



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

·
·

FACULTAD*DE*MEDICINA*

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
ESPECIALIDAD EN:

GENÉTICA MÉDICA

ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *HOXA2* EN
PACIENTES CON ESPECTRO FACIO-AURICULO-
VERTEBRAL (EFAV). CASOS FAMILIARES

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A:

DRA. ENY PAOLA LINARES MENDOZA



PROFESOR TITULAR: Dra. en C. MARGARITA VALDÉS
FLORES

ASESORA: Dra. en C. MARÍA DE LA LUZ ARENAS
SORDO

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DRA. MATILDE L. ENRIQUEZ SANDOVAL
DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DRA. XOCHIQUETZAL HERNANDEZ LÓPEZ
SUBDIRECTORA DE POSTGRADO
Y EDUCACIÓN CONTINUA

DR. ALBERTO UGALDE REYES RETANA
JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA

DRA. en C. MARGARITA VALDÉS FLORES
PROFESOR TITULAR

DRA. en C. MARÍA DE LA LUZ ARENAS SORDO
ASESOR CLÍNICO

DRA. en C. MARÍA DE LA LUZ ARENAS SORDO
ASESOR METODOLÓGICO

INDICE

I. Antecedentes.....	6
o Definición	6
o Incidencia de la microtia	6
o Anatomía de la oreja.....	6
▪ Oído externo	7
▪ Superficie auricular anterior (lateral)	8
▪ Superficie auricular posterior (medial).....	10
▪ Inervación	10
▪ Irrigación	11
▪ Canal auditivo	11
o Embriología de cabeza y cuello	12
▪ Arcos faríngeos.....	12
▪ Bolsas faríngeas	19
▪ Surcos faríngeos	19
▪ Membranas faríngeas	20
o Regulación génica del desarrollo facial.....	20
o Embriología del desarrollo auricular,.....	23
o Microtia y Espectro Facio auriculo vertebral.....	25
o Historia del Espectro FAV.....	26
o Clasificación de las microtias	27
o Etiología del Espectro FAV	27
o Genes asociados a Espectro FAV.....	28
o Genes <i>HOX</i>	31
o Papel de <i>HOXA2</i> en la morfogénesis auricular	34
o Papel de <i>HOXA2</i> en los apéndices preauriculares...35	

○ Otros genes.....	35
○ Vías de señalización.....	38
○ Estudios genéticos en humanos.....	39
○ Hipótesis actuales para la etiología y patogénesis	42
○ Manifestación clínica general del EFAV	44
II. Justificación	46
III. Planteamiento del problema.....	47
IV. Pregunta de investigación	47
V. Objetivos.....	47
○ Objetivo general	47
○ Objetivos específicos.....	47
○ Objetivos secundarios:	48
VI. Material y métodos	48
VII. Diseño	48
VIII. Población	48
IX. Criterios de inclusión	48
X. Criterios de exclusión	49
XI. Procedimiento	49
XII. Análisis estadístico.....	52
XIII. Resultados	53
XIV. Discusión	63
XV. Bibliografía	

ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *HOXA2* EN PACIENTES CON ESPECTRO FACIO-AURICULO-VERTEBRAL (EFAV). CASOS FAMILIARES

I. ANTECEDENTES

DEFINICION

El Espectro Facio auriculo vertebral también llamado Síndrome de Goldenhar, Síndrome del primero y segundo arcos branquiales, es un complejo de malformaciones principalmente craneofaciales y vertebrales. Los primeros reportes de los casos fueron realizados por Canton en 1861 y von Arlt en 1881.¹

La malformación central de este complejo es la microtia². La microtia se define como aurícula pequeña con o sin malformaciones, las cuales pueden ser mínimas o mayores^{3,4}. La anotia es la ausencia completa de los componentes auriculares y la poliotia, típicamente vista como duplicación de la aurícula en imagen en espejo, representan los extremos de los fenotipos auriculares⁵. La expresión menor de la microtia son los apéndices preauriculares²

INCIDENCIA DE LA MICROTIA

Su incidencia es variable en diferentes regiones, y se considera de 1:500 hasta 1:3000 recién nacidos vivos (RNV). En México se ha reportado de 1:1500 RNV. Es mas frecuente en varones, con una relación 2:1¹

ANATOMÍA DE LA OREJA

El hueso temporal que contiene al oído está formado por cinco áreas: el canal auditivo externo óseo, el proceso estiloides, la porción escamosa, la porción petrosa, y el proceso mastoideo. Las suturas de estas porciones son la fisura petrotimpánica, la sutura petroescamosa, la sutura timpanoescamosa y la sutura

timpanomastoidea. El proceso mastoideo no está presente al nacimiento, lo que condiciona que el nervio facial sea muy superficial.

El oído está dividido en tres compartimentos; externo, medio e interno.

OÍDO EXTERNO

El oído externo comprende la aurícula y el canal auditivo. La aurícula fibrocartilaginosa conduce las ondas sonoras por el canal auditivo hacia la membrana timpánica, Esta estructura flexible en forma de concha enrollada no solo tiene importancia funcional sino también estética. Desviaciones de la normalidad o aberraciones en la posición, forma, tamaño o en la arquitectura son notables e indeseables.

La aurícula es la parte externa del oído que protruye de la cara al nivel del hueso temporal. Consiste de cartílago elástico cubierto de piel, la forma del cartílago es muy importante, le confiere la forma a la aurícula. La aurícula tiene inclinación posterior, el eje longitudinal crea un ángulo de aproximadamente 8° con la línea retromandibular. La parte superior de la aurícula está localizada en el plano vertical con la ceja. La proyección normal desde la mastoides es de aproximadamente de 10 a 20 mm desde la mastoides hasta el borde libre del hélix. La proyección normal varía entre razas, los asiáticos presentan la distancia del hélix a la mastoides más grande. En niños la aurícula es más ancha y corta. La relación altura-anchura se incrementa conforme el oído crece, en los adultos es de aproximadamente 7:4. Dependiendo de la posición de la aurícula, sus superficies pueden describirse como anterior o lateral, y posterior o medial. En la vista frontal el hélix debe ser visible a 2-5 mm lateralmente detrás del antihélix.

SUPERFICIE AURICULAR ANTERIOR (LATERAL)

El contorno de la aurícula está formado por el hélix, un tubo de forma incompleta doblado que crea un canal o fosa escafoidea a lo largo de la mayor parte de su longitud. El hélix comienza en sentido anterior, que emerge de la cavidad o concha como la cruz del hélix. En primer lugar es anterosuperior, a continuación posterosuperior, posteroinferior y anterosuperior, creando un arco suave y redondeado. Un pequeño hoyuelo marca el punto en el que la cola del hélix se funde con el lóbulo. A menudo, una pequeña protuberancia conocida como tubérculo de Darwin, existe donde la hélice superior se encuentra con la parte posterior del hélix.

Dentro del hélix se encuentra el antihélix, que forma parte del piso del pabellón auricular y circunscribe a la concha. Por arriba, el antihélix tiene dos elevaciones o pilares el superior y el inferior, entre los que se encuentra la fosa triangular. Inferiormente, la cola del antihélix se une al antitrago en el surco auricular posterior. Tanto el hélix como el antihélix son visibles en una vista frontal, pero el antihélix sobresale más a medida que pasa desde la parte superior a la inferior, creando un ángulo de aproximadamente 20° entre los planos del hélix y del antihélix.

La rama inferior del antihélix está más orientada en sentido superior en las personas más altas con orejas más largas. En las personas con orejas cortas y en los niños, la rama inferior tiene orientación más horizontal. La concha es una cavidad incompleta que lleva al canal auditivo. El borde superior afilado de la concha está formado por la cruz inferior del antihélix, el borde inferior por los bordes del trago y el antitrago, que sobresalen de la concha y hacen que parezca más pequeña. Por el contrario, el borde lateral es liso y laminado y está formado por el antihélix. El trago se proyecta desde la cara para cubrir parcialmente la parte anteroinferior de la concha, mientras que el antitrago se proyecta

superiormente desde el lóbulo para cubrir parte de la región inferior de la concha. Existe una muesca prominente afilada se encuentra entre el trago y el antitrago.

El lóbulo es la única parte de la aurícula sin un marco cartilaginoso subyacente. Alrededor de un tercio de su perímetro está unido a la parte anterior de la mejilla, y el resto colgando como un borde libre. Por encima, un canal antitragal o depresión separa el lóbulo del antitrago.

La piel de la superficie auricular anterior está estrechamente adherida al pericondrio subyacente, con casi nada de grasa entre ellas. Se encuentran vasos y nervios dentro de una fascia que separa la piel y el pericondrio. Las glándulas sebáceas y sudoríparas están presentes en la fosa triangular y alrededor del meato auditivo externo, respectivamente. Glándulas de cerumen predominan en el conducto auditivo. El tegumento de la superficie auricular anterior está fuertemente unido y libre de grasa. Por el contrario, la superficie posterior se caracteriza por piel que puede arrugarse y deslizarse sobre el cartílago subyacente. Hay dos capas de grasa que permiten esto, una capa superficial densa y una capa profunda más floja. Una capa de fascia entre la capa superficial y profunda de tejido adiposo que envuelve a los nervios, vasos linfáticos, que suministran e inervan la cara posterior de la aurícula. También existe una red vascular subdérmica más superficial. Esta arquitectura subdérmica se extiende sobre el margen del hélix al borde del hélix donde se produce la transición de un tipo de tegumento a otro. El lóbulo está cubierto de pelos finos, contiene grasa trabecular firme y una red subdérmica de vasos profundos. Sobre la cara inferior de la aurícula, la transición de la piel que está adherida a la que se desliza es menos aguda, pero se produce desde el surco auricular posterior, el antitrago, trago, y el surco auricular anterior.

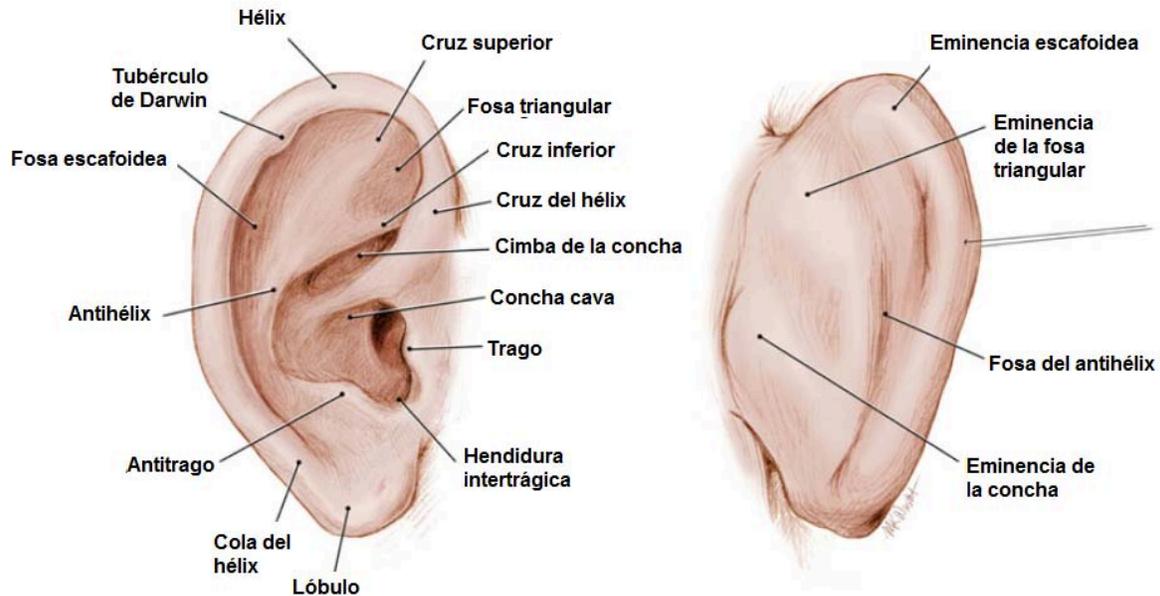


Figura 1
SUPERFICIE AURICULAR POSTERIOR (MEDIAL)

La superficie auricular posterior está oculta en su mayoría a la vista ya que la aurícula se proyecta solamente a 10 mm de la mastoides. La superficie está caracterizada por prominencias y surcos en un patrón inverso a los que se ve en la superficie auricular anterior. Las principales eminencias esta formadas por la fosa escafoidea, la concha y la fosa triangular. La fosa del antihélix cae dentro de estas prominencias

INERVACIÓN

La aurícula recibe inervación de ramas del nervio auricular mayor, del nervio occipital menor, del nervio aurículo temporal, del nervio facial y del nervio vago. La mayoría de estos son sensoriales con algunas fibras vasomotoras y secretoras derivadas del nervio facial

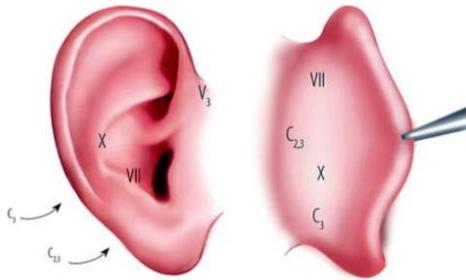


Figura 2. La innervación de la aurícula por el nervio auricular mayor (C3) y el nervio occipital menor (C2), el nervio auriculotemporal (V3) y las ramas sensoriales del VII y el X pares craneales

IRRIGACIÓN

El oído externo recibe irrigación anteriormente a través de las ramas de la arteria temporal superficial y posteriormente por la arteria auricular posterior. La arteria superficial temporal surge de la glándula parotídea derivada de las ramas anteriores de la arteria carótida externa. Esta emerge desde la capsula parotídea y corre superiormente hacia el área temporal aproximadamente 1 cm por delante de la oreja y debajo del músculo auricular anterior.⁶

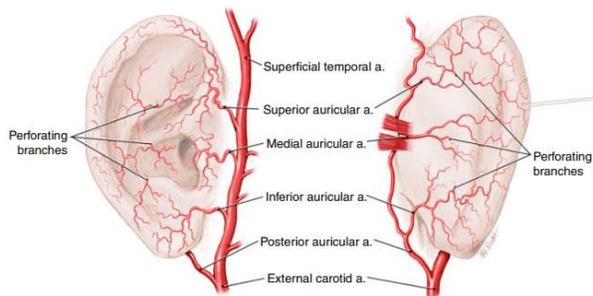


Figura 3

CANAL AUDITIVO

El canal auditivo externo mide aproximadamente 2.5 cm. El tercio externo es cartilaginoso, y los dos tercios internos son óseos. La piel de la parte ósea es muy delgada y no contiene glándulas, folículos pilosos ni alguna otra estructura anexa. Hay dos o tres fisuras en el canal auditivo externo cartilaginoso llamadas “Fisuras de Santorini”. Estas fisuras proveen una ruta para las infecciones del oído externo

al área parotídea o la fosa infratemporal. La trompa de Eustaquio o tuba auditiva conecta el oído medio a la nasofaringe. El tercio posterior de la misma en el adulto es hueso y cae dentro de la porción petrosa del hueso temporal. Los dos tercios anteriores son de cartílago. En los adultos la tuba cae dentro de un ángulo de 45° en relación al plano horizontal, mientras que la inclinación en niños es de solo 10°, y es más larga en el adulto que en los niños.

Las ondas sonoras son canalizadas por el pabellón auricular (parte visible del oído) al interior del canal auditivo hacia el tímpano. El tímpano transmite las vibraciones a la cadena osicular – martillo, yunque y estribo- en el oído medio. El estribo pasa las vibraciones al oído interno (canales semicirculares y a la cóclea). Las sensaciones auditivas son recogidas por la rama coclear o nervio vestíbulo coclear y transmitidas a la médula oblongada, el tálamo y finalmente a la corteza cerebral

El oído interno comprende la cóclea y el laberinto. El laberinto consiste de tres canales semicirculares (superior, posterior y lateral) y dos órganos otolíticos (utrículo y sáculo). La unión del ducto utricular y el ducto sacular forman el ducto endolinfático.

La cóclea tiene tres compartimentos llenos de fluido: la rampa timpánica, la rampa vestibular y la escala media, que contiene al órgano de Corti⁷

EMBRIOLOGÍA DE CABEZA Y CUELLO

1. ARCOS FARINGEOS

Inician su desarrollo en la cuarta semana como resultado de la llegada de las células de la cresta neural craneal que han migrado en dirección ventrolateral y contribuyen a la formación de la cabeza y del cuello. Se desarrollan en pares, como elevaciones superficiales a los lados de la faringe primitiva. Su

diferenciación craneocaudal depende de la expresión de los genes *Hox* y de gradientes de concentración de ácido retinoico, con excepción del primer arco, que es independiente de estos genes; por el contrario, para la formación del segundo y tercer arco es indispensable la expresión de *Hoxa-2* y *Hoxa-3*

Cada arco faríngeo tiene un núcleo de mesénquima recubierto por ectodermo en su cara interna. Dicho mesénquima deriva del mesodermo paraaxial y lateral de células de la cresta neural. Incluido en el mesénquima de cada arco faríngeo tenemos un vaso sanguíneo o arco aórtico, un cartílago, un primordio muscular y un nervio.

El primer par o arco mandibular aparece aproximadamente a los 23 ± 1 día. Forma dos prominencias a los lados del estomodeo: el proceso maxilar y el proceso mandibular. Ambos procesos serán responsables del desarrollo del esqueleto óseo del tercio medio e inferior de la cara y de los tejidos blandos de esas porciones

El segundo par o arco hioideo, aparece aproximadamente a los 24 ± 1 día: contribuye a la formación del hueso hioides. El quinto par generalmente no se forma en el humano, y el sexto es pequeño o rudimentario.

Durante la quinta semana, el mesénquima mixto de los arcos faríngeos (mesodermo y cresta neural) prolifera constantemente. El mayor crecimiento es el que presenta el segundo arco, que crece fundamentalmente en dirección caudal superponiéndose al tercer y cuarto arcos y ocultándose por completo, dejando un pequeño espacio denominado *seno cervical*, el cual finalmente desaparece al final de la séptima semana cuando se fusiona el segundo arco con el tercero, cuarto y sexto. Cuando ocurre el crecimiento caudal del segundo arco. Este expresa *Shh*, *FGF-8* y *BMP-7*, que aparentemente son los responsables de la proliferación del mesénquima subyacente. Ocasionalmente el seno cervical puede persistir en forma parcial o total y da lugar a quistes, senos o fístulas laterales del cuello, que

por lo general se van a localizar sobre el trayecto del borde anterior del músculo esternocleidomastoideo.

Cuadro 1. Estructuras derivadas de los arcos faríngeos

Arco faríngeo	Derivados vasculares (arcos aórticos)	Derivados óseos y cartilagosos	Derivados musculares	Nervios de los arcos faríngeos	Gen	Referencia
Primer par o arco mandibular 23±1 días	Arteria maxilar y parte de las arterias carótidas externas	Premaxilar, maxilar superior, cigomáticos, porción escamosa de los huesos temporales, mandíbula. El cartílago del primer arco o de Meckel, dará origen al martillo y al yunque, al ligamento anterior del martillo y al esfenomandibular.	Músculos de la masticación (temporal, masetero y pterigoideos medial y lateral), el milohioideo, el vientre anterior del digástrico, el tensor del tímpano y el tensor del velo del paladar.	V par craneal (trigémino), que inerva la piel de la cara, es el nervio sensorial principal de la cabeza y el cuello, y representa el nervio motor de los músculos de la masticación; las ramas sensitivas de este inervan también los dientes y los músculos de la cavidad nasal y de la cavidad oral	<i>EDN1</i> <i>(Regulador corriente arriba de Dlx5/6)</i> <i>EDNRA</i> <i>EDN3</i> <i>GSC</i> <i>OTX2</i> <i>Dlx1/Dlx2</i> <i>(parte dorsal del proceso maxilar)</i> <i>Dlx5/Dlx6</i> <i>(parte ventral del proceso mandibular)</i> <i>TCOF1</i> <i>Hrt1</i> <i>Hey1</i>	Clouthier ³⁰ Sato ³¹ Parry ³² Fujita ³³

Arco faríngeo	Derivados vasculares (arcos aórticos)	Derivados óseos y cartilagosos	Derivados musculares	Nervios de los arcos faríngeos	Gen	Referencia
Segundo par o arco hioideo 24±1 días	Arterias hioideas y estapediales	El cartilago del segundo arco o cartilago de Reichert dará origen al estribo, al proceso estiloides del temporal, al ligamento estilohioideo y la parte superior y astas menores del hueso hioides.	El músculo del segundo arco dará origen a los músculos de la expresión facial (buccinador, auricular, frontal, cutáneo del cuello, orbicular de los labios y orbicular de los párpados), el músculo del estribo, el estilohioideo y el vientre posterior del digástrico	El nervio del segundo arco es el VII par craneal (facial)	<i>HOXA2, Shh, FGF-8 y BMP7</i> <i>TCOF1</i> <i>Hrt1</i> <i>Hey1</i>	Fujita ³³ Sadler T.W ⁹

Arco faríngeo	Derivados vasculares (arcos aórticos)	Derivados óseos y cartilagosos	Derivados musculares	Nervios de los arcos faríngeos	Gen	Referencia
Tercer par	Arterias carótidas comunes y la porción proximal de las arterias carótidas internas	El cartílago del tercer arco formará la mitad inferior y las astas mayores del hueso hioides (finalmente los cartílagos del cuarto y sexto arcos se fusionarán y darán origen a los cartílagos laríngeos, excepto la epiglotis)	El músculo del tercer arco formará el músculo estilofaríngeo.	El nervio del tercer arco el IX par (glossofaríngeo), que inerva fundamentalmente mucosas de la lengua y laringe	<i>HOXA2, Hoxb2</i> <i>HOXA3, HOXB3</i> <i>HOXD3</i> <i>Hrt1</i> <i>Hey1</i>	Fujita ³³ Sadler T.W ⁹ Arteaga ⁸

Arco faríngeo	Derivados vasculares (arcos aórticos)	Derivados óseos y cartilagosos	Derivados musculares	Nervios de los arcos faríngeos	Gen	Referencia
Cuarto par	Del izquierdo el segmento del cayado aórtico comprendido entre la carótida primitiva izquierda y la arteria subclavia izquierda, del derecho el segmento proximal de la arteria subclavia derecha	Cricotiroideo, cartílago de la laringe (tiroides, cricoides, aritenoides, corniculado y cuneiforme	Los músculos del cuarto y sexto arcos darán lugar al cricotiroideo, el elevador del velo del paladar, los constrictores de la faringe, los constrictores de la laringe y la musculatura estriada del esófago.	El cuarto y sexto arcos son inervados por el X par craneal (vago); inerva la mucosa de la faringe	<i>Hrt1</i> <i>Hey1</i>	Fujita ³³ Sadler T.W ⁹
Sexto par	Del izquierdo de su porción proximal se originará la parte proximal de la arteria pulmonar izquierda y de su porción distal el conducto arterioso el cual se oblitera al nacimiento. Del derecho porción proximal se formará la parte proximal de la arteria pulmonar derecha					

2. BOLSAS FARINGEAS

Se desarrollan también en pares en el interior de la faringe primitiva, quedando recubiertas por su endodermo. Los pares de bolsas se forman en secuencia cefalocaudal entre los arcos, es decir, el primer par de bolsas se forma entre el primero y segundo arcos, y así sucesivamente. Hay cuatro pares de bolsas bien marcadas y su recubrimiento endodérmico da lugar a órganos importantes de la cabeza y el cuello.

Cuadro 2.

Bolsa faríngea	Derivado
Primer bolsa	Cavidad timpánica, el antro mastoideo, la tuba auditiva y parte de la membrana timpánica
Segunda bolsa	Amígdalas y las fosas y criptas amigdalinas
Tercera bolsa	Surge la mayor parte del timo (timo III) y las paratiroides inferiores (paratiroides III)
Cuarta bolsa	Se deriva una pequeña porción del timo (timo IV) y las paratiroides superiores (paratiroides IV)

3. SURCOS FARINGEOS

Los surcos faríngeos separan por el exterior a los arcos aórticos. Se forman cuatro surcos de cada lado. De estos, solo el primer surco contribuye a estructuras adultas formando el conducto auditivo externo.

Del segundo al cuarto surcos faríngeos quedan atrapados por el seno cervical. Obliterándose junto con este a medida que se desarrolla el cuello (entre la quinta y séptima semana)

4. MEMBRANAS FARINGEAS

Se sitúan al fondo de los cuatro surcos faríngeos, a cada lado del cuello del embrión. Quedan interpuestos entre un surco y una bolsa faríngea. Solo la primera membrana faríngea contribuye a estructuras del adulto, ya que junto con el mesénquima de la capa intermedia forma parte de la membrana timpánica⁸

5. REGULACIÓN GÉNICA DEL DESARROLLO FACIAL

Las células de la cresta neural provienen de células neuroepiteliales adyacentes al ectodermo de superficie, situado a lo largo de los bordes de los pliegues neurales. La señalización de la proteína morfogénica ósea (BMP) es importante para establecer esta región del borde y por lo tanto, regula la expresión de *WNT1* para que las células prospectivas de la cresta se transformen de epitelio a mesénquima y comiencen su migración hacia el mesénquima circundante. En el rombencéfalo, las células de la cresta se originan en un patrón específico a partir de segmentos llamados rombómeros (figura 4). En el rombencéfalo hay ocho segmentos de este tipo (R1-R8) y las células de la cresta neural que provienen de segmentos específicos migran para poblar arcos faríngeos específicos. Estas células de la cresta migran siguiendo tres corrientes distintas: las células de R1 y R2 migran hasta el primer arco junto con las células de la cresta de la región caudal del mesencéfalo; las células de la cresta de R4 migran hasta el segundo arco, y las células de R6 y R7 migran a los arcos del cuarto al sexto (figura 4).

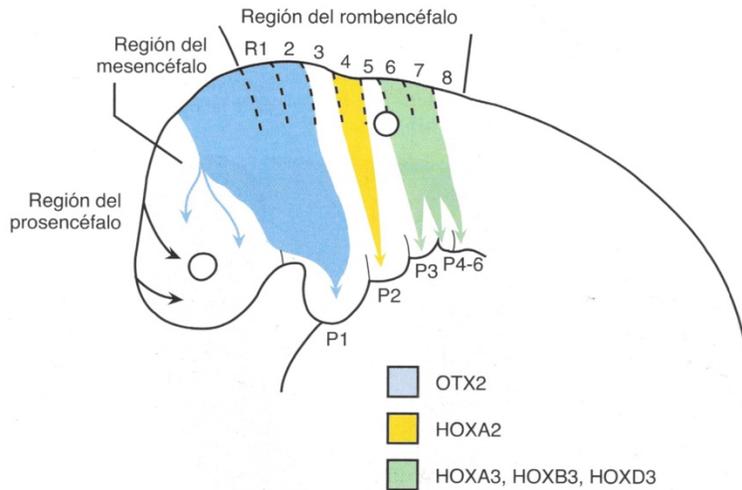


Figura 4 Se muestran las rutas de migración de las células de la cresta neural que forman los pliegues neurales en la cara y los arcos faríngeos.

La separación de estas tres corrientes se ve favorecida por el hecho de que en los segmentos R3 y R5 se forman muy pocas células de la cresta, y aquellas que se forman siguen las corrientes de células adyacentes para migrar. Es importante que las tres corrientes estén diferenciadas, ya que proporcionan referencias axónicas para guiar a los axones de los ganglios que se forman en la región de la cabeza y el cuello, como los ganglios trigeminal, geniculado, vestibuloacústico, petroso y nodoso. Estos ganglios se forman a partir de una combinación de células de la cresta y células de las placodas de esta región. Los axones del ganglio trigeminal entran en el rombencéfalo en R2, los del geniculado y el vestibular en R4, y los del petroso y el neumogástrico en R6 y R7, lo cual corresponde a tres corrientes de células de la cresta. Ningún axón se proyecta hacia R3 o R5.

Las células de la cresta neural que pueblan los arcos faríngeos forman los componentes esqueléticos característicos de cada arco. En el pasado se pensaba que las células de la cresta neural regulaban la estructuración de estos elementos esqueléticos, pero en la actualidad es evidente que este proceso está controlado por el endodermo de la bolsa faríngea. La formación de las bolsas faríngeas

ocurre antes de la migración de la cresta neural y se produce incluso en ausencia de las células de la cresta. Las bolsas se forman por la migración lateral de células endodérmicas y esta migración es estimulada por factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF). A medida que se forman, las bolsas expresan un patrón de genes muy característico (figura 5)

BMP-7 se expresa en el endodermo posterior de cada bolsa, *FGF 8* en el endodermo anterior, y la expresión de *PAX1* se limita al endodermo dorsal de cada bolsa. Además, *SHH* se expresa en el endodermo posterior de la segunda y tercera bolsa. Por lo tanto, estos patrones de expresión regulan la diferenciación y la estructuración del mesénquima del arco faríngeo en estructuras esqueléticas específicas. Sin embargo, este proceso también depende del mesénquima y constituye otro ejemplo de interacción entre el epitelio y el mesénquima. En este caso, la respuesta del mesénquima a las señales endodérmicas depende de los factores de transcripción expresados en este mesénquima. Estos factores de transcripción son los genes *HOX* y otros genes que son transportados por células de la cresta neural hasta los arcos. Las células de la cresta adquieren sus patrones específicos de expresión génica, de los rombómeros donde se originan (figura 4). El propio patrón de los rombómeros está determinado por un código interno de la expresión del gen *HOX* en el rombencéfalo, que las células de la cresta llevan consigo cuando migran. El primer arco es *HOX* negativo, pero expresa *OTX2*, un factor de transcripción que contiene un homeodominio que se expresa en el mesencéfalo; el segundo arco expresa *HOXA2* y los arcos tercero y sexto expresan miembros del tercer grupo parólogo de los genes *HOX*, *HOXA3*, *HOXB3* y *HOXD3* (figura 5). Los distintos patrones de expresión de estos factores de transcripción permiten que cada arco responda de forma diferente a las señales que provienen del endodermo de las bolsas, ya que el primer arco forma los maxilares superior e inferior, el segundo arco el hueso hioides, etc.

El resto del esqueleto de la cara, las regiones facial medial y superior, también derivan de las células de la cresta neural que migran hacia la prominencia frontonasal. En esta región, las señales que provienen del ectodermo de superficie

y las zonas inferiores del neuroepitelio determinan el destino del mesénquima. De nuevo parece que *SHH* y *FGF-8* tienen una importancia destacada en la estructuración de esta área, pero se desconocen las interacciones genéticas específicas⁹

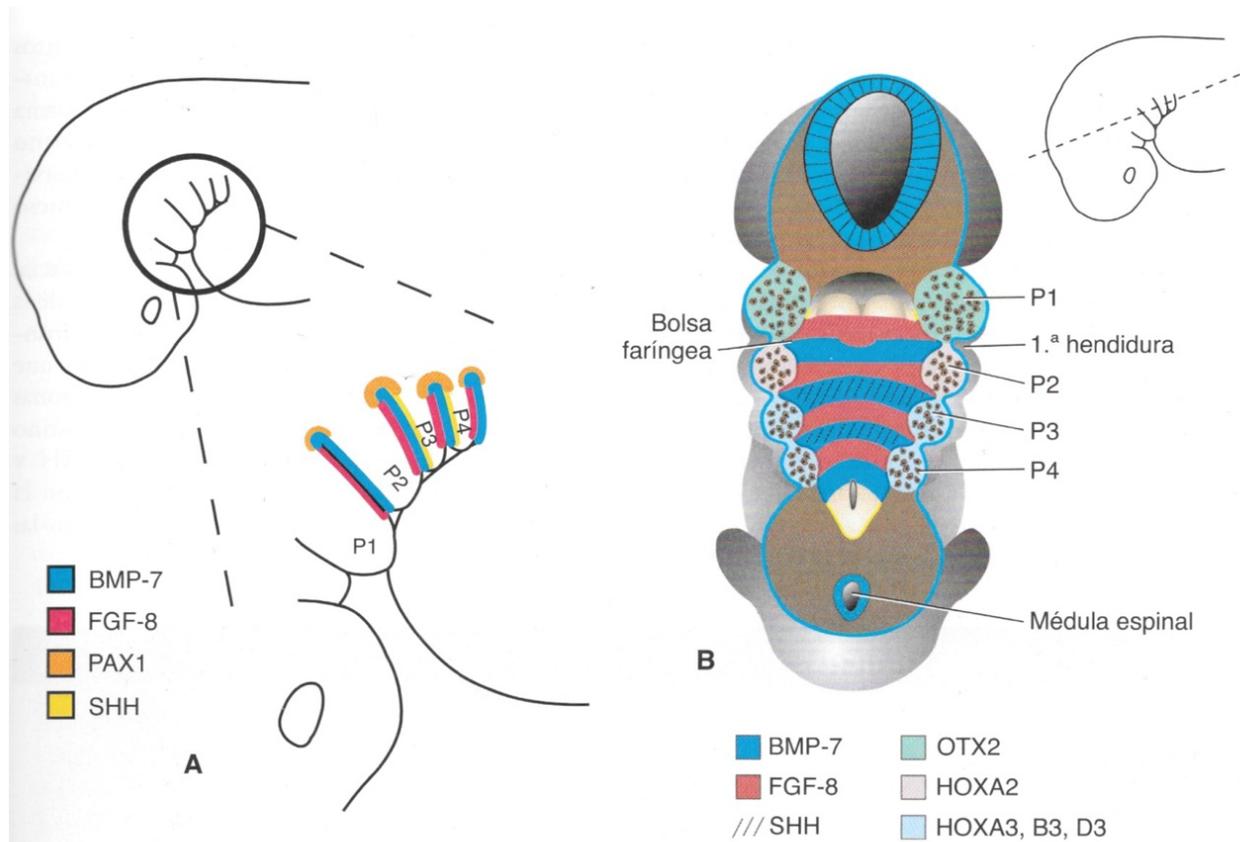


Figura 5. Se muestran los patrones de expresión génica en el endodermo y el mesénquima de los arcos faríngeos.

EMBRIOLOGÍA DEL DESARROLLO AURICULAR

Mucho de nuestro conocimiento del desarrollo auricular ha surgido de observaciones descriptivas de cambios morfológicos en los arcos branquiales (o faríngeos) en embriones humanos y de animales además de la interpretación de malformaciones vistas en la clínica y en modelos de animales. En los inicios de los años ochenta se describieron seis protuberancias, ahora conocidas como “montículos de His” en los arcos branquiales de los embriones humanos. Estos

montículos o tubérculos –tres en el primer arco y tres en el segundo- son los primeros identificados durante la sexta semana de la embriogénesis rodeando la hendidura del primer arco branquial, el cual es el espacio o surco entre el primero y segundo arcos. Crecimiento y cambios morfológicos dentro de estos arcos ocurren hasta que la forma definitiva de la aurícula es evidente entre la octava y la novena semana del desarrollo (figura 6a). Durante los siguientes dos meses, la forma asume su forma adulta (figura 6a y c).

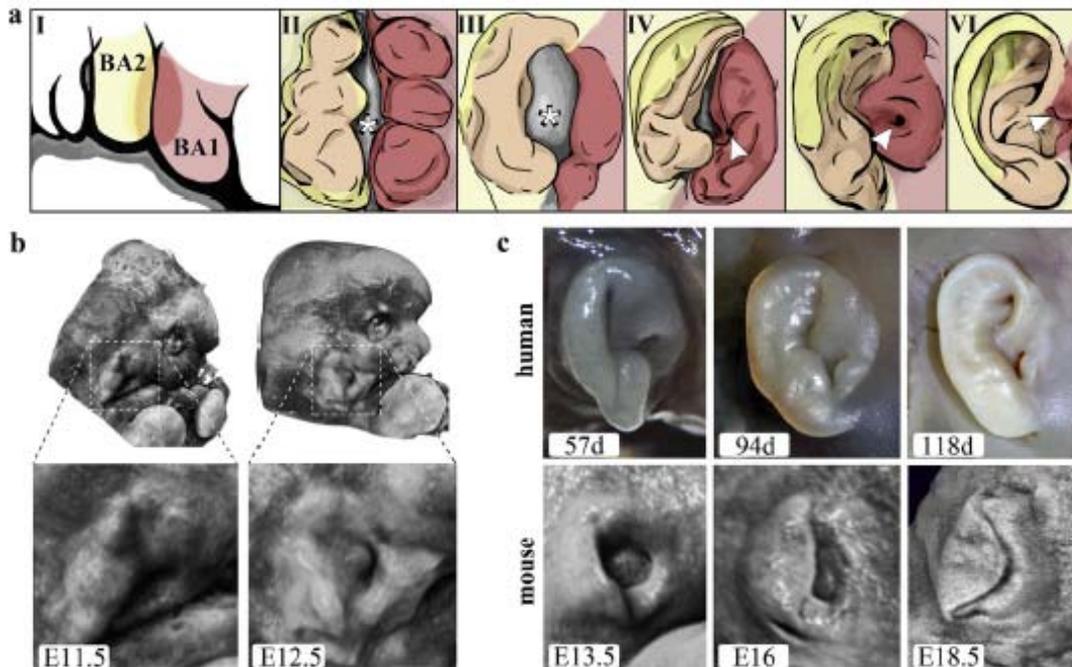


Figura 6. Desarrollo de la aurícula humana y de ratón. (I) Los arcos branquiales contribuyen al desarrollo auricular –el proceso mandibular del primer arco branquial (rosa fuerte) y del segundo arco (naranja)- son evidentes durante la quinta semana de gestación. (II) en la semana seis, los montículos de his aparecen. (III) los montículos coleasen. (IV) el borde libre de la aurícula aparece caudal al segundo arco. (V) durante la novena semana, el primero y segundo arco emergen para cerrar la hendidura branquial; el CAE se forma por invaginación dentro del primer arco branquial. La forma final aparece después de la 13ª semana de gestación. La primera hendidura branquial está marcada en II y III con un asterisco blanco. El CAE está marcado en IV-VI con una flecha blanca.

Del estudio de varios estadios embrionarios concluyeron que cada montículo contribuía a un componente de la oreja en tiempo preciso para su crecimiento y diferenciación. Sin embargo hay otros reportes donde no tienen importancia los montículos y sus derivados en la estructura auricular. Por ejemplo, unos años antes de las descripciones de His, Moldenhauer en 1877 reportó montículos similares, aunque en menor número, en pollos con pérdida de los pabellones auriculares. Schwalbe en 1891 también describió la presencia de tubérculos branquiales en reptiles (no tienen orejas). Estos y otros estudios fueron muy bien resumidos en una revisión exhaustiva por Streeter en 1922, quien se comenzó a cuestionar sobre el modelo del desarrollo de la oreja, El modelo del montículo ha prevalecido en la literatura con pequeñas modificaciones. En la versión mas frecuentemente reproducida, los montículos del segundo arco forman la mayor parte de la oreja, el primer arco forma el trago y al menos parte de la raíz, y de la primera hendidura branquial el conducto auditivo externo

Más consistente con los hallazgos anteriores, es el modelo en donde el tejido se marcó para identificar los montículos que contribuían a algunas partes específicas de la oreja, el tejido caudal de los montículos del segundo arco dio origen al pliegue auricular libre de donde el hélix y la fosa escafoidea derivan (Porter y Tan 2005). Nuevos datos en ratón indican que de la primera hendidura branquial no se origina el conducto auditivo externo¹⁰.

MICROTIA Y ESPECTRO FACIO AURICULO VERTEBRAL

Hay muchos términos usados para este complejo indicando el amplio espectro de alteraciones descritas y enfatizadas por varios autores. El complejo se ha conocido como microsomnia hemifacial, displasia oculo-auriculo vertebral, displasia Facio-auriculo-vertebral, Síndrome de Goldenhar, Síndrome de Goldenhar-Gorlin, Síndrome del primero y segundo arco branquial, displasia facial lateral, microsomía craneofacial unilateral, disostosis mandibular, disostosis mandibulofacial unilateral, necrosis facial intrauterina unilateral, displasia branquiogénica-auricular y complejo malformativo facio-auriculo-vertebral¹¹

Aunque algunos casos con microtia son hereditarios (2.9-33.8%), la mayoría son esporádicos^{12,13}

Se ha encontrado que es más frecuente en hombres, y la mayoría de los casos son unilaterales, especialmente en el lado derecho (60%), con una expresión más severa en uno de los lados^{14,15}

No hay consenso en la literatura en relación a la terminología usada para estas malformaciones del oído externo. Algunos autores prefieren usar el término “microtia”^{4,16}, mientras que otros usan “microtia-anotia”, que nos indican la expresividad variable de la entidad^{1,16}

HISTORIA DEL ESPECTRO FAV

En 1952 Goldenhar describió tres pacientes con dermoides epibulbares, apéndices cutáneos preauriculares, asimetría mandibular y malformaciones de las vértebras cervicales. Esta combinación de malformaciones fue posteriormente llamada síndrome de Goldenhar¹⁸. En 1960 los Drs. Gorling y Pinborg definieron la microsomnia hemifacial como una condición que afecta el desarrollo auditivo, oral y mandibular. Notaron que las manifestaciones pueden ser desde leves a severas y que la afectación facial estaba limitada a un solo lado en muchos pero no en todos los casos. Ellos consideraron el síndrome de Goldenhar como una variante de este complejo. En 1963 Gorlin et.al sugirió el uso del término displasia oculo auriculo vertebral para describir el síndrome caracterizado por dermoides epibulbares y/o lipodermoides, apéndices auriculares, fistulas auriculares y anomalías vertebrales

En 1976 Gorlin et al. Concluyó que había solapamiento de las manifestaciones clínicas de la microsomnia hemifacial, el Síndrome de Goldenhar y la displasia oculo auriculo vertebral ya que no se han realizado distinciones validas entre ellas.

Casos clínicos con todas o algunas de las características atribuidas a la microsomnia hemifacial y al síndrome de Goldenhar sugiere un espectro continuo de entidades diagnósticas. Heterogeneidad etiológica y complejidad fue sugerida para la gran variabilidad observada en los casos esporádicos y la ocurrencia de casos familiares que aparenta un modelo de herencia mendeliana. Treinta años después esto no ha cambiado mucho en su valoración

Subsecuentemente Gorlin et. al. ha usado el termino de espectro oculo auriculo vertebral para describir este complejo. La condición es ahora conocida por ser extremadamente compleja y heterogénea. En el presente trabajo nosotros ocupamos el término espectro facio-auriculo vertebral¹⁹

CLASIFICACIÓN DE LAS MICROTIAS

Para la realización del presente trabajo se utilizó la clasificación de Hunter:

Microtia de primer grado: presencia de todos los componentes normales de la oreja, pero con una longitud de más de 2 DE por debajo de la media.

Microtia de segundo grado: longitud media de la oreja por debajo de 2 DE, con la presencia de algunas pero no todas las partes de la oreja normal.

Microtia de tercer grado: presencia de algunas estructuras auriculares, pero no se logran reconocer todos los componentes de la oreja.

Anotia: ausencia completa de la oreja²⁰

ETIOLOGÍA DEL ESPECTRO FAV

La etiología de la microtia-anotia es pobremente comprendida. Mucho se ha publicado acerca del tratamiento quirúrgico y sus resultados.

La etiología es heterogénea. Queda por determinar si todos o la mayoría de los factores etiológicos convergen en uno o pocos mecanismos para su desarrollo. Una cosa que debe ser consistente es que deben existir algunos efectos en el desarrollo de la región del embrión que dará lugar a las estructuras implicadas durante la embriogénesis.

Los factores etiológicos que se han descrito incluyen uso de medicamentos (primidona, ácido retinoico, talidomida), gestación múltiple, diabetes crónica o gestacional. En la microsomnia hemifacial también se ha reportado en otras condiciones, síndromes mendelianos y distintas aberraciones cromosómicas algunas de las cuales fueron mosaicos

Hay evidencia fuerte que soporta la importancia de las causas ambientales como la altitud. Mas recientemente, la ingesta periconcepcional de ácido fólico que contienen algunos suplementos fue asociado con riesgo disminuido de microtia-anotia en mujeres no obesas.

Pocos estudios se han enfocado en las causas genéticas de la microtia-anotia.

GENES ASOCIADOS A ESPECTRO FAV

Se ha usado gran variedad de estudios genéticos para microtia, incluyendo análisis de ligamiento, secuenciación directa del DNA de pacientes afectados, estudios de un solo gen, identificación de rearrreglos citogenéticos y modelos animales.

Evidencia para contribución genética significativa es con base en 1) alta concordancia en gemelos monocigotos más que en dicigotos; 38.5% y 4.5% respectivamente; 2) casos familiares reportados con modos de herencia autosómica recesiva o dominante con expresividad variable y penetrancia incompleta, 3) estimación de casos familiares que va del 3-34% 4) más de 18 síndromes diferentes asociados con microtia en los cuales se han reportado alteraciones de un solo gen o aberraciones cromosómicas; y 5) modelos de animales donde se demuestra que mutaciones en genes específicos ocasionan microtia.

Los modelos murinos son ampliamente usados para el desarrollo de mecanismos involucrados en la formación de la cabeza y cara. Los defectos en el desarrollo del oído externo en ratones mutantes van desde hipomorfismos a la completa ausencia de la oreja. La siguiente tabla incluye los modelos con alteraciones en la estructura de la oreja ²⁰

Gen	Fenotipo de la oreja del ratón	Fenotipo de la oreja humana
<i>Bmp5</i>	Oído externo pequeño/CAE normal	Nr
<i>Chuk(Ikka)</i>	Anotia	Nr (MIM:613630-sin anomalías en las orejas de los dos casos reportados con mutaciones en <i>IKKA</i>)
<i>Cyp26b1</i>	Oído externo pequeño	Nr
<i>Dlx5/Dlx6</i>	Oído externo ausente, oído medio severamente afectado	Nr
<i>Edn1</i>	Oído externo muy pequeño/CAE ausente/oído medio ausente	Nr
<i>Ednra</i>	Oído externo pequeño	Nr
<i>Eya1</i>	Anotia	<i>EYA1</i> : 30% con alteraciones del oído externo (hiperplegado/deformado)
<i>Fgf8</i>	Oído externo pequeño /alteraciones de oído meido	Nr
<i>Fgf10</i>	Oído externo pequeño	Nr
<i>Frem2</i>	Anotia	Nr
<i>Gsc</i>	Oído externo ligeramente disminuido en tamaño/CAE ausente/alteraciones de oído interno	Nr

<i>Hfm locus</i>	Oído externo pequeño/Anotia/Ausencia de CAE/Alteraciones de oído medio	Correlación génica no identificada en humanos
<i>Hoxa1</i>	Oído externo pequeño/Alteraciones de oído medio e interno	Orejas deformadas (presente en pocos casos)
<i>Hoxa1/Hoxb1</i>	Anotia (sin aurícula residual)	Nr
<i>Hoxa2</i>	“Anotia” (protuberancias pobremente definidas)	Microtia I y II^(a)
<i>Hox2.2</i>	Oído externo pequeño	Nr (Humanos: <i>HOXB6</i>)
<i>Irf6</i>	Anotia	Nr
<i>Pax8</i>	Anotia/Oído externo pequeño/Alteraciones de oído interno y medio	Nr
<i>Prrx/Prrx2</i>	Oído externo pequeño/Alteraciones de oído medio e interno	Nr (Humanos: <i>PMX1</i>)
<i>Prkra</i>	Oído externo pequeño / Alteraciones de oído medio	Nr
<i>Rar</i>	Oído externo pequeño/Anotia	Nr
<i>Sall1</i>	Oídos no afectados	Microtia tipos I-II ^(a) / Apéndices preauriculares
<i>Six1/Six4</i>	Anotia	Nr
<i>Tbx1</i>	Oído externo pequeño/Anotia/Alteraciones de oído medio e interno	Microtia I ^(a) (infrecuente)
<i>Tcfap2a</i>	Anotia	Nr
<i>Tcof1</i>	Oídos en forma de taza/Alteraciones de oído medio	Microtia y atresia del canal auditivo
<i>Wnt5a</i>	Oído externo pequeño	Nr

Nr: no reportado

^(a)De acuerdo a la clasificación de Marx

GENES HOX

Los genes homeobox están involucrados en el desarrollo de los arcos faríngeos:.. Codifican para factores de transcripción altamente conservados que controlan la identidad de la posición de las células (patrón corporal) y la morfogénesis a lo largo del desarrollo así como también en forma de interruptor sobre cascadas de otros genes. La familia de los genes Hox esta agrupada dentro del genoma y esta ordenada en los cromosomas en la secuencia en la que se expresan durante el desarrollo: este patrón altamente ordenado de la expresión génica puede constituir parte de un mecanismo por el cual las especificaciones morfogénicas son establecidas. Inactivación de *Hoxa1* en ratones ocasiona oídos externos hipoplásicos y alteraciones del oído medio e interno, mientras que mutantes compuesto de *Hoxa1/Hoxb1* se presentan con anotia completa²¹. En contraste *Hoxa2*, se requiere para la definición del segundo arco faríngeo y por lo tanto para los pasos iniciales de la formación de la oreja, se expresa fuertemente en la oreja del ratón. Consistente con esto, el ratón knockout *Hoxa2* presenta microtia, descrita como “ una pequeña protuberancia sin forma reconocible”²² (Los ratones deficientes en *Hoxb6* y *Hoxa7* presentan microtia en adición a ojos abiertos y paladar hendido)²⁰

HOXA2 se localiza en 7p15.2 en el humano, cuenta con 2 exones, tiene 2458 pb, codifica para un proteína de 376 aminoácidos con peso molecular de 41002 Da

PAPEL DE *HOXA2* EN LA MORFOGÉNESIS AURICULAR

Los modelos revisados de la morfogénesis auricular (fig 7a) han mostrado nuevos hallazgos genéticos en ratones²³. Estas revisiones se extienden de sus estudios previos mediante la caracterización de ratones deficientes de *Hoxa2*, que presentaron como un modelo para anotia. *Hoxa2* codifica un factor de transcripción

homeobox normalmente expresado en todo el mesénquima del segundo arco branquial, tanto el ratón como en humanos, los ratones deficientes de *Hoxa2* no solo tienen ausencia de orejas, también tienen duplicado el CAE²³. Mutaciones en la región codificante de *HOXA2* también han sido encontradas en pacientes con fenotipos con microtia. Alasti y cols (2008)⁵⁵, fueron los primeros en reportar una mutación de sentido equivocado (c.558C>A, p.Q186K) que ocasiona un cambio en un amino ácido altamente conservado en la posición 186 de la proteína HOXA2, en una familia iraní consanguínea con microtia bilateral autosómica recesiva, con hipoacusia mixta de severa a profunda, paladar hendido parcial, alteraciones del canal auditivo, dicha mutación no fue encontrada en 231 Iraníes y 109 Belgas como controles.

Brown y cols (2013) posteriormente describieron a una familia de tres generaciones con microtia bilateral no sindrómica e hipoacusia con herencia autosómica dominante en donde identificaron una mutación sin sentido en *HOXA2* (c.703C>T, p.Q235*) que no fue encontrada en 218 controles.

Estos hallazgos también son consistentes con el efecto sensible a dosis de *HOXA2*; ya que el fenotipo más severo fue en la familia reportada por Alasti y cols (2008) probablemente por estar relacionado con la pérdida completa de la función de *HOXA2* en ambos alelos en la familia consanguínea.

Está bien establecido que los genes homeóticos, como es *Hoxa2*, funcionan como los primeros especificadores de la identidad axial (el también llamado código Hox). La pérdida de la función de los genes Hox, en un segmento del cuerpo, ocasiona una transformación homeótica del tejido que normalmente los expresa originando estructuras vistas en el segmento anterior adyacente “duplicación de imagen en espejo”. Igualmente la expresión errónea de los genes Hox en dominios anteriores que normalmente no expresan el gen es típicamente capaz de iniciar el programa molecular de las estructuras posteriores; esta transformación del tejido es una duplicación en imagen en espejo del segmento posterior. Esto implica que *Hoxa2* se expresa en la cresta neural derivada del mesénquima del primer arco branquial donde este normalmente no se expresa. Este ratón presentaba

sorprendentemente duplicaciones auriculares en imagen en espejo (fig 7 a-c), soportando la conclusión que *Hoxa2* especifica la identidad del segundo arco. Los ratones son un recurso valioso para la investigación del programa genético especificando la identidad de las estructuras de la oreja derivadas del segundo arco.

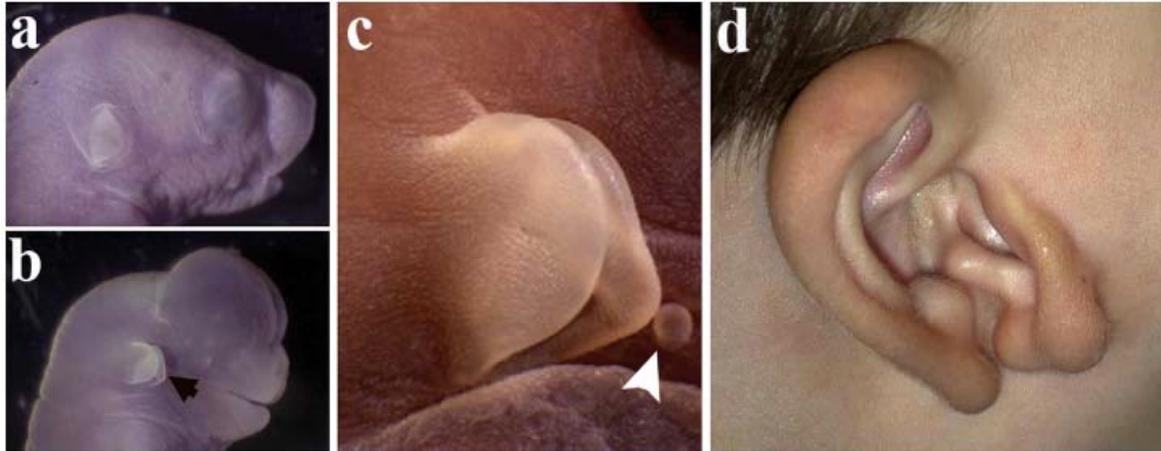


Figura 7

Un hallazgo sorprendente de los estudios en ratones de Minoux fue que el CAE no se deriva de la primera hendidura branquial, como se presume en modelos actuales del desarrollo auricular. Estos investigadores encontraron que en adición a la ausencia de las orejas, los ratones con deficiencia de *Hoxa2* mostraron duplicación del CAE así como también del martillo y del yunque -huesecillos del oído medio-, los dos últimos ya se conocía que eran derivados del mesénquima del primer arco branquial. Estas observaciones sugieren que el CAE deriva de una invaginación distinta dentro del tejido del primer arco branquial, que fue posteriormente confirmado por estudios de mapeo así como de la pérdida del CAE en ratones transgénicos con duplicación de estructuras auriculares

Mientras que los hallazgos de Minoux proporcionaron los datos definitivos del origen del CAE, su interpretación de que la oreja de ratón deriva completamente del segundo arco branquial es engañosa por el uso impreciso del término “pinna”. Por definición, la pinna comprende todas las estructuras externas del oído, incluyendo el trago y la raíz. Pacientes con mutaciones en la región codificante de

HOXA2 muestran microtia que respeta estructuras como el trago, que presumiblemente deriva del primer arco branquial (Alasti y cols 2008; Brown 2013).

Se cree que estructuras ortólogas al trago están presentes en el oído del ratón adulto (figura 7), aunque estas son un poco difícil de reconocer en el periodo prenatal. Después de la revisión de Minoux de cortes histológicos de la oreja de embriones silvestres y de los embriones con mutaciones en *Hoxa2* con orejas duplicadas, los montículos del primer arco característicos (vistos claramente en cortes horizontales de embriones control en la Figura 8E, I, M del artículo de Minoux y cols) no son evidentes en el mutante. En el ratón mutante los montículos sufren una transformación homeótica en las estructuras auriculares del segundo arco. Por lo tanto sus estudios demuestran que *Hoxa2* define los derivados del segundo arco branquial que forman el “grueso” del tejido auricular, como predijo otros modelos para el desarrollo auricular humano (fig 6a). Se necesitan investigaciones morfológicas y estudios de mapeo de los derivados del primer arco en embriones en estadios avanzados o estadios posnatales (si estos ratones sobreviven pasando el nacimiento) pueden ser necesarios para demostrar definitivamente que los derivados ortólogos del primer arco como es el trago existen en el ratón. Consistente con esta visión, pacientes con duplicaciones de orejas en espejos similares no muestran evidencia de trago (7d).

PAPEL DE *HOXA2* EN LOS APÉNDICES PREAURICULARES

Hay evidencia de que los apéndices preauriculares son resultados de expresión ectópica de un gen o genes que funcionan tempranamente en el programa genético que normalmente presentaría el segundo arco branquial.

Se ha observado que la expresión ectópica de *Hoxa2* en ratones ocasiona duplicación de la oreja en imagen en espejo así como apéndices ectópicos pequeños que se parecen a apéndices preauriculares (fig 2b y c de Minoux 2003). Minoux y cols reportaron que estos pequeños apéndices expresaban numerosos

genes conocidos por estar corriente abajo de *Hoxa2*, incluyendo *Bmp4*, *Bmp5* y *Tsg1*. Ninguno de estos genes son especificadores de la identidad del segundo arco branquial pero más bien son requeridos para la proliferación y diferenciación del cartílago auricular y otros tipos celulares. Consistente con esto, cada uno de estos genes cuando están alterados en el ratón dan origen a fenotipos simples de microtia, como se ven en la mayoría de las formas sindrómicas de microtia (como son los síndromes LAMM, Miller, Treacher Collins, CHARGE y BOF). De estas observaciones, Minoux y cols concluyeron que estos apéndices son estructuras auriculares incompletamente desarrolladas. En la clínica, la mayoría de los apéndices preauriculares, o alteraciones auriculares accesorias contienen cartílago que apoya su origen debido a la activación ectópica del programa de desarrollo auricular normal.

Se ha propuesto que la activación ectópica del programa genético de *HOXA2* (arco branquial 2) podría explicar la presencia de apéndices pre-auriculares, ya sea en los síndromes mencionados o en casos esporádicos.

OTROS GENES

SALL1

Codifica uno de los cuatro genes homeóticos *spalt* en humanos de la región específica de *Drosophila* (Jürgens 1988; De Celis y Barrio 2009), se cree que generalmente funciona como un supresor de la transcripción. *Spalt* se identificó primero debido a que su mutación dio lugar a la transformación homeótica parcial tanto del extremo de la cabeza y la cola de *Drosophila*. En los invertebrados, se han encontrado que los genes *spalt* son miembros de los factores Homeobox arquetípicos (Hox), pero también se ven involucrados en la regulación de la expresión de diversos genes homeobox, incluyendo tanto los genes homeobox arquetípicos y huérfanos (COPF y cols 2006 ; Toker y cols 2003). Se requiere especificar esta compleja red de regulación de la identidad de los diferentes segmentos del cuerpo de los invertebrados. Al menos en algunos tipos de células

de mamíferos, es evidente una compleja relación similar como con los genes homeobox, por ejemplo *SALL1/Sall1*. En el esbozo de la extremidad del ratón la expresión de *Sall1* está regulada por *HOXA13* y *Hoxd13* (Kawakami y cols 2009), mientras que en las células madre embrionarias *Sall1* aparece para reprimir diversos genes Hox, incluyendo *Hoxd13* y *GSC* (goosecoid) (Karantzali y cols., 2011). Aunque no se sabe si *Sall1* tiene una relación regulatoria similar con *Hoxa2* en los arcos branquiales, como lo hace con las proteínas Hox en otras partes del cuerpo, se expresa en el mesénquima de la cabeza antes de la aparición de los arcos branquiales y luego se restringe sobre todo en la primera hendidura branquial (Buck y cols., 2001) y en los límites se expresa *Hoxa2* en el momento en que aparecen los montículos

GSC

Se expresa en el primer y segundo arcos branquiales y en ratones nulos de *Gsc* muestran pequeñas pinnas y ausencia del CAE (Yamada y cols, 1995). Por otra parte, el hallazgo de que *Hoxa2* contribuye y mantiene la expresión de *GSC* en el segundo arco branquial, pero no en el primer arco (Grammatopoulos y cols, 2000) también es consistente con una relación de regulación para establecer la identidad del arco¹⁰

Six y *Eya*

En vertebrados, miembros de la familia génica homeobox *SIX* (*SIX6*) han sido implicados en el desarrollo del oído externo (kawakami y cols 2000) . Los genes *SIX* son homólogos del gen *sine oculis* (*six*) en la mosca del vinagre. En *Drosophila melanogaster* la función de *SIX* se ha visto conservada a través de la evolución, ranas, pollos y ratones deficientes de *Six1* que presentan alteraciones craneofaciales, mientras que la expresión alterada de *Six2* ocasiona displasia frontonasal en ratones. Los ratones *Six1/Six4* presentan microtia, mientras que la deficiencia de *Six1* aislada está asociada con oído externo y medio normales.

EYA1 es el homólogo humano de *Drosophila* con ojos ausentes (*Eya*). *EYA* forma

un complejo con *SIX* (*EYA-SIX*) para regular el desarrollo de muchos tejidos y órganos en vertebrados y moscas. Genes diana del complejo *EYA-SIX* incluye *SIX2* y *SALL1*. Estudios de expresión de *Eya1* han mostrado un papel mayor en el desarrollo de la oreja aparentemente relacionado con la formación del cartílago: el ratón knockout para *Eya1* presenta anotia. *Sall1* está presente en el tejido craneofacial pero los animales knockout tienen oídos normales. Como para los genes *SIX*, hay genes adicionales *SALL* en mamíferos (*SALL2-4*) que su función puede ser controlar la presentación fenotípica.

Recientemente *Sip11* (Shank-interacting protein-like 1) y *Rbck1* (*RBCC* protein interacting with PKC1) fueron identificadas como nuevas proteínas de interacción con *Eya-1*. *Sip11* y *Rbck1* se expresan juntas con *Eya1* en muchos tejidos en ratones y en pez cebra para dirigir el desarrollo del oído interno y de los arcos faríngeos así como de otros órganos. *Sip11* y *Rbck1* actúan como cofactores para el complejo *Eya-Six*, pero se necesitan nuevos estudios que lo confirmen.

Tbx1

En ratones, mutaciones en *Tbx1*, un miembro de la familia T-box de factores de transcripción, ocasionan falla en el desarrollo del oído medio y externo y en hipoplasia de los órganos sensoriales del oído interno. Un fenotipo similar fue también visto seguido de inactivación de *Tbx1* exclusivamente en el endodermo del arco faríngeo, indicando un papel primario para este gen en la morfogénesis del arco faríngeo. De interés, la heterocigosidad de *Tbx1* está asociada con otitis media crónica, pero no con defectos morfogenéticos, y no interfiere con la formación de las estructuras del oído externo, medio e interno.

Irf6 y *Chuk* (*Ikka*)

Ratones nulos homocigotos para *Irf6* tienen pérdida del oído externo, piel anormal, extremidades, hocicos y mandíbulas cortas. Además de adhesiones epidérmicas ectópicas en muchos sitios, incluyendo en la cavidad oral, en la cola,

las extremidades traseras y el esófago, aunque no específicamente reportadas para el oído. Un fenotipo similar fue observado en el ratón deficiente para *Chuk* (también conocido como *Ikka*). Los autores deducen, basados en la expresión histológica y génica, que las alteraciones en *Irf6* y *Chuk* en ratón son secundarias a los defectos en la diferenciación epidérmica de la proliferación celular.

VIAS DE SEÑALIZACIÓN

Vías de señalización involucrados en el desarrollo del oído externo incluye las proteínas morfogenéticas de hueso (Bmps), Wntless/INT (Wnts), factores de crecimiento fibroblástico (Fgfs) y del ácido retinoico. Desregulación de estas vías de señalización son gatillos para factores genéticos o ambientales para las malformaciones. Mientras las células de la cresta neural probablemente reciben patrones de señales durante la migración, muchas de las señalizaciones para el patrón dentro de los arcos vienen de señales recibidas después de que estas llegan a los arcos.

Los genes *Bmp*, especialmente *Bmp5* han sido considerados como genes candidatos para microtia en humanos, estudios en ratones han mostrado que *Bmp5* está aparentemente más relacionado con el crecimiento que con el patrón temprano de la diferenciación y formación del oído externo. El ratón mutante para *Bmp5* usualmente presenta oídos cortos atribuidos a defecto en el cartilago auricular.

SEÑALIZACIÓN FGF

Involucrando diferentes ligandos Fgf y sus receptores, Fgfr1-3, juegan un importante papel en el desarrollo de la oreja como evidencia de fenotipos mutantes específicos; ratones mutantes en *Fgf8* y *Fgf10* presentan oídos externos pequeños y ratones homocigotos para el alelo hipomórfico *Fgfr1* presentan oídos muy pequeños y CAEs anormales. Aunque no es claro cuando

estos componentes en la señalización son requeridos, no si estos ligandos y receptores se expresan en la oreja durante la gestación tardía,

VIA WNT

Miembros de la familia Wnt han sido implicados en la formación y el desarrollo de las células de la cresta neural, pero sus papeles independientes han sido difíciles de determinar debido a la expresión sobrelapada y a la redundancia funcional. Se ha mostrado que Wnt5 se expresa en el mesénquima del oído externo en desarrollo en adición el ratón knockout de Wnt5 presenta oídos pequeños. Aunque microtia no ha sido descrito en otros mutantes Wnt.

VIA DE LA ENDOTELINA

Ratones portadores de una mutación en la endotelina o en los receptores de la endotelina también presentan varias malformaciones de oído. La vía de la endotelina tienen un papel bien establecido en regular la migración y proliferación de la cresta neural, por lo tanto es posible que mutaciones en esta vía puede estar involucrada en la microtia en humanos. El factor de transcripción *Goosecoid* (*Gsc*) se encuentra corriente abajo de la vía de señalización de la endotelina, se expresa en el mesénquima faríngeo alrededor de la primera hendidura faríngea y ha sido implicado en el desarrollo del oído externo y medio mediante análisis de mutaciones en pacientes.

ESTUDIOS GENÉTICOS EN HUMANOS

Microtia ha sido reportado en pacientes con trisomías autosómicas, como es la trisomía 18, 21 y 22, así como también las trisomías en mosaico del 13 y del 18; y aneusomias, como es el de la delección de 4p, 5p, 18p, 18q y 22q11.2. Translocaciones que involucran la región 6p24 ha sido asociada con hendidura orofacial y microtia bilateral. Muchos casos de reportes de mosaicos 46,X,der(Y)t(Y;1)(q12;q21)/46,XY describe la presencia de microtia asociada con anomalías como es cifoescoliosis, oligodactilia, contracturas articulares,

malformaciones del sistema nervioso central, onfalocele, hernia diafragmática, defectos cardiacos y malformaciones urogenitales. Microtia ha sido asociada con alteraciones en cada uno de los cromosomas confirmando la observación de Schinzel que las malformaciones confinadas a uno o a muy pocas aberraciones cromosómicas son sospechosas para delección de un solo gen, mientras que las malformaciones frecuentemente en aberraciones cromosómicas son causadas por deficiencia de un paso en la organogénesis.

Microtia es un hallazgo clínico en muchas bien establecidos enfermedades humanas de un solo gen. Por ejemplo mutaciones en *SIX1* y *EYA1* causa el síndrome Braquio-ótico, mientras que mutaciones en *SIX5* y *EYA1* pueden causar Síndrome Braquio-oto-renal, ambos están asociados con microtia, además de otros defectos craneofaciales. Otros casos familiares con microtia sindrómica también han sido reportados

Síndrome	Microtia (%)	Genes identificados
Bixler (Hendiduras-microtia-hipertelorismo)	100	--
Bosley-Salih-Aloirany	33	<i>HOXA1</i>
Branquiooculofacial (BOF)	20	<i>TFAP2A</i>
Branquiotico	80-90	<i>EYA1, SIX1</i>
Branquiotorenal	30-60	<i>EYA1, SIX5</i>
CHARGE	Reportada	<i>CHD7, SEMA3E</i>
Hipoacusia congénita, agenesia de oído interno, microtia, microdontia	100	<i>FGF3^(b)</i>
Microsomia craneofacial	65	--
Fraser	Reportada	<i>FRAS1, FREM2</i>
Kabuki	80	<i>MLL2</i>
Klippel-Feil	Reportada	<i>GFD6</i>
Lacrimoauriculodigital	20	<i>FGFR2, FGFR3, FGF10</i>
Disostosis mandibulofacial	100	<i>HOXD</i>

Meier Gorlin (oído-patela-talla baja)	100	<i>ORC1, ORC4, ORC6, CDT1, CDC6</i>
Microtia- hipoacusia y paladar hendido	100	<i>HOXA2</i>
Miller	100	<i>DHODH</i>
Nager	80	--
Oculo-auricular	100	<i>HMX1</i>
Pallister Hall	Reportada	<i>GLI3</i>
Townes Brocks	20	<i>SALL1</i>
Treacher Collins	60-80	<i>TCOF1</i>
Willdervanck (Cervicooculoacustico)	Reportada	--

^(b)Hemicigoto: solo en alteraciones de oído interno

Pocos estudios se han enfocado en las causas genéticas de la microtia aislada, Análisis de secuenciación de GSC en 121 individuos con microtia aislada revelo un mutación de sentido equivocado en el exón 3 en dos casos. En el mismo estudio, el tamizaje de *BMP5* revelo una mutación de sentido equivocado en cuatro pacientes. Ninguna de estas mutaciones fueron detectadas en sujetos control, sugiriendo un papel en la etiología. Individuos con datos clínicos incompletos, cantidad de sangre inadecuada o análisis genético no satisfactorio fueron excluidos, además de que el número total de casos y controles no es claro.

Monks y cols no identificaron mutaciones en los exones de *HOXA2* y *SIX2*, los cuales actúan corriente abajo de *HOXA2* durante el desarrollo, en 12 pacientes de descendencia hispánica y africana con microtia aislada. En otro estudio, el estado de metilación del promotor del gen *EYA1* fue analizado en 64 individuos con microtia y 36 controles sanos. Los autores reportaron que los niveles de metilación en este locus eran significativamente más bajo en individuos con microtia que en los controles, sugiriendo que la hipometilación podría estar relacionada con la

patogénesis de esta condición (Lin y cols 2009). Se necesitan futuros estudios para validar estas conclusiones.

En resumen aunque algunos estudios han encontrado variantes genéticas potencialmente asociadas con microtia, no se ha identificado mutación genética causal hasta la fecha.

HIPÓTESIS ACTUALES PARA LA ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS

La microtia es etiológica y patogénicamente heterogénea. Mutaciones de un solo gen están asociadas con microtia en casos sindrómicos y familiares, mientras que una causa poligénica o multifactorial (genética y ambiente) es probable en casos esporádicos. Hipótesis actuales a favor de una alteración de las células de la cresta neural (CCN) es probablemente la causa subyacente, aunque el mecanismo exacto permanece sin conocerse. Aunque debido a la heterogeneidad clínica, es posible que diferentes procesos patogénicos ocasionen los diferentes tipos de microtia. Se discuten algunas hipótesis:

ALTERACIONES EN LAS CÉLULAS DE LA CRESTA NEURAL

Defectos en la función de las CCN han sido asociadas con numerosos síndromes craneofaciales (Passos-Bueno y cols 2009). En el síndrome de Treacher Collins, mutaciones en *TCOF1* ocasionan haploinsuficiencia de la proteína Treacle (codificada por *TCOF1*) disminuyendo la génesis de ribosomas, la proliferación celular e incrementando la apoptosis neuroepitelial. El mecanismo propuesto es que esto ocasiona disminución de los precursores de las CCN con reducción del número de células migrantes del primero y del segundo arcos faríngeos ocasionado el fenotipo craneofacial completo observado en el síndrome que incluye microtia bilateral severa.

Fuerte evidencia del papel de las CCN en la ocurrencia de microtia deriva también

de estudios recientes de varios teratógenos con mecanismos causales de esta condición. Retinoides y embriopatía diabética han sido asociados con apoptosis de las CCN antes de su migración a los arcos faríngeos y alteraciones en la diferenciación de las CCN después de arribar a los arcos faríngeos. En diabetes, la hiperglicemia ha sido recientemente asociada con regulación a la baja de *Pax3*, el cual codifica un factor de transcripción crítico para la sobrevivencia temprana y migración de las CCN. Contrariamente la exposición a retinoide parece alterar la vía de señalización de la endotelina, la cual a su vez regula la expresión de genes *Hox*. Se ha hipotetizado que los genes *Hox* dirigen la identidad posicional de las CCN antes y durante la migración desde los pliegues neurales. Mallo (2003.) sugirió que las formas más severas de microtia son resultado de la pérdida de la identidad del segundo arco, ya que la mayoría de la oreja definitiva deriva de los montículos de este arco. Esta conclusión se apoya en el fenotipo observado en el ratón mutante *Hoxa2*. Los efectos de la talidomida pueden incluirse en la regulación a la baja de *Fgf8* (Hansen y cols 2002) y la señalización de *Bmp* (Ito y cols 2010), a través de efectos anti angiogénicos directos y estrés oxidativo, que también son postulados como mecanismos independientes (Ito y cols 2010).

Desde una perspectiva embriología y de biología del desarrollo, defectos o daños que afectan la delaminación de las CCN, proliferación, apoptosis o migración, o sus respectivas interacciones con el mesodermo, endodermo o las explicaciones subyacentes para la alteración en el crecimiento de los montículos auriculares, el reposicionamiento o el desarrollo del cartílago visto en pacientes con varias formas de microtia. Con base en esto investigaciones sobre la patogénesis del síndrome de delección 22q11.2 inicialmente se enfocaron en las alteraciones intrínsecas de las CCN. *TBX1* es un gen localizado en la región típica deletada en esta condición y es considerado un gen candidato para muchas malformaciones de este síndrome. *TBX1* codifica para un factor de transcripción, que presumiblemente afecta la expresión de moléculas de superficie celular; aunque *TBX1* parece no estar expresado por las CCN, pero son expresadas en todo el mesénquima de la cresta no faríngea y en regiones del endodermo faríngeo.

Individuos con Síndrome de delección 22q11.1 frecuentemente tienen orejas pequeñas y hay reporte de algunos con microtia (Digilio y cols 2009). Por lo tanto una interacción indirecta entre el mesodermo de la cresta o endodermo y la cresta neural pueden alterar el destino de las CCN y ocasionar malformaciones craneofaciales que pueden incluir microtia¹⁰.

MANIFESTACIÓN CLÍNICA GENERAL DEL ESPECTRO FAV

Aunque no hay criterios mínimos diagnósticos, el fenotipo facial es característico, cuando las manifestaciones suficientes están presentes. En algunos casos, la microtia ipsilateral o las alteraciones auriculares o preauriculares pueden ser la manifestación más leve. A continuación se presentan las manifestaciones asociadas:

MALFORMACIONES DEL PABELLÓN AURICULAR Y AUDICIÓN

Van desde la anotia (ausencia) pasando por una masa de tejido desplazada anterior e inferiormente a un pabellones levemente dismorfo, los apéndices preauriculares de piel y cartílago son extremadamente comunes y pueden ser uni o bilaterales, se localizan desde el trago hasta la comisura labial. Hipoacusia conductiva 75%, neurosensorial 10%, y mixta en el 10%. La etiología de la hipoacusia es diversa e incluye malformaciones del oído medio y externo, hipoplasia o agenesia de la cadena osicular, trayecto del nervio facial aberrante, malformaciones de la tuba de Eustaquio y de la base del cráneo. Paciente con hipoacusia unilateral tienen alto riesgo para presentar problemas en la escuela, el 25% de los niños con hipoacusia unilateral repiten uno o más años, especialmente si es severo o profunda y del lado derecho

CRECIMIENTO Y DESARROLLO

Déficit intelectual 5-15%, retraso mental es más frecuente con microtia bilateral, malformaciones encefálicas y microftalmía. Problemas del lenguaje debido a malformaciones faríngeas y laríngeas, asimetría del paladar blando, mal oclusión,

riesgo para problemas psicosociales y autoestima baja (Padwa, 1991), el desorden del espectro autista parece ser frecuente.

CRANEOFACIAL

Incluye cráneo bífido, microcefalia, dolicocefalia y plagiocefalia. Leve asimetría facial es evidente en el 65%, y asimetría marcada en aproximadamente el 20% de los casos. Del 10-20 % tienen afección bilateral. Por razones desconocidas el lado derecho es más severamente afectado que el lado izquierdo. La rama mandibular y el cóndilo pueden ser aplásicos o hipoplásicos. Hipoplasia se encuentra asociada con macrostomia leve y es más frecuente de lado derecho. Labio hendido/ paladar hendido uni o bilateral ocurre del 7-15%, macrostomia (hendidura facial lateral) está presente en al menos el 30% en algún grado, la maloclusión dental es extremadamente frecuente

MALFORMACIONES OCULARES

En el 72%: dermoides epibulbares, microftalmos, coloboma del iris, coloboma del párpado superior, estrabismo, anoftalmia y proptosis, la más frecuente es el dermoide epibulbar 35%

NEUROLÓGICO

Debilidad del nervio facial 20%, probablemente relacionada con malformación del canal facial

CARDIOVASCULAR

Las malformaciones cardiovasculares están presentes en aproximadamente el 35%, los defectos ventriculoseptales y la Tetralogía de Fallot abarca el 50% de los defectos estructurales, no hay una lesión cardíaca característica

MUSCULOESQUELÉTICO

Fusiones de las vértebras cervicales en el 20-35%, la platibasia y la occipitalización del atlas se han encontrado con la misma frecuencia, aunque una

amplia variedad de malformaciones vertebrales han sido reportadas: inestabilidad de C1–C2, espina bífida, hemivértebra, vértebras en mariposa, fusionadas o hipoplásicas, anomalía de Klippel Feil, escoliosis, arcos costales malformados, colectivamente presentes en aproximadamente el 30%. Pie equino varo aducto congénito en el 20%, malformaciones radiales como hipoplasia, aplasia, pulgar bífido o digitalizado se encuentran en aprox. 10%. (Figueroa y Friede, 1985)

MALFORMACIONES RENALES

Son frecuentes en el 18% de los casos e incluyen agenesia renal, doble uretero, ectopia renal, malformaciones renovasculares, hidronefrosis e hidroureter.

MALFORMACIONES PULMONARES

Desde lobulación incompleta a la hipoplasia o agenesia 5%²⁹

II. JUSTIFICACION

En el Espectro facio auriculo vertebral en México se ha reportado una incidencia de 1/5000 recién nacidos vivos y es más frecuente en hombres en una relación 2:1, es una entidad discapacitante y una de las principales causas de consulta en el INR. Son pocas las publicaciones que revisan las características fenotípicas y etiológicas del espectro en México.

Al ser el Instituto Nacional de Rehabilitación un centro nacional de referencia para problemas auditivos, se concentra gran cantidad de pacientes con microtia, por lo que es importante analizar las características de nuestros pacientes, además de describir los factores etiológicos más importantes (ya que cuenta con heterogeneidad genética) que se han relacionado. Del 1 de enero de 2008 hasta el 30 de junio de 2011 en el instituto han sido registrados 1043 casos nuevos. El gen *HOXA2* es un factor de transcripción normalmente expresado en todo el mesénquima del segundo arco branquial, las formas más severas de microtia son resultado de la pérdida de la identidad del segundo arco, ya que la mayoría de la

oreja definitiva deriva de los montículos de este arco este es un gen candidato que se necesita seguir estudiando para poder dilucidar las causas del espectro.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Espectro Facio Auriculo Vertebral es una alteración relativamente frecuente, la cual presenta gran heterogeneidad clínica y probablemente también genética y en México ha sido poco estudiada. Es necesario realizar estudios con genes candidatos involucrados en la formación de la oreja para confirmar o descartar su relación con el EFAV

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe alguna mutación en el gen candidato *HOXA2* que sea la causa del Espectro facio-auriculo-vertebral en los casos familiares del Instituto Nacional de Rehabilitación?

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar estudio molecular al gen candidato *HOXA2* en un grupo de pacientes de casos familiares del EFAV del INR

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Buscar mutaciones en *HOXA2* que puedan estar relacionadas como causa del EFAV en nuestra población.
- Determinar si existe alguna correlación genotipo-fenotipo en la muestra

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Describir las características clínicas de los casos familiares con Espectro FAV
- Analizar la lateralidad y grado de microtia
- Determinar la edad y sexo de los pacientes afectados
- Búsqueda de AHF relacionados con el Espectro FAV
- Malformaciones más frecuentes asociadas a la microtia como malformación eje del espectro
- Descripción de antecedentes perinatales y/o medioambientales

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el año 2015 acudieron a consulta de Genética 78 pacientes con diagnóstico de Espectro facio-auriculo-vertebral, de los cuales 21 fueron casos familiares. Solo se pudieron reclutar 6 familias (el paciente, sus padres y algunos familiares afectados). Todos firmaron el consentimiento informado correspondiente, se tomó muestra de sangre periférica para la extracción de DNA para realizar la amplificación del gen candidato *HOXA2*.

VII. DISEÑO

Se realizó un estudio prospectivo, transversal y descriptivo

VIII. POBLACIÓN

Pacientes incidentes y prevalentes del Instituto Nacional de Rehabilitación del año 2015

IX. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Pacientes con diagnóstico de Espectro FAV familiar, realizado por el

servicio de genética.

2. De cualquier sexo
3. De cualquier edad
4. Que ya sea ellos o sus padres en el caso de menores deseen participar y firmen la carta de consentimiento informado. En caso de menores pero con edad suficiente para leer y entender la carta se les presentará carta de asentimiento informado
5. Que tanto el caso índice como sus padres aceptaran que se les realizara el estudio
6. Que los casos índices contaran con TAC de oídos, ultrasonido renal y radiografías de columna vertebral.

X. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes en los que el diagnóstico corresponda a otro síndrome genético en el que características similares al Espectro FAV sean parte del mismo

XI. PROCEDIMIENTO

Se revisaron 21 expedientes de los casos familiares del servicio de genética con diagnóstico de microtia

Se logró contactar y reclutar a 6 familias que cumplían los criterios de inclusión y exclusión. Se obtuvieron los siguientes datos asentados en la hoja de recolección:

- Nombre
- Consanguinidad
- Endogamia
- Sexo
- Edad actual
- Fecha de nacimiento

- Lugar de nacimiento
- Expediente
- Registro interno para la muestra de DNA
- Nombre de la madre
 - Edad de la madre al nacimiento del caso índice
 - Registro interno para la muestra de DNA
- Nombre del padre
 - Edad del padre al nacimiento del caso índice
 - Registro interno para la muestra DNA
- Consanguinidad
- Antecedentes familiares y árbol genealógico
- Antecedentes perinatales
 - Exposición a teratógenos (primer trimestre del embarazo)
- Cuadro clínico y estudios (caso índice)
- Clasificación de la microtia
 - Grado de microtia
 - Lateralidad
 - Longitud de los pabellones auriculares
 - Características del conducto auditivo externo
- TAC de oído
- Audición
 - Audiometría
- Malformaciones asociadas
- Fotografías anteroposterior de cara y lateral de pabellón auricular derecho e izquierdo

Se vaciaron los datos en una base

Se procedió a realizar la genotipificación de *HOXA2*:

1. Se realizó la toma de muestra de sangre periférica con previa autorización

y firma de consentimiento informado del paciente y sus padres.

2. Se realizó la PCR y secuenciación automatizada de los dos exones y de las regiones unión exón-intrón del gen *HOXA2* para determinar la presencia o no de variantes patogénicas en estado homocigoto o heterocigoto en los casos índice:

Condiciones de la PCR (por reacción o rxn) :

Oligos [10 pmol/ul]

Ex1 (M13F-F/R): 5 ul o 50 pmol/rxn Ex2 (M13F-F/R): 5 ul o 50 pmol/rxn

Reactivos comunes a ambas reacciones:

dNTPS X Fra (10 mM, 25% deaza-dGTP)

Buffer PCR

MgCl₂ [25 mM]

PCR Enh Solution Invitrogen [10X]

Taq Polimerasa [5UI/ul]

DNA genómico (dil. con H₂Odd 1:5, ~100 ng)

H₂Odd (cbp 30 ul/rxn)

Programa PCR común a ambos exones:

94° C 5 min.

4° C 40 seg. ▷

63-59° C (dism. 1° C /ciclo) 50 seg. 5 ciclos

68° C 1 min

94° C 40 seg. ▷

58° C 50 seg. 30 ciclos

68° C 1 min 30 seg.

72° C 10 min

4° C indef.

3. En caso de que al caso índice se le encontrara alguna variante o mutación

se extendería el estudio clínico, paraclínico y molecular a los padres.

SECUENCIACIÓN

1. Los productos fueron analizados mediante un protocolo de electroforesis específico de secuenciación en un secuenciador automático Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer.
2. Se comparó la secuencia del gen en la base de datos de GeneBank (NG_012078.1 RefSeqGene, NM_006735.3). Para determinar si había cambios descritos previamente como variantes o mutaciones, se analizarían en las bases de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), ExAC y Human Mutation Database, así como la evidencia en la literatura.
4. Si se encontraban variantes no descritas se realizaría un análisis in silico usando los programas PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) y SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html), para predecir si las variantes encontradas eran patogénicas o no.
5. Y se buscarían de manera dirigida en 100 controles sanos étnicamente relacionados y anónimos cuyas muestras de DNA se encontrarán bajo el resguardo del laboratorio.

XII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En caso de encontrar variantes o mutaciones en *HOXA2* se haría un análisis descriptivo de sus frecuencias y se compararía con las descritas en la literatura.

XIII. RESULTADOS

DATOS DEMOGRÁFICOS

Origen: tenemos reclutadas un total de 6 familias de las cuales hasta el momento contamos con 11 individuos que cumplen los criterios de inclusión. De estos el 63.6 % son originarios del Estado de México y el resto de la Ciudad de México.

Edad: se observó un promedio de 16.7 años, con un rango de 2 a 48 años de edad, con una moda de 4 años (18.18%), el segundo grupo de edad con mayor número de pacientes fue el de 2 años (18.18%). La mayoría de nuestra población es infantil (menores de 18 años) y sólo 4 adultos.

Sexo: se observó mayor frecuencia del sexo femenino con el 72.72% comparado con el sexo masculino que obtuvo 27.27%

Endogamia: ninguno de los pacientes ha referido endogamia positiva. Está se consideró para el presente estudio como poblaciones de menos de 5000 habitantes

Consanguinidad: tampoco fue referida

ANTECEDENTES PRENATALES

Se tomaron en cuenta los antecedentes interrogados en la historia clínica de genética y reinterrogados como parte de la hoja de captación del estudio clasificándolas dentro de 7 grupos:

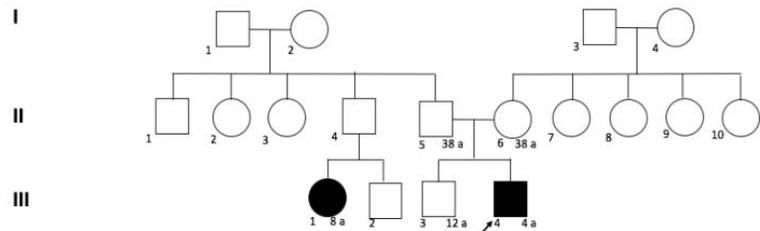
1. Sin antecedentes perinatales de importancia: 5 pacientes (29.4%)

2. Toma de medicamentos durante el embarazo: 1 tomó nitrofurantoina para tratamiento de IVU (5.8%), y otra mamá que tomó medicamento para hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia no especificado durante el primer mes de embarazo (5.8%)
3. Infección de vías aéreas superiores: 2 pacientes (11.7%)
4. Infección de vías urinarias y/o vaginales: 1 paciente (5.8%)
5. Amenaza de aborto. Encontramos 1 paciente con amenaza de aborto (5.8%) y 2 con amenaza de parto prematuro también aislados (11.7%)
6. Enfermedades maternas. no encontramos antecedente de epilepsia, diabetes tipo II, preeclampsia, alcoholismo o edad materna avanzada.
7. Otras. 1 presentó oligohidramnios (5.8%), se encontró 2 con edad paterna avanzada al momento de la concepción (11.7%). Factores prenatales adversos: 1 con sufrimiento fetal agudo 5.8%)

ANTECEDENTES FAMILIARES DE MICROTIA

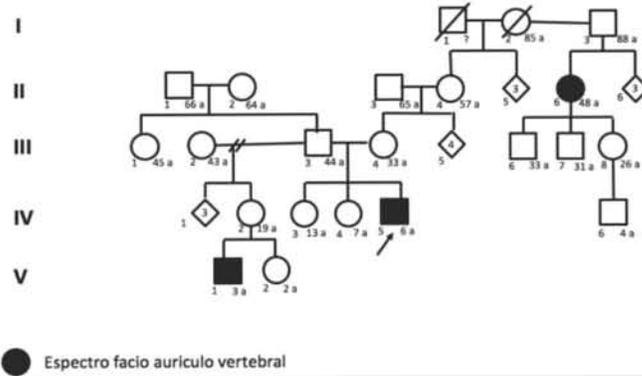
A continuación se describen los árboles genealógicos de las familias estudiadas

Familia 1

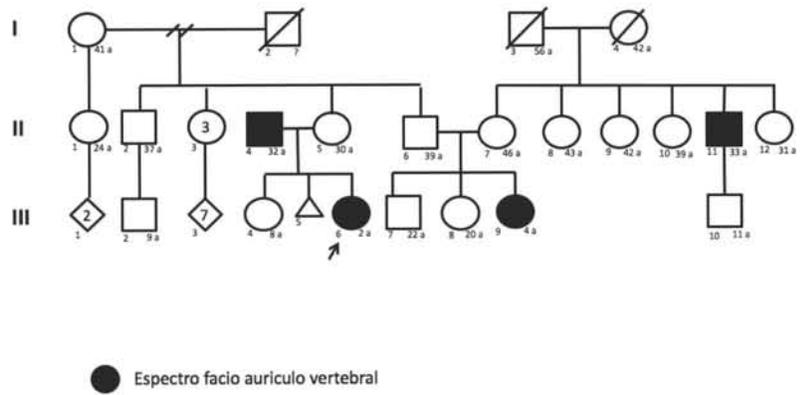


● Espectro facio auriculo vertebral

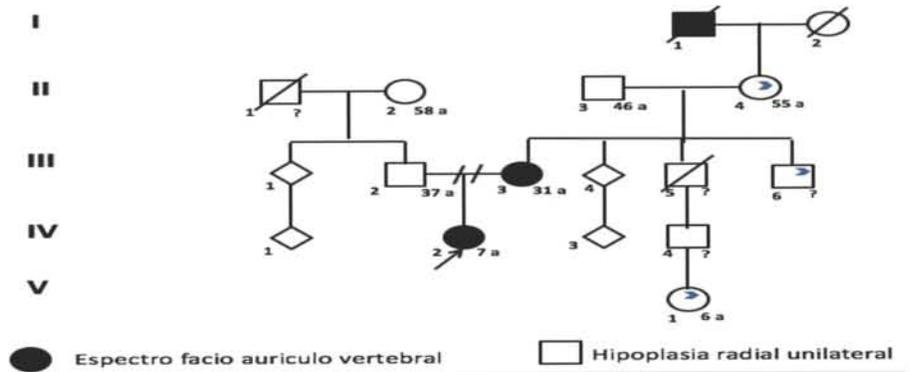
Familia 2



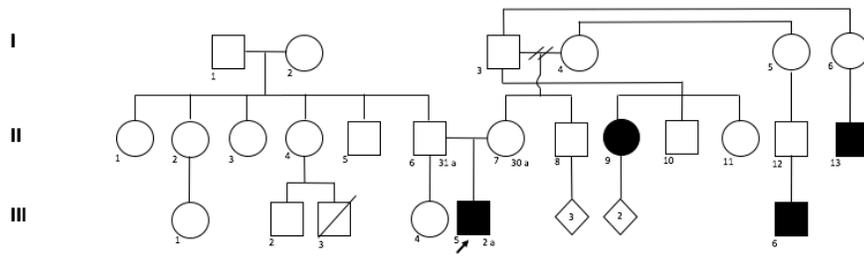
Familia 3



Familia 4

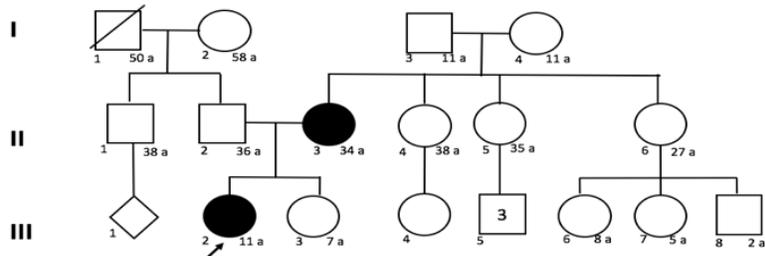


Familia 5



● Espectro facio auriculo vertebral

Familia 6



● Espectro facio auriculo vertebral

De los casos familiares se analizó el grado de parentesco de los familiares afectados y el número de familiares, donde se encontró que tenemos un total de 6 casos índice, de un total de 18 afectados, familiares de primer grado se encontraron 3 (25%), de segundo grado 2 (16%), y de tercero 6 (50%)

MICROTIA

Lateralidad: el 100% de los pacientes presentaron microtia unilareral, 10 derechas y 1 izquierda.

Grado de microtia: 4 pacientes con microtia atresia grado III derecha (36.3%), 3 pacientes con microtia atresia grado II derecha (27.2%), 2 pacientes con reconstrucción y atresia (18.1%), 1 paciente con microtia grado II con estenosis del CAE izquierda (9%), y 1 paciente con apéndices (9%)

MALFORMACIONES ASOCIADAS

Se clasificaron a los pacientes con respecto a si la microtia es aislada o está asociada a otras malformaciones. De los primeros se contabilizó a 9 pacientes (81.8%) y de los segundos a 2 pacientes (18.18%). Las malformaciones asociadas fue en una paciente se encontró un dermoide epibulbar en ojo izquierdo y en otro paciente la ausencia de una costilla flotante.

Manifestaciones Faciales: microsomía hemifacial se encontró en 4 pacientes, no se encontraron defectos de paladar

Malformaciones de oído detectadas por TAC: en 6 pacientes se encontró alteraciones del oído medio que incluyen atresia ósea completa y displasia de la cadena osicular derecha, en una paciente se encontró malformación de oído interno (dilatación del vestíbulo y agenesia del canal semicircular derechos) en 3 pacientes se encontró trayecto aberrante del nervio facial derecho y en una paciente se encontró displasia de cadena osicular bilateral aun cuando la microtia es unilateral derecha.

Audición: para el oído afectado se encontró que el 100% de los pacientes presentaban hipoacusia conductiva del lado afectado

VARIABLES DE LOS CASOS ÍNDICES

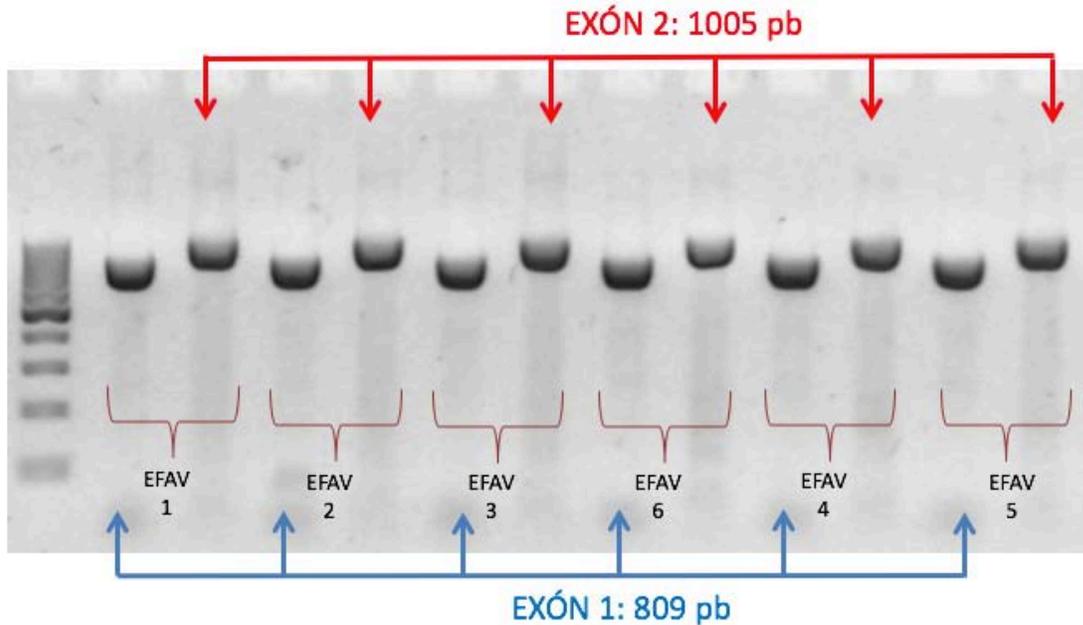
<i>Familia</i>	Caso índice		Sexo	Edad	Microtia	Lateralidad	Apéndices preauriculares	Malformaciones asociadas	Hipoacusia	TAC
1	III.4		M	4	Microtia grado II con estenosis del CAE	Izquierda	No	Ninguna	Hipoacusia conductiva izquierda	No se realizó
2	IV.5		M	6	Microtia atresia grado II	Derecha	No	Ninguna	Hipoacusia conductiva derecha	Atresia ósea completa derecha con displasia de cadena osicular y trayecto aberrante del nervio facial
3	III.6		F	2	Microtia atresia grado II	Derecha	No	Ninguna	Hipoacusia conductiva derecha	Atresia del CAE, con dilatación del vestibulo y agenesia del canal semicircular lateral
4	IV.2		F	7	Microtia atresia grado III	Derecha	No	Ausencia de costilla flotante derecha	Hipoacusia conductiva derecha	Atresia ósea completa con displasia de cadena osicular y trayecto aberrante del nervio facial de forma bilateral
5	III.5		M	2	Microtia atresia grado III	Derecha	No	Microsomia hemifacial	Hipoacusia conductiva derecha	Atresia ósea completa derecha con aplasia de martillo y luxación yunque-estribo, trayecto aberrante del nervio facial a considerar hipoplasia o agenesia
6	III.2		F	14	Microtia atresia grado II	Derecha	No	Microsomia hemifacial	Hipoacusia conductiva derecha	Atresia del conducto auditivo externo derecho, mastoiditis crónica

CARACTERÍSTICAS DE LAS FAMILIAS

Familia	Caso	Parentesco	Sexo	Edad en años	Malformación auricular	Malformaciones asociadas (sin estudios paraclínicos)
1	III.1	Prima paterna	F	8	Desconocido	
2	II.6	Tía abuela materna	F	48	Microtia atresia grado III derecha	
	V.1	Sobrino paterno en II grado	M	3	Apéndices preauriculares	
3	II.4	Padre	M	32	Reconstrucción con atresia derecha	
	III.9	Prima paterna	F	4	Microtia atresia grado III derecha	Microsomia hemifacial
	II.11	Tío materno	M	33	Desconocido	
4	III.3	Mamá	F	31	Dos apéndices preauriculares derechos	Dermoide epibulbar
	I.1	Bisabuelo materno	M	Finado	Apéndice	
5	II.9	Tía materna en II grado	F		Desconocido	
	III.6	Primo materno en III grado	M		Desconocido	
	II.13	Tío materno en III grado	M		Desconocido	
6	II.3	Mamá	F	34	Reconstrucción con atresia derecha	Microsomia hemifacial

GENOTIPIFICACIÓN

Amplificación de *HOXA2*:



7 ul PCR/agarosa 2%, BrEt

Resultados de la secuenciación:

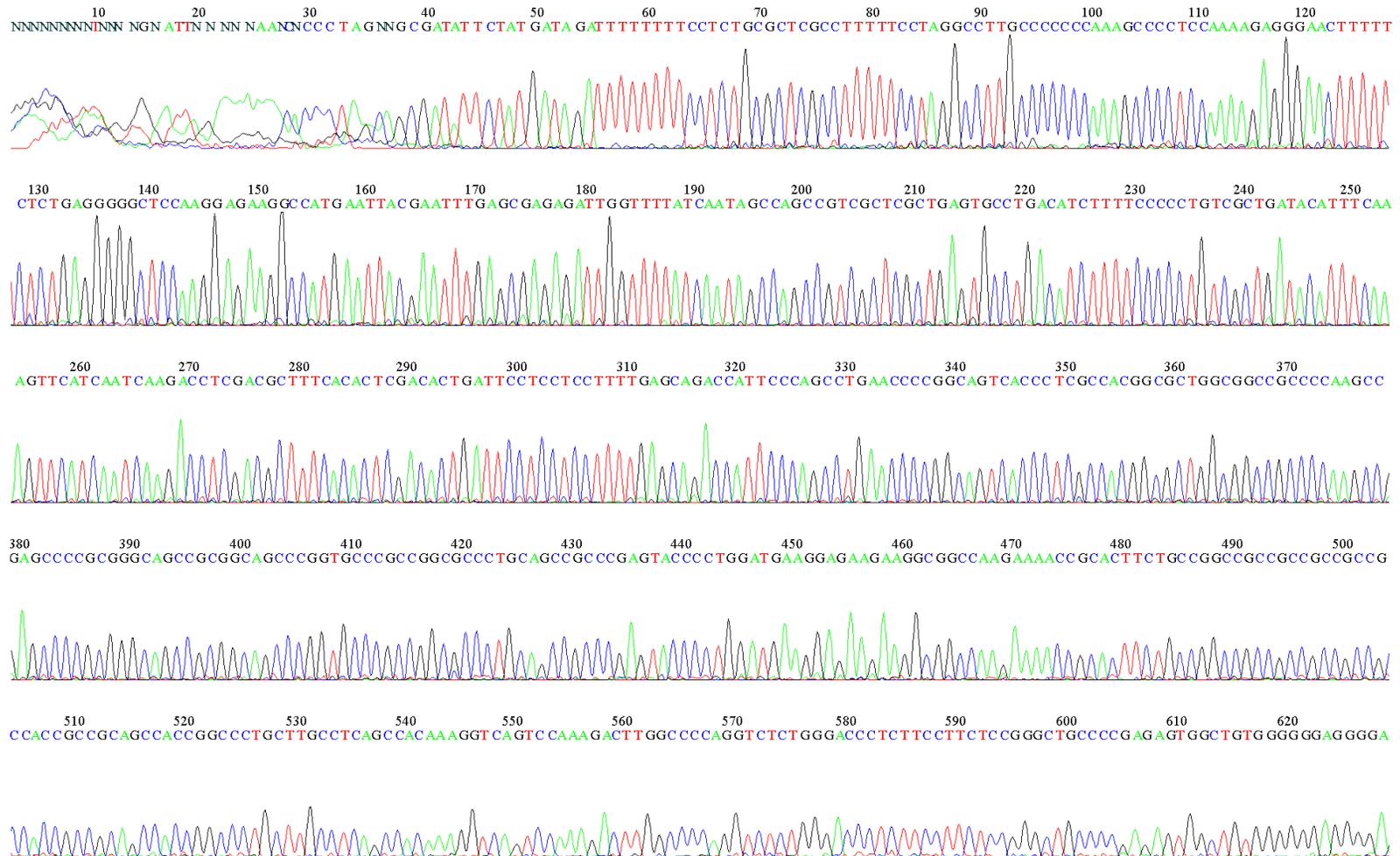
No se encontraron mutaciones ni variantes en el gen *HOXA2*

Caso índice	<i>HOXA2</i> - EX1:NM_006735.3:EX1 c.1-c.391 más bordes 5' UTR y exón-intrón (10 pb)	<i>HOXA2</i> -EX2: NM_006735.3:EX2 c.392- c.1131 más bordes exón intrón y 3' UTR (10 pb)
EFAV-1	NL	NL
EFAV-2	NL	NL
EFAV-3	NL	NL
EFAV-4	NL	NL
EFAV-5	NL	NL
EFAV-6	NL	NL

NL=normal

Secuenciación del exón 1 de *HOXA2* del caso índice de la familia 1

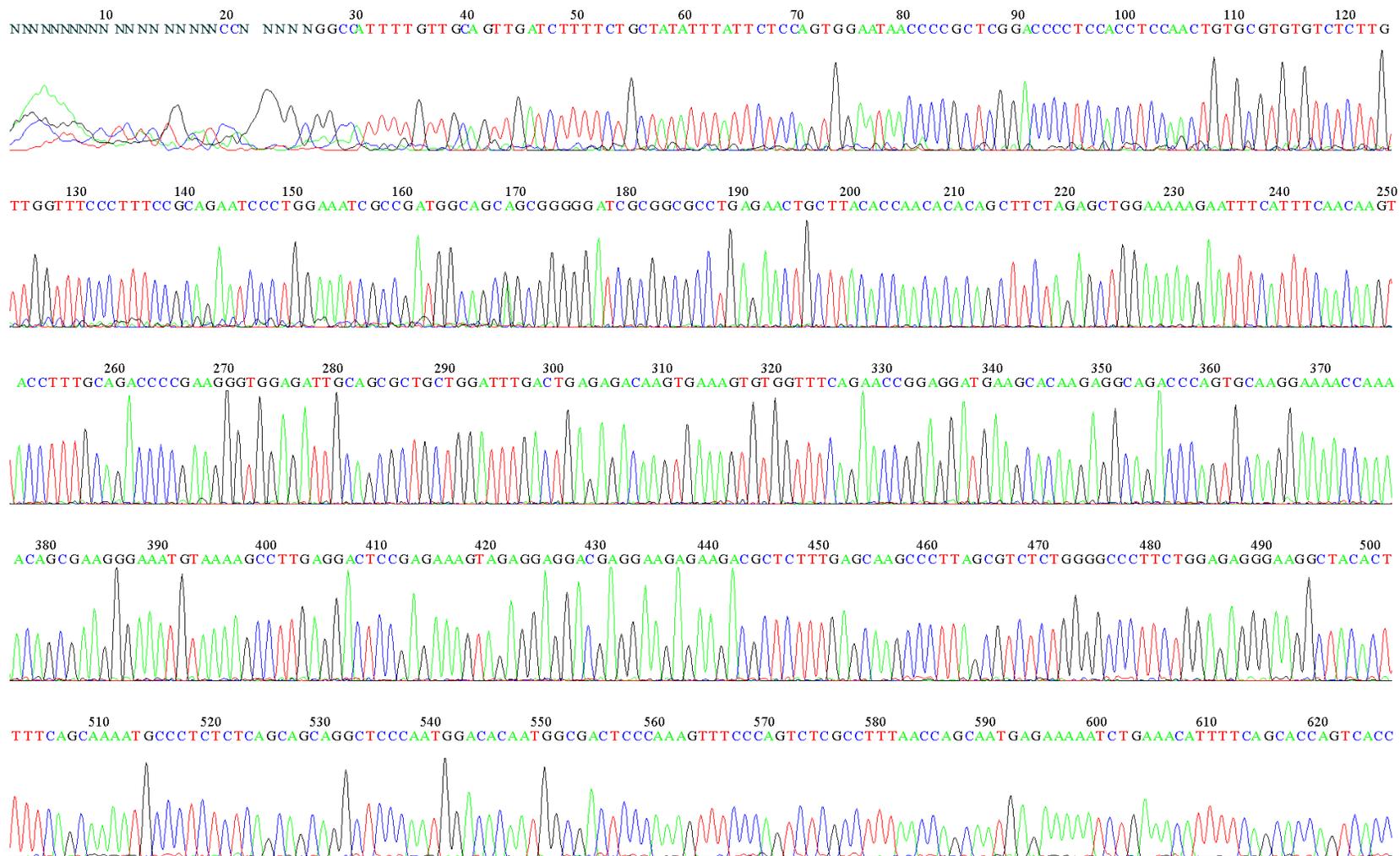
File: st1_HE1-1_M13F.ab1 Run Ended: 2016/3/15 23:19:38 Signal G:113 A:122 C:176 T:151
Sample: st1_HE1-1_M13F Lane: 36 Base spacing: 15.108477 766 bases in 16605 scans Page 1 of 2



Secuenciación del exón 2 del gen *HOXA2* del caso índice de la familia 1



File: st10_HE2-2_M13F.ab1 Run Ended: 2016/3/15 23:19:38 Signal G:303 A:388 C:405 T:397
Sample: st10_HE2-2_M13F Lane: 51 Base spacing: 15.259357 1001 bases in 16608 scans Page 1 of 2



XIV. DISCUSIÓN

El espectro Facio Auriculo Vertebral se caracteriza por microtia como eje principal, apéndices preauriculares, microsomía hemifacial, alteraciones oculares y vertebrales. La mayoría de los casos reportados son esporádicos, encontramos antecedentes familiares de microtia en el 26.9 % de nuestra muestra, como fue previamente informado en México por Muñoz y cols (2013)¹ con casi el 25% de los casos y por Llano-Rivas y cols (INP)¹³ con el 34% (1999), datos que son muy diferentes a los informados en otras poblaciones; en Japón 2.5 a 3.5%, en Alemania 9.4%, en el estado de Massachusetts 9.4%, en China 9.85³⁴, así como en otras publicaciones internacionales donde el rango de antecedentes familiares varía entre el 3 y el 15%³⁵ solo en Finlandia se encontró una frecuencia del 20%³⁶, lo que puede sugerir una particularidad de la población mexicana, que puede orientarnos entre otras situaciones, a pensar como probable tipo de herencia la autosómica dominante con penetrancia reducida.

Se estudiaron 6 casos familiares con un total de 11 individuos afectados, la mayoría de nuestros casos son originarios del Estado de México y de la Ciudad de México, por tener fácil acceso geográfico. La edad promedio fue de 16.7 años y la moda de 4, sospechamos que es debido a que el INR es un hospital de referencia para hipoacusia, misma que debe ser tratada a corta edad.

En nuestra población el sexo que predominó fue el femenino, (relación 2.5 a 1), en el estudio mexicano de Muñoz y cols también se encontró que la mayoría de los afectados eran mujeres, a diferencia de lo descrito en la mayoría de las poblaciones, en las que predomina el sexo masculino (3:2), e incluso en el estudio del INP se reportaron mayor número de hombres afectados (relación hombre:mujer 1.5:1)^{15,37,38}. Observamos que no hubo el antecedente de endogamia y consanguinidad, en el estudio de Muñoz y cols se encontró endogamia positiva en 14/149 pacientes y consanguinidad en un solo caso.

Llano-Rivas y cols reportaron que el 27.7% de sus casos presentaban características de patrones de herencia autosómica dominante y autosómica recesiva en el 5.5%, similar a lo que encontramos en nuestra muestra. No parece a lo que ha sido descrito por otros autores, en los que el patrón de herencia más frecuente parece corresponder más a herencia recesiva^{39,40}, sin embargo no descartamos otras posibilidades hereditarias, es muy probable que en el EFAV exista heterogeneidad genética, como ya ha sido propuesto por varios autores^{4,41,42}.

Kaye et al reportó como muy probable el que sus pacientes (familias de 74 probandos) presentaran EFAV secundario a la herencia autosómica dominante. En 1963 Saraux y cols describió un caso similar. Tres años más tarde la misma condición fue reportada en un hijo y una hija de padres consanguíneos, donde el padre también estaba afectado. Recientemente Tasse y cols describieron la transmisión del EFAV de una madre a su hija, similar a nuestras familias números 3, 4 y 6⁴².

Por otro lado Ellwod y cols reportaron el modo de herencia autosómica recesiva en una familia de Arabia presentándose con anotia bilateral y atresia del CAE y en una familia judía que presentó microtia unilateral y atresia del CAE⁴³, al igual que Strisciuglio y cols, en una familia con una amplia variabilidad de expresión; esta familia tenía dos hermanos con microtia unilateral derecha y atresia del CAE bilateral, la hermana presentó apéndice preauricular izquierdo con ausencia de otras alteraciones, la ausencia de anomalías en los oídos de los padres sugirió herencia autosómica recesiva⁴⁴

Por otra parte el 100% de los pacientes estudiados en el INR, presentaron microtia unilateral y el tipo de microtia más frecuentemente encontrado fue la microtia atresia grado III derecha (36.3%), dato similar que fue por primera vez reportado en pacientes mexicanos por Muñoz P y col¹. En cuanto a la lateralidad, Muñoz y cols encontraron que la microtia fue unilateral en el 65.7% y de estos el lado

derecho (76/98) fue el más frecuentemente encontrado, en el estudio del INP¹³ fue microtia unilateral en el 75% de los casos , y el lado derecho fue el mas frecuentemente afectado en el 69%, Okajima H y cols, también encontraron que el 64% presentaba la afección del lado derecho⁴⁵, en nuestro estudio fue del 90%. Aunque Tasse y cols 2007 hacen hincapié que en familias con herencia autosómica dominante muestran alta frecuencia de involucro bilateral y la afección unilateral es el indicador más preciso de enfermedad esporádica (valor predictivo negativo 73%)⁴⁶.

Algunos factores prenatales han sido implicados como factores de riesgo, en nuestro estudio se destacó que el 29.4% no tenían antecedentes perinatales de importancia, seguido por la amenaza de aborto y parto prematuro, que se presentó en el 17.5%; antecedente que ha sido referido en otras publicaciones (Muñoz y col 19.6%)¹

Wu y cols mencionan que encontraron microtia aislada en el 56.2% y en el 43.48% asociada a otras malformaciones³⁶. Muñoz P y col encontraron microtia aislada en el 61.74% y aquellos con malformaciones asociadas 38.25% , en los casos del INP se encontró microtia aislada en el 60%, en nuestro estudio de casos familiares encontramos microtia aislada en el 81.8% y asociada en el 18.8%¹

La única manifestación asociada fue en una paciente que presentó un dermoide epibulbar que es similar a lo reportado por Muñoz y col donde la encontraron en el 14.7% de los casos, el INP no lo reporto , resultados que no coincide con la alta frecuencia de este hallazgo a nivel mundial de hasta el 72% que fue reportado por Strömmland en el 2007 que está en relación con lo encontrado por Tasse y cols en el 2005 donde los dermoides también fueron los hallazgos oculares más frecuentes, otro dato que quizás sea propio de nuestra población^{47,48}.

La hipoacusia conductiva se ha reportado en la literatura con frecuencia alrededor del 50% en casos esporádicos¹, en el INP 123/145 pacientes se reporto

hipoacusia conductiva¹³ y hasta del 75% por Carvalho y cols en 1999⁴⁹, en nuestro estudio correspondió con el 100% de los casos.

La frecuencia promedio de microsomía hemifacial una de las manifestaciones mas frecuentemente encontradas se ha reportado en promedio en el 83% de los casos esporádicos, Beleza y cols en el 2015 la reportaron en el 90% de sus pacientes, en el estudio del INP la encontraron en el 55.1%, nosotros la encontramos menos frecuentemente con el 36%⁵⁰.

La literatura informa que la mayoría de los pacientes con microtia tienen el oído interno normal^{51,52}, pero la combinación de microtia con malformaciones de oído interno también ha sido reportada en un estudio en Bélgica en el que 8% (13/1666) de los pacientes con microtia presentaron alteraciones del oído interno que fueron visibles por TAC o IRM⁵¹. Una familia japonesa se reportó con malformación del canal semicircular y alteraciones del oído externo e interno⁵³. Cabe destacar que de los casos índice que estudiamos, encontramos que una paciente presentó dilatación del vestíbulo y agenesia del canal semicircular; esto apoya la base genética para la combinación de alteraciones en el oído interno, el oído medio y el externo.

El modelo donde más se ha estudiado la microtia es el ratón, existen múltiples modelos que apoyan que *HOXA2* es determinante para la adecuada formación del pabellón auricular. Gavalas y cols en 1997 reportaron embriones *Hoxa-2*^{-/-} con los rombómeros 2 y 3 molecular y anatómicamente alterados. El análisis celular realizado por marcaje con tinción retrograda mostró que los axones motores trigeminales de r2 y r3 rodeaban caudalmente y salían del rombencéfalo desde el punto de salida del nervio facial de r4 y no de su sitio normal de salida en el r2. Además el patrón dorsal r2-r3 estaba afectado, con pérdida del núcleo coclear y dilatación de la parte lateral del cerebelo. Estos resultados ponen de manifiesto que *Hoxa-2* controla el patrón axonal motor de r2-r3 y también sugiere que su ausencia puede ocasionar cambios homeóticos en las placas alares de estos rombómeros⁵⁴

Al realizar el estudio molecular al gen *HOXA2* a todos los casos índices no se encontró ninguna mutación o variante que pudieran ser la causa del espectro FAV en las familias aquí reportadas, Alasti (2008)⁵⁵ fue el primero en reportar una mutación de sentido equivocado, resultado de una sustitución de una Glutamina altamente conservada por una Lisina en la posición 186 de *HOXA2* que segregaba de manera autosómica recesiva, en una familia Iraní consanguínea con microtia bilateral. Brown et al (2013) posteriormente describió a una familia con microtia bilateral no sindrómica con herencia autosómica dominante en donde identificó una mutación sin sentido en *HOXA2*. Las características auriculares de ambas familias fueron similares, aunque los individuos afectados en la familia Iraní presentaron una microtia más severa, alteraciones del canal auditivo, hipoacusia mixta profunda, así como paladar hendido parcial, similar a lo visto en el ratón deficiente de *Hoxa2*, confirmando la relevancia clínica de este modelo⁵⁶.

En adición a los hallazgos encontrados por Brown y cols (2013) Piceci y cols (2016) reportaron una segunda familia de 5 generaciones afectadas con microtia bilateral aislada con segregación autosómica dominante, se determinó una variante heterocigota no reportada en *HOXA2* (c.670G>T, p.(Q224*)), que introduce un codón de paro prematuro en la posición del aminoácido 224 y ocasiona la producción de una proteína trunca de 153 aminoácidos, el aminoácido mutado esta dentro de una región altamente conservada durante la evolución, que concluyeron tiene un papel muy probablemente patogénico en esta familia⁵⁷.

Nuestras familias presentan gran variabilidad lo que pudiera hacer sospechar en distinta etiología. En la literatura solo una minoría de microtia/anotia aislada se ha definido secundaria a patrón mendeliano⁵⁸, en relación con esto Monks (2010)⁵⁹ llevó a cabo un análisis mutacional de *HOXA2* y *SIX2* en una población del Bronx de descendencia Hispánica y Africana con microtia aislada (*SIX2* otro gen candidato que actúa corriente abajo de *HOXA2* durante el desarrollo) y no identificaron mutaciones en la región codificante de ambos genes, pero si cuatro nuevas variantes de un solo nucleótido. Estas variantes se encontraban dentro del

intrón y en los extremos 3' UTR de *HOXA2* y los extremos 5' y 3' UTRs de *SIX2*. Las cuatro variantes estaban presentes en más del 5% de una muestra control con la misma ancestría, excluyendo estas variantes como patogénicas.

Por otro lado para evaluar la posible herencia multifactorial en el origen de la microtia/anotia aislada, Paput (2011)⁵⁸ comparó el número de familiares afectados de primer grado relacionados con casos índices con el número de afectados de primer grado esperados con base en el modelo del umbral de la base de datos de vigilancia de casos y controles de anomalías congénitas de Hungría de 1980 a 1996 y encontró que el número de afectados de primer grado y el número esperado no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p=0-47$). Algunos otros hallazgos (mayor número de hombres afectados que mujeres y factores ambientales pivote con predisposición poligénica) confirmaron su hipótesis de que la herencia multifactorial puede ser la explicación para el origen de esta malformación aunque el número de casos familiares fue pequeño en ese estudio.

La etiología del espectro FAV es aun pobremente comprendida, y para su estudio se han utilizado diferentes modelos: los estudios de un solo gen que nos podrían dar respuestas a muchas de nuestras interrogantes (genes candidatos) como el presente trabajo, que presentó la desventaja de ser una muestra pequeña. El porcentaje de casos familiares reportados en este instituto y en el INP es alto como ya se menciona, donde el patrón posible de herencia autosómica dominante resalta entre otros modos de herencia sin poder descartar el multifactorial. El porcentaje bajo de antecedentes familiares en otras poblaciones podría deberse a que no se realizó extensivamente el estudio clínico de los casos para descartar manifestaciones menores de la microtia, lo que hace evidente la heterogeneidad genética del espectro y la necesidad de continuar su estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Muñoz-Pedroza LA, Arenas-Sordo ML. Manifestaciones clínicas de 149 pacientes con espectro Facio-auriculo-vertebral. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2013; 64(5):359-362.
2. Gibson JN, Sillence DO, Taylor TK. Abnormalities of the spine in Goldenhar's syndrome. *J Pediatr Orthop.* 1996;16:344---9.)
3. Harris J, B. Kallen, E. Robert, The epidemiology of anotia and microtia, *J. Med. Genet.* 33 (10) (1996) 809–813. [2]
4. Castilla E.E., I.M. Orioli, Prevalence rates of microtia in South America, *Int. J. Epidemiol.* 15 (3) (1986) 364–368.
5. Hunter A, Frias J, Gillessen-Kaesbach G, Hughes H, Jones K, Wilson L. Elements of morphology: standard terminology for the ear. *Am. J. Med. Genet. A* 2009;149A: 40e60
6. Peter M. Prendergast. *Anatomy of the External Ear.* M.A. Shiffman (ed.), *Advanced Cosmetic Otoplasty*, 15 . DOI 10.1007/978-3-642-35431-1_2, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013
7. Diagnosis in Otorhinolaryngology pp 2-7 Date: 10 June 2009 Ear Anatomy
8. Embriología humana y biología del desarrollo/(editores) Sebastián, Manuel Arteaga Martínez, María Isabel García Pelaez. México. Editorial Médica Panamericana, 2013

9. Sadler T.W. Langman, embriología médica. 12 edición Wolters Kluger health.
10. Cox TC, Camci ED, Vora S, Luquetti DV, Turner EE. The genetics of auricular development and malformation: new findings in model systems driving future directions for microtia research. *Eur J Med Genet.* 2014; 57(8):394-401
11. Jongbloet PH: Goldenhar syndrome and overlapping dysplasias in vitro fertilisation and ovopathy. *J Med Genet* 24:616–620, 1987.
12. Mastroiacovo P, C. Corchia, L.D. Botto, R. Lanni, G. Zampino, D. Fusco, Epidemiology and genetics of microtia-anotia: a registry based study on over one million births, *J. Med. Genet.* 32 (1995) 453–457. [4] I.

13. Llano-Rivas, A. Gonzalez-del Angel, V. Del Castillo, R. Reyes, A. Carnevale, Microtia: a clinical and genetic study at the National Institute of Pediatrics in Mexico City, *Arch. Med. Res.* 30 (2) (1999) 120–124.
14. Mastroiacovo P, C. Corchia, L.D. Botto, R. Lanni, G. Zampino, D. Fusco, Epidemiology and genetics of microtia-antia: a registry based study on over one million births, *J. Med. Genet.* 32 (1995) 453–457.
15. Suutarla S., J. Rautio, A. Ritvanen, S. Ala-Mello, J. Jero, T. Klockars, Microtia in Finland: comparison of characteristics in different populations, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 71 (8) (2007) 1211–1217.
16. Alasti F, Van Camp G. Genetics of microtia and associated syndromes. *J Med Genet.* 2009; 46(6):361-9
17. Mark A. Canfield,^{1*} Peter H. Langlois: Epidemiologic Features and Clinical Subgroups of Anotia/Microtia in Texas . *Birth Defects Research (Part A)* 85:905–913 (2009)
18. Goldenhar M. Associations malformatives de l'oeil et de l'oreille, en particulier le syndrome dermoïde épibulbaire –appendices auriculaires – fistula auris congenita et ses relations avec la dysostose mandibulo-faciale. *J Genet Hum* 1952;1:243–82
19. Gorlin RJ, Pindborg JJ. *Syndromes of the Head and Neck*, 2nd edn. New York: McGraw-Hill. pp. 546–52
20. Daniela V. Luquetti¹, Carrie L. Heike¹, Anne V. Hing¹, Michael L. Cunningham¹, and Timothy C. Cox. Microtia: Epidemiology & Genetics. *Am J Med Genet A.* 2012 January; 158A(1): 124–139. doi:10.1002/ajmg.a.34352.
21. Cousley RRJ, Wilson DJ. Hemifacial microsomia: developmental consequence of perturbation of the auriculofacial cartilage model? *Am J Med Genet* 2005;42:461–6.
22. Gavalas et al. Gavalas A, Studer M, Lumsden A, Rijli FM, Krumlauf R, Chambon P. Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development.* 1998; 125(6): 1123–36. [PubMed: 9463359].

23. Minoux M1, Kratochwil CF, Ducret S, Amin S, Kitazawa T, Kurihara H, Bobola N, Vilain N, Rijli FM. Mouse *Hoxa2* mutations provide a model for microtia and auricle duplication. *Development*. 2013 Nov;140(21):4386-97. doi: 10.1242/dev.098046. Epub 2013 Sep 25.
24. Bennum RD et al: Microtia: A microform of hemifacial microsomia. *Plast Reconstr Surg* 76:859–863, 1985
25. Grabb WC: The first and second branchial arch syndrome. *Plast Reconstr Surg* 36:485–508, 1965.
26. Melnick M, Myrianthopoulos NC: External Ear Malformations: Epidemiology, Genetics and Natural History. Alan R. Liss, New York, 1979, p 21
27. Rollnick BR, Kaye CI: Hemifacial microsomia and variants: Pedigree data. *Am J Med Genet* 15:233–253, 1983.
28. Tenconi R, Hall BD: Hemifacial microsomia: Phenotypic classification, clinical implications and genetic aspects. In: *Treatment of Hemifacial Microsomia*, Harvold EP (ed), Alan R. Liss, New York, 1983, pp 39–49.
29. Cassidy, Suzanne B. Management of genetic syndromes. Wiley Blackwell, 210:587-595)
30. Clouthier, D.E., Hosoda, K., Richardson, J.A., Williams, S.C., Yanagisawa, H., Kuwaki, T., Kumada, M., Hammer, R.E. and Yanagisawa, M. (1998) Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development*, 25, 813–824.
31. Sato, T., Kurihara, Y., Asai, R., Kawamura, Y., Tonami, K., Uchijima, Y., Heude, E., Ekker, M., Levi, G. and Kurihara, H. (2008) An endothelin-1 switch specifies maxillomandibular identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 18806–18811.
32. Parry, D.A., Logan, C.V., Stegmann, A.P., Abdelhamed, Z.A., Calder, A., Khan, S., Bonthron, D.T., Clowes, V., Sheridan, E., Ghali, N. et al. (2013) SAMS, a syndrome of short stature, auditory-canal atresia, mandibular hypoplasia, and skeletal abnormalities is a unique neurocristopathy caused by mutations in *Goosecoid*. *Am. J. Hum. Genet.*, 93, 1135–1142.

33. Fujita et al., Hrt1/Hey1 for pharyngeal arch artery development 9 November 2015
34. Tuomas Klockars, M.D.,Ph.D., and Jorma Rautio, MD. Embriology and Epidemiology of Microtia. Facial Plastic surgery/ Volume 25, Number 3, 2009
35. Alasti F , G Van Camp., Genetics of microtia and associated síndromes; J Med Genet 2009 46: 361-369
36. J. Wu et al. / International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 74 (20) 275–278
37. Mark A. Canfield,1* Peter H. Langlois: Epidemiologic Features and Clinical Subgroups of Anotia/Microtia in Texas . Birth Defects Research (Part A) 85:905–913 (2009)
38. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2006 Feb;41(2):107-11. [Case control study on risk factors of congenital microtia].[Article in Chinese] Du JM1, Guo WH, Han J, Zhuang HX
39. Christiane T, Frank Majewskib. A family with autosomal dominant oculoauriculo- vertebral spectrum. Clinical Dysmorphology 2007, 16:1–7. 6.
40. Regenbogen L, Godel V, Goya V, Goodman RM (1982). Further evidence for an autosomal dominant form of oculoauriculovertrebral dysplasia. Clin Genet 21:161–167.
41. Hartsfield JK. Orthod Craniofac Res. 2007 Aug;10(3):121-8. Review of the etiologic heterogeneity of the oculo-auriculo-vertebral spectrum (Hemifacial Microsomia).
42. Chantal Farra, Khaled Yunis, Nadine Yazbeck, Marianne, Majdalani, Lama Charafeddine, Rima Wakim, Johnny Awwad. A Lebanese family with autosomal recessive oculo-auriculo-vertebral (OAV) spectrum and review of the literature: is OAV a genetically heterogeneous disorder?, The Application of Clinical Genetics 2011:4 93–97)
43. Ellwood LC, Winter ST, Dar H. Familial microtia with meatal atresia in two sibships. J Med Genet. 1968;5(4):289–291.
44. Strisciuglio P, Ballabio A, Parenti G. Microtia with meatal atresia and

- conductive deafness: mild and severe manifestations within the same sibship. *J Med Genet.* 1986;23(5):459–460.
45. Okajima H, Takeichi Y, Umeda K, Baba S. Clinical analysis of 592 patients with microtia. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1996; 525:18-24.
46. Tasse C1, Majewski F, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D. *Clin Dysmorphol.* 2007 Jan;16(1):1-7. A family with autosomal dominant oculo-auriculo-vertebral spectrum.
47. Strömland K1, Miller M, Sjögren L, Johansson M, Joelsson BM, Billstedt E, Gillberg C, Danielsson S, Jacobsson C, Andersson-Norinder J, Granström G. *Am J Med Genet A.* 2007 Jun 15;143A(12):1317-25. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: associated anomalies, functional deficits and possible developmental risk factors.
48. Tasse C1, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Albrecht B, Horn D, Janecke A, Kling R, König R, Lorenz B, Majewski F, Maeyens E, Meinecke P, Mitulla B, Mohr C, Preischl M, Umstadt H, Kohlhase J, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D. *Eur J Med Genet.* 2005 Oct-Dec;48(4):397-411. Epub 2005 Jun 8. Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): clinical evaluation and severity scoring of 53 patients and proposal for a new classification.
49. Carvalho GJ1, Song CS, Vargervik K, Lalwani AK *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 Feb;125(2):209-12. Auditory and facial nerve dysfunction in patients with hemifacial microsomia.
50. Ana Beleza-Meireles. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: Clinical and molecular analysis of 51 patients. *European Journal of Medical Genetics* 58 (2015) 455e465
51. Tekin, M., Hismi, B.O., Fitoz, S., Ozdag, H., Cengiz, F.B., Sirmaci, A., Aslan, I., Inceoglu, B., Yuksel-Konuk, E.B., Yilmaz, S.T., et al. (2007). Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 338–344. 29.
52. Williamson, I. (2007). Review: Children <2 years of age with bilateral acute

- otitis media and children with otorrhoea benefit most from antibiotics. Arch. Dis. Child Educ. Pract. Ed. 92, ep 159)
53. Kimitsuki, T., Inamitsu, M., Komune, S., and Komiyama, S. (1999). Congenital malformation of the inner ear associated with recurrent meningitis. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 256 (Suppl 1), S11–S14.
54. Anthony Gavalas, Marc Davenne¹, Andrew Lumsden, Pierre Chambon and Filippo M. Rijli. Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. Development 124, 3693-3702 (1997).
55. Alasti 2008. Alasti F, Sadeghi A, Sanati MH, Farhadi M, Stollar E, Somers T, Van Camp G. A mutation in HOXA2 is responsible for autosomal-recessive microtia in an Iranian family. Am J Hum Genet. 2008; 82(4): 982–91. [PubMed: 18394579], International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 74 (2010) 878–882)
56. Brown KK, Viana LM, Helwig CC, Artunduaga MA, Quintanilla-Dieck L, Jarrin P, Osorno G, McDonough B, DePalma SR, Eavey RD, Seidman JG, Seidman CE. HOXA2 haploinsufficiency in dominant bilateral microtia and hearing loss. Hum Mutat. 2013; 34(10):1347-51.
57. Francesca Piceci, Silvia Morlino, Marco Castori, Elsa Buffone, Alessandro De Luca, Paola Grammatico and Valentina Guida. Identification of a second HOXA2 nonsense mutation in a family with autosomal dominant non-syndromic microtia and distinctive ear morphology. doi: 10.1111/cge.12845
58. Paput L, Czeizel AE, Bánhidly F. Possible multifactorial etiology of isolated microtia/anotia--a population-based study. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2012; 76(3): 374-378.
59. Monks DC¹, Jahangir A, Shanske AL, Samanich J, Morrow BE, Babcock M. Mutational analysis of HOXA2 and SIX2 in a Bronx population with isolated microtia. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2010 Aug;74(8):878-82. doi: 10.1016/j.ijporl.2010.05.004. Epub 2010 Jun 9