesqueleto se organiza más tempranamente (Rodríguez et al., 2000).

La expresión variada de estas proteínas multigénicas del citoesqueleto está ligada a programas de diferenciación celular específicos, por ello el estudio de las citoqueratinas tiene singular importancia en el conocimiento de nuevos aspectos de la Biología del

Desarrollo, además mediante técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica es útil en la correcta identificación y caracterización de células normales.

El epitelio oral no queratinizado adulto, que reviste la mucosa alveolar, el surco gingival, la superficie interna de labios y mejillas, el piso de la boca, la superficie ventral y lateral de la lengua, el paladar blando y la mucosa interpapilar, expresa polipéptidos diferentes del epitelio queratinizado, donde faltan las citoqueratinas de alto peso molecular (Clausen et al., 1986). En estos epitelios como en el esófago, todas las células suprabasales contienen citoqueratinas 4 y 13 y la capa basal contiene queratina 5 y 14, que son específicas de la estratificación (Sawaft et al., 1991).

Se ha demostrado que durante el desarrollo fetal, se expresan progresivamente las mismas queratinas que están presentes en los tejidos del adulto, por ello, no existen queratinas que sean únicamente de tipo fetal. Durante el desarrollo fetal, algunos epitelios presentan el patrón característico de queratinas propios de epitelio estratificado y seudoestratificado.

La queratina 19 se encuentra en numerosas variedades de tejidos epiteliales. Esta proteína aparece como un componente minoritario de diferentes epitelios estratificados y en cultivos de queratinocitos y se expresa en las células basales del epitelio estratificado escamoso no queratinizado, incluyendo la mucosa oral normal (Rodríguez et al., 2000)

La integridad epitelial está garantizada por moléculas de adhesión celular (MACs) entre las que se destaca la familia de las caderinas que son moléculas monoméricas, que contienen receptores homofílicos que se unen a caderinas idénticas expresadas en células homo o heterotípicas para establecer contactos célula-célula. Estas, junto con componentes de la placa desmosomal, desmoplaquinas, desmogleína y placoglobina experimentan redistribución o se pierden durante la transformación epitelio-mesénquima.



Inmunodetección de Cadherina -E

De acuerdo con estudios previos, caderina-E tiñe preferencialmente las capas celulares intermedias del epitelio estratificado más maduro, tales como el epitelio de la lengua y el epitelio oral (Panaretto, 1993). Además, se cree que la molécula caderina-E participa en la inducción del mesénquima subyacente durante el desarrollo embrionario. Tales funciones en el desarrollo oral, pueden ser sustentadas también por las observadas durante la odontogénesis (Choung and Edelman, 1985, a y b).

Caderina-E puede estar comprometida tanto en la adhesión y fusión del epitelio en los extremos de los procesos palatinos, como en la desintegración de las conexiones epiteliales que se forman como resultado de esta fusión. Una función en la adhesión y fusión palatina es sustentado por la observación de que la expresión de caderina-E se incrementa en el epitelio de los extremos de los procesos palatinos al momento de la fusión. La intensidad de la tinción para caderina-E se incrementa con la edad y con la diferenciación de las estructuras epiteliales orales.

El sindecán-1, proteoglicano de heparán-sulfato, es un receptor de la membrana celular que tiene una distribución similar a caderina-E (Bernfield et al., 1992) y es una de las principales moléculas de adhesión célula-célula (Takeichi, 1995). Está distribuida en las superficies epiteliales laterales donde interactúa con las caderinas-E de células adyacentes (Cowin and Burke, 1996).



En el paladar embrionario del ratón, caderina-E y sindecán-1 desaparecen simultáneamente durante la pérdida del fenotipo epitelial *in vivo* (Sun et al., 1998).

Varios epitelios se transforman en mesénquima *in vitro* cuando se cultivan en colágeno tipo I, por otra parte, caderina-E induce a fibroblastos a formar desmosomas y un epitelio estratificado *in vitro* (Vanderburg and Hay, 1995).

Se ha demostrado en el ratón, expresión de actina muscular alfa en las células epiteliales del paladar que se está fusionando en el preciso momento de la ruptura de la lámina epitelial (Kaartinen et al., 1995). La lámina epitelial expresa queratinas 8, 5 y 6 al mismo tiempo que la actina muscular (Gibbins et al., 1999). Los autores postulan que la expresión de actina muscular alfa en las células del epitelio palatino medio en esta etapa, estaría relacionada con la generación de una fuerza tensil contráctil sostenida dentro de este epitelio y por lo tanto podría ser un componente del proceso de transformación epitelio-mesenquimática en las células de la lámina epitelial media (Gibbins et al., 2000).

### **INMUNODETECCION DE ACTINA MUSCULAR ALFA**



Esto estaría corroborado por el hecho que en las células endoteliales que se transforman en mesenquimáticas para formar las válvulas y septos cardíacos también se expresa actina muscular alfa inducida por el TGF $\beta$ -3 (Nakajima et al., 1997).

## **MATERIAL Y MÉTODO.**

En este estudio se utilizaron embriones humanos comprendidos en las edades de 6 y 8 ½ semanas de gestación, que corresponde a tres etapas del proceso de palatogénesis: procesos palatinos verticales, procesos palatinos horizontales sin fusionar y procesos palatinos fusionados pero con lámina epitelial media, estableciéndose la edad de acuerdo a los parámetros de Arey (1965) y Rosai (1996), tomando como referencia la longitud coronilla-nalga y nalga-talón y las características embrionarias.

Se utilizaron 3 embriones de 6 semanas de gestación, 3 embriones de 7 semanas, 5 embriones de 8 semanas y 4 embriones de 8 ½ semanas.

Los embriones se fijaron en formol al 10% y se procesaron por el método histológico corriente: deshidratación en alcoholes a concentraciones crecientes, impregnación e inclusión en parafina (a una temperatura no mayor de 60°).

Se realizaron cortes coronales seriados de 5µm que se tiñeron con técnicas histológicas corrientes, H-E-azul Alcian y con la técnica inmunohistoquímica de inmunoperoxidasa utilizando los siguientes anticuerpos primarios en las diluciones siguientes:

- antipanqueratina AE1: anticuerpo monoclonal específico para identificar queratinas (K) 10 – 14 - 16 y 19 (Biomed Corp., Foster City, CA, producto N° C 7765). Dilución 1:200.
- Antivimentina (Dakopatts, Glostrup, Dinamarca, Producto N° M 0725). Dilución 1:100.
- Anticadherina-E (Sigma producto N° C 1821). Dilución 1:400.
- Antiactina muscular alfa (Biomed Corp., Foster City, CA, producto N° K 002). Dilución 1:200.

Cada uno de los anticuerpos se utilizó en cinco cortes de cada edad gestacional. El estudio inmunohistoquímico fue el de Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) y se procedió de la siguiente manera:

1. Desparafinado de muestras en xilol, seguido de hidratación en alcoholes descendentes.
2. Inhibición de la peroxidasa endógena del tejido con  $H_2O_2$  al 3%
3. Digestión enzimática
4. Bloqueo con suero de Bovino no inmune, diluido 1: 20.
5. Incubación con anticuerpo primario en cámara húmeda.
6. Incubación con el anticuerpo secundario (antisuero biotinilado) diluido 1:400.
7. Incubación con estreptavidina-peroxidasa diluido 1: 800.
8. Revelado con Diaminobenzidina (DAB)
9. Tinción nuclear con Hematoxilina de Harris.
10. Deshidratación, aclaramiento con xilol y montaje con entellán (Merck).

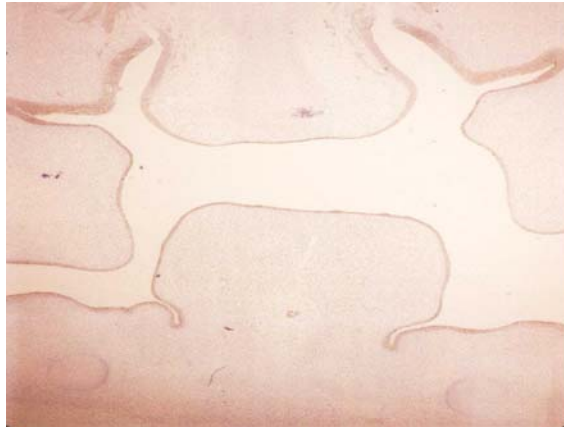
Para el lavado se utilizó buffer fosfato (PBS) a pH 7.2.

Para asegurar la especificidad de la reacción inmune, se realizaron controles positivos y negativos. Para el control positivo se utilizaron cortes de mucosa gingival y piel embrionaria que se conoce dan reacción positiva con los anticuerpos primarios usados. Para el control negativo se utilizaron cortes adyacentes a los tratados con el anticuerpo primario y se sometieron a la misma técnica, con la excepción que el anticuerpo primario se reemplazó con suero de ratón no inmune y en estos casos no se observó reacción positiva.

Los embriones incluidos en este estudio eran producto de salpingectomía por embarazo tubárico roto, esto con el propósito de que el tejido estuviera lo más integro posible para poder evaluar la etapa de la palatogénesis en que se encontraba .

## RESULTADOS

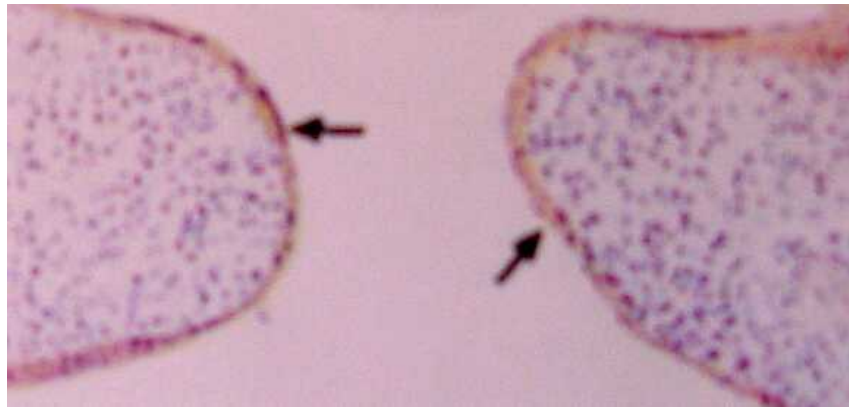
El examen microscópico de los cortes mostró que en embriones de 6 semanas de gestación, los procesos palatinos están creciendo verticalmente a ambos lados de la lengua (Figs. 1). Estos procesos palatinos están constituidos por una parte central de tejido mesenquimático revestida de un epitelio formado por una capa basal de células cuboideas y una capa superficial de células aplanadas. En esta etapa del desarrollo, el anticuerpo antiqueratina AE1 muestra una débil inmunotinción en el epitelio medio de los procesos palatinos .



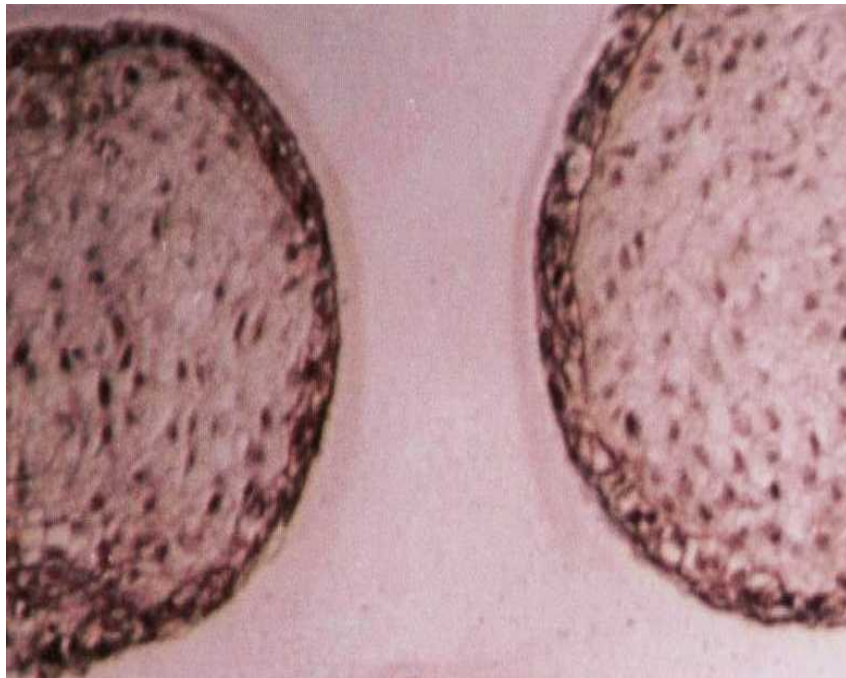
Con el anticuerpo antiactina muscular alfa, la inmunotinción es negativa en este epitelio. Caderina-E muestra reacción positiva en casi todo el epitelio oronasal incluyendo el epitelio palatino medio .En embriones de 7 semanas, los procesos palatinos han rotado a una posición horizontal sobre la lengua y se aproximan uno al otro.



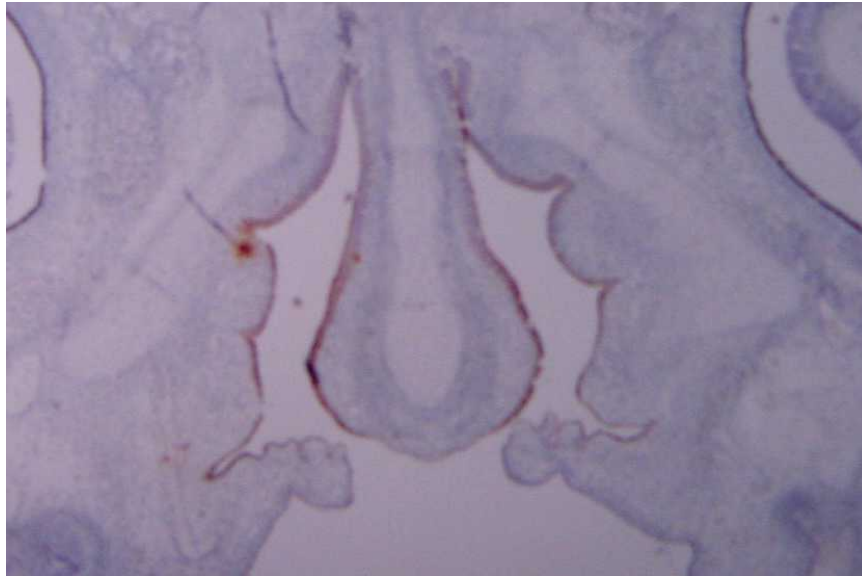
Los procesos palatinos muestran inmunotinción positiva en el epitelio palatino medio con los anticuerpos antiqueratina AE1. (Embrión de 7 semanas)



Procesos palatinos mostrando Inmunotincion positiva para Anti-Cadherina-E (Embrión de 7 semanas)

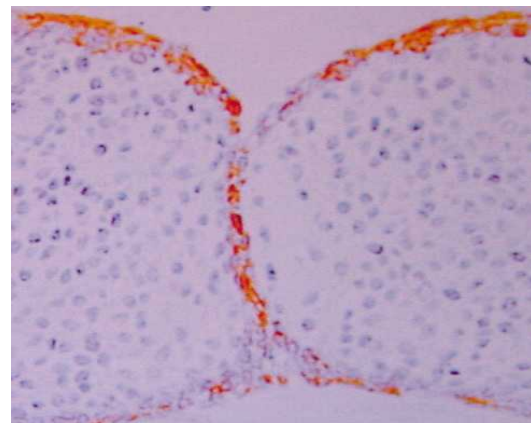
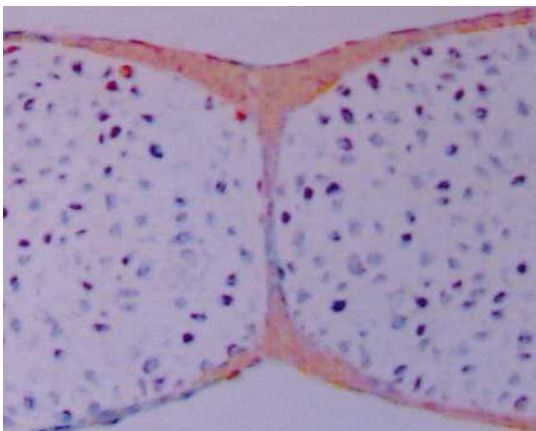


**Inmunotinción es negativa con el anticuerpo antiactina muscular alfa (Embrión de 7 semanas)**



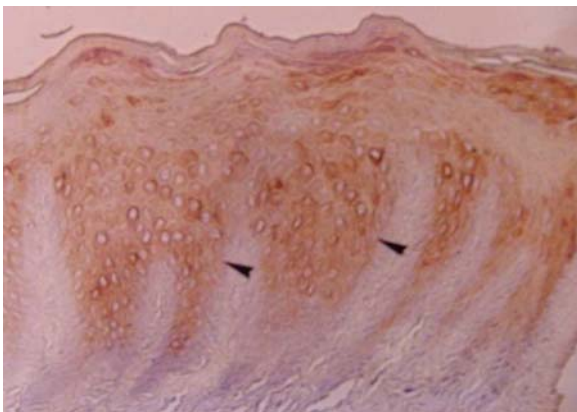
En embriones de 8 semanas, los epitelios medios de los procesos palatinos han adherido y se ha formado una lámina epitelial media, que está formada por dos capas celulares de grosor, pero con el crecimiento del paladar esta lámina se adelgaza a una capa celular

El anticuerpo antiqueratina AE1 se expresa intensamente a lo largo de la lámina epitelial media. En algunos embriones de 8 semanas, la lámina epitelial está desapareciendo en la parte media y sólo se observa inmunotinción positiva con antiqueratina AE1 en los extremos triangulares de la lámina epitelial media que limita con los epitelios oral y nasal

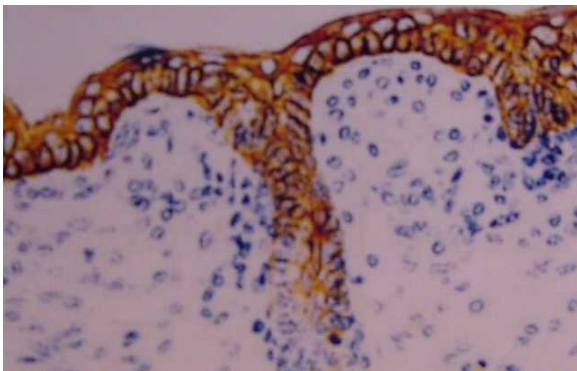


La lámina epitelial media mostró inmunotinción negativa con el anticuerpo antiactina muscular alfa. En todos los cortes tratados con este anticuerpo en los cuales la inmunotinción fue negativa en los tejidos palatinos, se observó intensa reacción en las paredes musculares lisas de las arteriolas y de otros vasos sanguíneos .

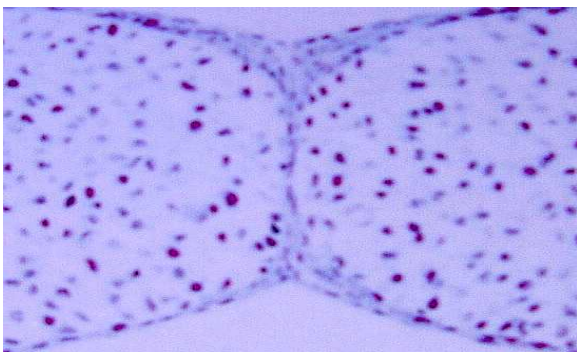
El epitelio gingival y el epitelio de la piel fetal, mostraron inmunotinción positiva intensa con el anticuerpo antiqueratina AE1 y cn el anticuerpo anticaderina-E (Figs. y). En cambio, no se observó reacción positiva en los controles negativos con los distintos anticuerpos usados .



Immunotinción positiva antiqueratina AE-1  
Epitelio gingival



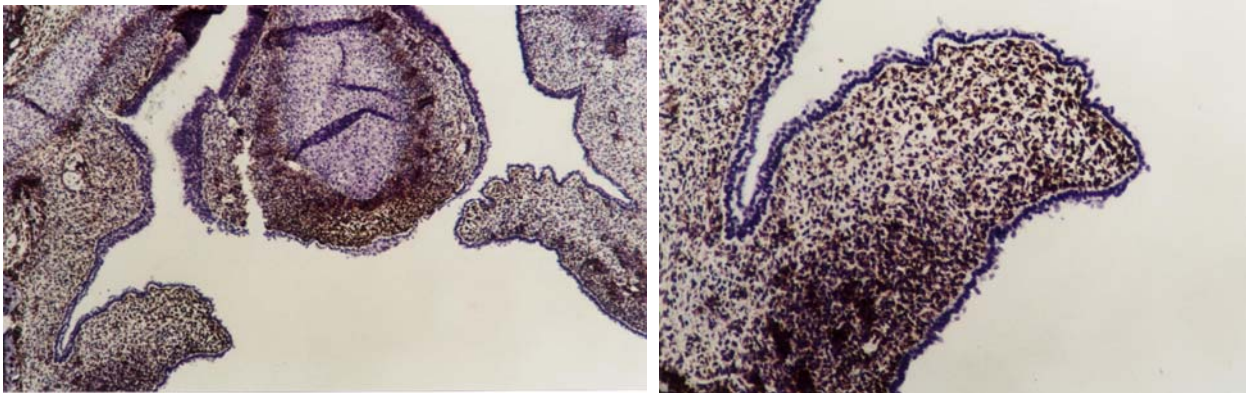
Immunotinción positiva con anticadherina E  
en piel fetal



Control negativo.  
Embrión de 8 semanas.

Los embriones más tardíos obtenidos en este estudio, 8<sup>1/2</sup> semanas, muestran el paladar fusionado, la lámina epitelial ha desaparecido y se ha producido la confluencia del tejido mesenquimático.

En todas las etapas estudiadas, con el anticuerpo antivimentina, se observó inmunotinción positiva en las células mesenquimáticas de los procesos palatinos



Immunotinción con anticuerpo  
antivimentina.  
(Embrión de 7 semanas)



## DISCUSIÓN:

El análisis de nuestros resultados muestra una distribución característica de citoqueratinas y vimentina, dos proteínas de filamentos intermedios, de caderina-E, una molécula de adhesión y de actina muscular alfa, en los procesos palatinos, durante distintas etapas del desarrollo del paladar en el embrión humano.

En embriones de 6 semanas de gestación, cuando los procesos palatinos están en posición vertical a ambos lados de la lengua, se observa débil inmunotinción positiva con el anticuerpo antiqueratina AE1 (KAE1) en el epitelio palatino medio. Esta inmunotinción se hace más intensa en embriones de 7 semanas de gestación, cuando los procesos palatinos se han horizontalizado y fuertemente positiva en la lámina epitelial media. En los embriones más tardíos, la inmunotinción con este anticuerpo KAE1 se reduce a los islotes epiteliales que son restos de la lámina epitelial, para luego desaparecer junto con ellos.

La distribución de KAE1 observada en el embrión humano, es similar a la descrita en ratones de la cepa A/Snell, susceptible a la fisura palatina (Montenegro et al., 2000 y 2001). Además, los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo con el patrón de expresión de citoqueratinas descrito por Carette et al., 1991, en embriones de ratón de la cepa susceptible MF1 en diferentes etapas del desarrollo del paladar *in vitro*. Estos autores observaron expresión de K1, K5 y K14 en el epitelio palatino medio, que son característicos de un epitelio estratificado, pero las citoqueratinas 18 y 19 estaban ausentes de este epitelio palatino embrionario.

El anticuerpo monoclonal KAE1 utilizado en este estudio, reconoce las queratinas de la subfamilia ácida K10, K14, K16 y K19. El perfil de citoqueratinas de un epitelio, está relacionado con su estado de diferenciación y desarrollo (Ouellet et al., 1986). En el ratón, la fusión del paladar secundario depende de una compleja secuencia de eventos que incluyen la diferenciación del epitelio palatino medio que lo lleva a su desaparición.

Con el anticuerpo anticaderina-E, la inmunotinción positiva fue muy débil en el epitelio palatino medio cuando los procesos palatinos están verticales. Esta inmunoexpresión es más intensa en el epitelio medio de los procesos palatinos horizontales y fuertemente positiva en la lámina epitelial. También se ha demostrado expresión de caderina-E en el epitelio oral de embriones de ratón de distintas edades y esta expresión desaparece en el epitelio palatino medio cuando sus células se transforman en células mesenquimáticas (Sun et al., 1998; Montenegro et al., 2000).

Caderina-E se distribuye como un complejo con  $\alpha$  y  $\beta$  catenina en las superficies laterales epiteliales, donde interactúan con los complejos de caderina-E de células adyacentes (Cowin y Burke, 1996). En los embriones humanos de este estudio, la expresión de caderina-E desapareció junto con la lámina epitelial similar a lo descrito en embriones de ratón.

En los embriones de ratón, se ha demostrado que el principal mecanismo de dispersión de la lámina epitelial, es su transformación a células mesenquimáticas (Ferguson, 1988; Shuler et al., 1991; 1992; Hay 1995; Shuler, 1995; Montenegro et al., 2001). La pérdida de la molécula de adhesión caderina-E observada en el ratón, se ha interpretado como una señal de que la célula está perdiendo su fenotipo epitelial para transformarse en una célula mesenquimática (Sun et al., 1998). Por otro lado, las fibrillas de queratina asociadas a los desmosomas, persisten hasta que la lámina epitelial es reemplazada por un tejido conectivo con células ricas en vimentina y sin desmosomas (Fitchett y hay, 1989).

En los embriones humanos, la expresión de vimentina se detecta débilmente en las células mesenquimáticas de los procesos palatinos en todas las etapas estudiadas y esta reacción es intensa en el endotelio de los vasos sanguíneos.

De la misma manera que lo observado en el ratón, en los embriones humanos se observa fuerte expresión de KAE1 y caderina-E en las células epiteliales de los extremos triangulares de la lámina epitelial media. Esto podría estar relacionado con la incorporación de estas células a los epitelios oral y nasal superficial de manera similar a lo descrito en ratón como otro mecanismo por el cual se produce la desaparición de la lámina epitelial (Ferguson, 1988; 1994).

Nuestros resultados indican que actina muscular alfa está ausente del epitelio palatino embrionario, sin embargo se expresa intensamente en las paredes de los vasos sanguíneos. Estos resultados son diferentes a los observados por Gibbins et al., 1999 en el paladar embrionario de ratón donde se observó expresión de actina muscular alfa especialmente en los momentos en que se produce la ruptura de la lámina epitelial (Kartinen et al., 1995). Estos autores lo relacionaron con la generación de una fuerza tensil contráctil que ayudaría a la desaparición del epitelio, especialmente a la transformación del fenotipo epitelial a uno mesenquimático (Gibbins et al., 2000). La falta de expresión de actina muscular alfa en el epitelio palatino del embrión humano podría estar relacionado con una mayor susceptibilidad a la fisura palatina.

Los patrones similares de expresión de algunas moléculas que están involucradas en el desarrollo del paladar observados en el embrión humano, estarían indicando que en general, existirían mecanismos celulares semejantes a los descritos en la fusión palatina de embriones de ratón.

## CONCLUSIONES.

5. La inmunotinción con anticuerpo antipancitoqueratina AE1 fue positiva en todas las etapas del proceso de palatogénesis estudiadas, a nivel del borde epitelial medial de los procesos palatinos y la tinción es más intensa a mayor edad del embrión, resultados similares se observaron con el anticuerpo anticadherina –E.
6. La identificación de la isoforma alfa de actina de músculo liso fue negativa en el epitelio del borde medial en las diferentes etapas expresándose únicamente en las células musculares lisas del mesénquima de los procesos palatinos .
7. Las características de inmunotinción con marcadores epiteliales ( antipanticoqueratina AE1 y anticadherina – E ) en embriones humanos se corresponde a las observadas en etapas similares de la palatogénesis en ratón .
8. La falta de expresión de antiactina alfa de músculo liso en epitelio de los procesos palatinos , difiere de las observaciones en ratón por la contracción de las células epiteliales no parece ser un evento importante que anteceda la eventual migración epitelial hacia los triángulos epiteliales o bien el proceso de transformación epitelio mesénquima durante la fusión del paladar.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Arey L. B; Development Anatomy. Ed.7, Philadelphia, W.B. Saunders. Co. P. 104. (1965).
2. Bernfield. M. And Sanderson R.D. Syndecan a morphogenetically regulated cell surface proteoglycan that binds extracellylar matrix and growth factors. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol) 327: 171-186. (1990.)
3. Bulleit . R.F; and Zimmerman. E.F. The influence of the epithelium on palate shelf reorientation J. Embryol. Exp. Morphol 88: 265- 279. (1985)
4. Carette. N. J., Lane E.B. ; Ferguson MhJ: Differentiation of mouse embryonic palatal epithelium in culture selective cytokeratin expression distingues between oral, medial edge and nasal epithelial cells. Differentiation 47: 149- 161. 1991.
5. Carette MJM., Ferguson MWJ. The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro: an analysis by Dil labeling and confocal microscopy. Development 114: 379-388. (1992)
6. Clausen H. Mor D; Busechard. K. & Dabelsteen E. Cytokeratin proteins in human oral mucosa. J. Oral. Pathol 15: 36-42, (1986.)
7. Coleman. R.D. Development of the rat palate Anat. Rec. 151: 107-118. (1965).
8. Cowin; P & Burke B, Cytosqueletal- membrane interaction S. Cum. Opin. Cell. Biol: 8: 56-65 (1996).
9. Chung C.M., Edelma, G.M : Expression of cell adhesion molecules in embryonic induction I. Morphogenesis of features. J. Cell. Biol. 101: 1009-1026. (1985) (a).
10. Chung C.M. Edelma. G.M. Expression of cell adhesion melecules in embryonic induction II. Morphogenesis of adult featers, J. Cell. Biol. 101: 1027-1043 (1985) (b).

11. Dixon M.J. Foreman. D., Schor. S.L. & Ferguson. MWJ. Epidermal growth factor and transforming growth alpha regulate extracellular matrix production by embryonic mouse palatal mesenchymal cell cultured on a variety of substrata. *Development* (in press).(1988)
12. Dixon M.J. Robinson V. White. V. & Ferguson MWJ. Monoclonal antibodies recognising states and region specific epitopes in embryonic mouse palatal epithelial cells. *J. Anat.* 183: 423- 438. 1993.
13. Duband. J. L. Monier, F: Delaner M. & Newgreen D. Epithelial mesenchymal transition during neural crest development. *Acta Anat.*, 154: 63-78. ( 1995).
14. Ferguson M.W.J Palatal shelf elevation in the wister rat fetus *J. Anat.* 125: 555-577.(1978)
15. Ferguson M.W.J. The orofacial region. In: textbook of fetal and perinatal pathology. Wigglesworth JS. Singer D.B editors. Boston Blackwell scientific Pubs., PP. 843-880 (1991)
16. Ferguson M.W.J. & Honing., L.S. Epithelial –mesenchymal interactions during vertebrate palatogenesis. In curret topics in *Development Biology*, Vo. 19. *Palate Development: normal and abnormal, cellular, and .* (1984).
17. Ferguson. M.W.J. *Palate Development.* 103: 41-60. (1988).
18. Fitchett. J.E. & Hay. E.D. medial edge epithelium transforms to mesenchyme afeter embryonic palatal shelves fuse. *Dev. Biol.* 131: 455-474. 1989.
19. Fitzpatrick. D.R. Denhez, F. Kondaiah, P: and Akhursht R. Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development*, 109: 585-595. 1990.
20. Fyfe. D.: Ferguson M.W.J & Chiquet- Ehrismann. R. Tenascin immunolocalitation during palate development in mouse and chiker embryos. *Anat & Embryol* ( in press).1988.
21. Gehris A.; D´Angelo, M.; & greene. R.M. Immunodetection of the transforming grow + factors B1 and B2 in the developing murine palate. *Int. J. Dev. Biol.* 35: 17-24. 1991.

22. Gibbins, JR, Manthey. A; Tasawa,; Scott B,; Bloch- Zupan A & Hunter N: Midline Fusion in the formation of the secondary palate anticipate by preulation of keratin K 5/6 and localized expression of vimentin m RBA in medial edge epithelium. *Int. J. Dev. Biol.* 43: 237- 244. 1999.
23. Greene, R.M. Signal transduction during craniofacial development. *Crit. Rev. Toxicol.* 20, 153-174.
24. Griffith; CM & Hay E.D. Epitelial- mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxiflourescen traces cells at light and electron microscopic levels. *Development.* 116: 1087-1099. 1992.
25. Hay E.D.; an overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* 154: 8: 20. 1995.
26. Heine V.I., Muñoz E.F. Ilander S, K.C; Elling seortht, R, Lam. H.Y.P. Thompson. N.L., Roberts A.B. & Sparn M.B . The role of transforming growth factor- beta in the development of the mouse embryo. *J. Cell. Biol.* 105; 2861-2867. 1987.
27. Hudson C.D. and Shapiro B.L A. Radioautographic study of DNA synthesis in the concepto of programmed cell death. *Arch. Oral. Biol.* 18: 77-84. 1973.
28. Kaartinen V.; X.M; Heisterkamp. N; groffen J. & Shuler C.F. TGF- B3 Regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and asociated degradation of basament membrane. *Dev. Dynamics* 209: 255-260. 1997
29. Luning C. Rass A. Rozel B. Wroblewski J. Obrink . B. Expression of E- Cadherin during craniofacial development. *J. Craniofacial genet. Dev. Biol.* 14: 207-216. 1994.
30. Markwald, R. Bisenberg. C. Eisenberg. L. Trusk, T; & Sugi. Y. Epithelial – mesenchymal transformations in early avian heart development. *Acta Anat.* 156: 173-186. 1995.
31. Moll. R. Franke W.W. ; Shiller D.L.; Geiper. B. And Kiepler R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expresion in somal epithelia, tumor and cultured cells. *Cel:* 31: 11-24 1982.
32. Montenegro M.A.; Rojas. M.A. Epithelial – mesenchymal transformation during embryonic development. *Rev. Chil. Ant.* 18 (3) : 301-310, 2002.

33. Montenegro M. A. Rojas: M, Dominguez S. And Rosales C. J. Differences in extracellular matrix components and cell density during normal and dexamethasone-treated secondary palate development in two strains of mice with different susceptibility to glucocorticoid induced clefting. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 18: 100-106. 1998.
34. Montenegro M.A. Rojas. M. Domigues S. Vergara A. Cytokeratin vimentin and E-Cadherin immunodetection in the embryonic palate two strains of mice with different susceptibility to glucocorticoid- induced cleftin. *J. Craniofac. Dev. Biol.* 20: 137-443. 2000
35. Montenegro M.A. ; Mery, C.C.; & Aguirre A. *Histología y Embriología del sistema estomatognático.* Ediciones Facultad de Odontología. Universidad de Chile. Pag. 20-28. 1997.
36. Morgan PR. ; The fate of the expected fusion zone in ultrastructural study . *Dev. Biol.* 51: 225-250. 1976.
37. Moscona A.A; and Monroy A ( Eds) *Palate development: Normal and abnormal cellular and molecular aspects.* *Cum. Top. Dev. Biol.* Vol. 19.1984.
38. Panaretto B.A. Gene expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) during hair follicle and tooth formation: A review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 345-360. 1993.
39. Pelton R.W.; Hogar . B.L.M. Miller . D.A.; and Moses H.L Differential expression of genes encoding TGF5 B1,B2 and B3 during murine palate formation. *Dev. Biol.* 141: 456-460. 1990.
40. Pourtois M. Onset of the acquired potentiality for fusion in the palatal shelves of rats. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 165: 171-182. 1966.
41. Pourtois M. Morphogenesis of the primary and secondary palate. In “ *Development aspect. Of Oral Biology* “ ( H. C Salvkin and L.A. Bavetta. Eds) Pp. 81-108. Academic Press. New. York. 1972.
42. Pratt. R.M. and martin G.R Epithelial cell death and c. Amp. Increase during palate development. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 874-877. 1975.
43. Pratt and Green R.M. Inhibition of palatal epithelial cell death by altered protein synthesis. *Dev. Biol.* 54: 135-145. 1976.

44. Prat R.M. Kim. C.S; and grove. R.I Role of glucocorticoids and epidermal growth factor in normal and abnormal palate development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 19: 81-102. 1976.
45. Rodriguez A.; Rojas M.A; Montenegro M.A. & Regadera J. Expresion de filamentos intermedios durante el desarrollo embrionario de cerdo ( *Sus scrofa*) y bovina ( *Bostourus*)
46. Rosai J. *Surgical Pathology* 8ª. Ed. Missouri . Mosby P. 2658. 1996.
47. Schimid. D. And Shuler C.F. Characterization of adherens juntion components in the medial edge epithelio during palatogenesis. *Palate Developmentared orofacial Clefting I.*
48. Shapiro B.; and Sweney. L. R. Electron microscopic and histochemical examination of oral epithelial mesenchymal interaction ( programmed cell death ) *J. Dent. Res:* 48: 652- 660. 1969.
49. Sawaf M.H . Ouhayoun. J.P. & Forest, N cytokeratin profiles in oral epithelia a review and a new classfication . *J. Biol. Buccale.* 19: 187-198. 1991.
50. Serbedzija G.N; Broner- Froser M. & Fraser M. Pathways of tronk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital labelling *Development.* 108: 605- 612. 1990.
51. Serbedzija G. N Bioner – Fraser M. Fraser S. E. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development* 116: 297-307. 1992.
52. Shuler C.F. Guo Y.; Majunder A.; and LUO R. Molecular and morphological changer during the epithelial mesenchymal transformation of palatal shelf medial edge epithelium “ in vitro “ *Int. D.J. Dev. Biol.* 35 ( 463-472) 1991.
53. Shuler C.F. Programmed cell death and cell transformation in craniofacial development. *Critical reviews in oral Biology* 6 (3): 202- 217. 1995.
54. Smiley G.R. Fine structure of mouse embryonal palatal epithelium prior to and after nidline fusion. *Arch. Oral Biol.* 15: 287- 296. 1970.
55. Steinert P.M. Roop. D.R. Molecular and cellular biology of intermediate. Filaments. *Ann Rev. Biochen* 57: 593- 625, 1988.



56. Sun D.; Mcalmon. K.R.; Davies J.A. Bernfield. M. & Hay E.D. simultaneous loss of expression of syndecan -1 and E- Cadherin in the embryonic palate during epithelial mesenchymal transformation . *Int. J. Dev. Biol.* 42: 733-736. 1998 b.
57. Trelstad. R.L. Hayashi. K.& Danahue P.K The epithelial mesenchymal interface of the rat mullerian duct loss of basement membrane integrity and ductal regression *Dev. Biol.* 92: 27- 40. 1982.
58. Vanderburg C.R. & Hay E.D. E-Cadherin transforms embryonic corneal fibroblast to stratified epithelium wit desmosomes *Acta ant.* 157: 87-104. 1995.
59. Walter B.E and fraser F.C Closure of the secondary palate in three strains of nice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 4: 176-189.

