



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

**PEDIATRIA**

TÍTULO DE LA TESIS

**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *TCOF1* EN UNA  
MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTIA  
COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-  
AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)**

PRESENTA:

**DR. DIEGO REYNAL SAAVEDRA**

TUTOR DE TESIS:

**DRA. BERNARDETTE ESTANDÍA ORTEGA**

ASESOR DE TESIS:

**DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL**

ASESORES METODOLOGICOS

**DRA. PATRICIA CRAVIOTO QUINTANA**

**FIS. MAT. FERNANDO GALVAN CASTILLO**



Ciudad de México 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# ÍNDICE

1. Resumen
2. Marco teórico y antecedentes
3. Planteamiento del problema
4. Pregunta de Investigación
5. Justificación
6. Objetivo
7. Hipótesis
8. Material y método
9. Resultados
10. Discusión
11. Bibliografía

# ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *TCOF1* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTIA COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

## RESUMEN

La microtia es una malformación del pabellón auricular cuya etiología es muy heterogénea. Se puede presentar en forma aislada o sindrómica. La microtia es considerada por algunos autores como una expresión mínima del Espectro-Facio-Aurículo-Vertebral (EFAV), una entidad que además de cursar con anomalías a nivel auricular cursa con malformaciones a nivel ocular, facial, vertebral, cardíaco y renal. Se ha documentado que los hispanos tienen un mayor riesgo de presentar microtia con respecto a otras poblaciones.

Uno de los genes candidatos de estudio es *TCOF1* (*treacle ribosome biogenesis factor 1*), el cual se expresa principalmente en las estructuras que se derivan del primer y segundo arcos faríngeos durante la embriogénesis, es el principal gen asociado al desarrollo del síndrome de Treacher Collins (TCS) y existe evidencia de modelos de embriones murinos KO (*knock-out*) para el gen *tcof1* que desarrollaron un fenotipo semejante a dicho síndrome en humanos.

Dado que no existen estudios genéticos en México en pacientes con microtia/EFAV se realizó el análisis del gen *TCOF1* para determinar la frecuencia de variantes génicas mediante secuenciación de siguiente generación en 49 casos, únicos o familiares, con diagnóstico de microtia /EFAV del Instituto Nacional de Pediatría.

En este estudio se identificaron 6 variantes no sinónimas en estado heterocigoto en el gen *TCOF1*, cinco de ellas benignas y una probablemente benigna, por lo que no se consideran causales de microtia en humanos. Así mismo, se identificaron 4 variantes sinónimas en nuestros pacientes y en el análisis de asociación se observó una diferencia estadísticamente significativa en la variante sinónima p. (Gly587=), ya que su frecuencia alélica (FA) fue mayor en el grupo de referencia, lo cual sugiere que sea un factor protector de microtia/EFAV en la población mexicana. No se observaron variantes patogénicas, probablemente patogénicas o variantes de significado incierto (VUS) en este gen.

Los resultados de este trabajo permiten concluir que aunque en nuestra población de estudio el gen *TCOF1* parece no tener un papel causal de microtia /EFAV se debe resaltar la importancia

del estudio de las variantes sinónimas pues se identificó una variante que pudiera conferir protección. Por otro lado, sería importante expandir el número de genes de estudio o considerar exoma en nuestros pacientes con microtia/EFAV para generar mayor conocimiento ya que la mayoría de los pacientes con microtia/EFAV permanecen sin una etiología identificable.

# ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *TCOF1* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTIA COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

## MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

La microtia es una malformación del pabellón auricular y del oído externo y medio, que se origina por una alteración en la embriogénesis del primer y segundo arcos faríngeos, durante las 5ª y 6ª semanas de gestación (Cox et al, 2014). A nivel mundial la microtia tiene una incidencia de 1 en 500 a 1 en 3,000 recién nacidos vivos, y una prevalencia de 0.83 a 17.44 en 10,000 nacimientos (Suutarla et al, 2007; Luquetti et al, 2012). Se ha documentado que tiene una alta incidencia en población hispana y asiática, la cual es 6.5 veces mayor en hispanos que en no hispanos (Shaw et al, 2004). En México, el único registro que reporta una prevalencia de microtia es el Programa de Vigilancia de Defectos Congénitos del Departamento de Genética y Defectos Congénitos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, como participante en el reporte anual (2014) de The Centre of the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research (ICBDSR), el cual refiere una cifra de 0.42/10,000 recién nacidos vivos, con base en el 86% de los recién nacidos en 28 instituciones del estado. La distribución epidemiológica de la microtia comprende una predilección por el sexo masculino (relación 2:1), siendo más frecuente la forma unilateral (79-93%) derecha (60%) (Alasti et al, 2009).

La microtia puede ser aislada o sindrómica, es decir, puede acompañarse o no de otras alteraciones por lo que deben buscarse intencionadamente (Suutarla et al, 2007). A la presencia de microtia junto con alteraciones faciales como la microsomía hemifacial, oculares, vertebrales, cardíacas y renales, entre otras, se le denomina Espectro Facio-Aurículo-Vertebral (EFAV, por sus siglas) (Singhal et al, 2023) y por ello algunos autores consideran a la microtia como una expresión mínima del EFAV (Luquetti et al 2012; Cox et al, 2014).

La etiología de la microtia es muy heterogénea, los casos sindrómicos pueden ser de causa cromosómica, mendeliana, teratogénica o multifactorial y con relación a los aislados, la mayoría de los casos suelen ser considerados esporádicos. Con respecto a los casos familiares se sabe

que el patrón de herencia puede ser monogénico autosómico dominante o recesivo, así como multifactorial (Alasti et al, 2009; Muñoz-Pedroza et al, 2013; Estandia-Ortega et al, 2022).

Además de los factores genéticos, se han identificado factores ambientales asociados a microtia/EFAV: diabetes mellitus materna (Zhang et al, 2009) y la exposición a teratógenos durante la vida intrauterina, como: alcohol, retinoides (Lammer et al, 1985), talidomida y mofetil micofenolato (Merlob et al, 2009), principalmente.

De acuerdo a la embriogénesis humana y estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*, uno de los genes candidatos a ser estudiado en pacientes con microtia es el gen *TCOF1* (*treacle ribosome biogenesis factor 1*) (Valdez et al, 2004; Gendron et al., 2006).

### **TCOF1**

(HGNC: 11654, Entrez Gene 6949, Ensembl: ENSG00000070814, OMIM: 606847, UniProtKB: Q13428, NG\_011341.1 RefSeqGene, NM\_000356.3 isoforma B).

#### a. Estructura del gen

El gen *TCOF1*, también conocido como gen del factor de biogénesis ribosomal, se localiza en el *locus* 5q32-q33.1, y está conformado por 42,670 bases y 26 exones. Los exones 1 a 25 codifican un marco de lectura abierto de 4233 pb (Figura 1).

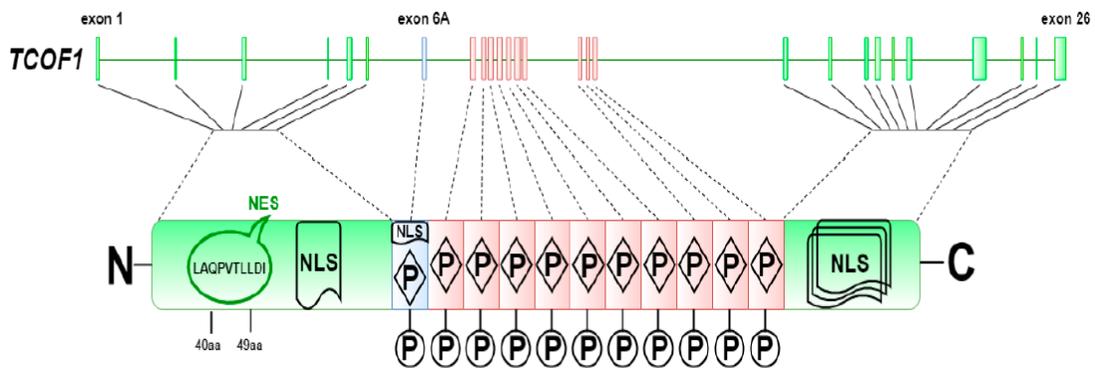


Figura 1 .Estructura del gen *TCOF1* y de la isoforma mayor de "treacle" (imagen tomada de Grzanka et al., 2021).

## b. Transcritos

Se han documentado 15 transcritos por *splicing* alternativo, sin embargo, sólo 10 de ellos codifican para una proteína llamada “treacle” o melaza. El transcrito TCOF1-201 (ENSMUST00000163446.9) codifica para la isoforma 1, que resulta ser la más frecuente. Esta variante carece del exón 7 pero mantiene los mismos residuos C- y N- terminal. Otras isoformas resultantes del *splicing* alternativo incluyen el exón 6A (una secuencia de 231 pb entre los exones 6 y 7) y el exón 16A (el cual es una secuencia de 108 pb que se localiza entre los exones 16 y 17) en el ARNm de *TCOF1* (Dai et al, 2016).

## c. Proteína

El gen codifica para una proteína nucleolar de baja complejidad de ~1488 aminoácidos, rica en serina y alanina, cuya región C-terminal codificada en los exones 23 y 24 es de suma importancia para la localización de la misma en el nucléolo. También cuenta con un dominio homólogo con la proteína LIS 1 (*Lissencephaly type-1-like homology motif*), que contribuye a la regulación de la dinámica de los microtúbulos al favorecer su dimerización o mediante la unión directa a la cadena pesada de la dineína citoplasmática o a los microtúbulos (Grzanka et al, 2021).

Esta proteína llamada “treacle”, está involucrada en la biogénesis ribosomal mediante su interacción con el factor de unión corriente-arriba UBF (*Upstream Binding Factor*) y en el transporte nucleolo-citoplasma. “Treacle” parece tener también un rol importante en la metilación del ARNr a través de sus interacciones con pNop56, el cual es un componente del complejo proteína-ribonucleolo que metila el pre-ARNr. Por lo tanto, la haploinsuficiencia de “treacle” puede inhibir la producción del ARNr maduro, además de inhibir la transcripción del ADNr (Dai et al, 2016).

Se sabe que esta proteína se expresa durante la embriogénesis temprana principalmente en las estructuras que son derivadas del primer y segundo arcos faríngeos. La haploinsuficiencia de esta proteína ocasiona la inhibición de la producción de RNA ribosomal maduro, así como la proliferación y diferenciación inadecuada de las células embrionarias, detención del ciclo celular y altos niveles de apoptosis celular, lo que culmina en un desarrollo anormal de la región craneofacial en modelos murinos (Dixon et al, 2006).

#### d. Regulación del gen

La regulación del gen *TCOF1* consiste en reprimir su activación constitutiva para mantener el nivel adecuado de la proteína melaza o “treacle” para el desarrollo craneofacial en el embrión murino. Secuencias altamente conservadas localizadas río arriba del gen contribuyen al mantenimiento de la represión, mientras que un fragmento de 296 pares de bases que incluye dos sitios de unión altamente conservados, CCAAT y Zfp 161 (zinc finger protein), son responsables de la activación constitutiva. A la fecha no se conoce qué genes son encargados de regular directamente a *TCOF1* (Shows et al, 2008).

#### e. Modelos murinos

Se ha observado en el modelo de embrión murino que el gen ortólogo *tcof1* se expresa en el neuroepitelio en la edad gestacional E8.5, y en el mesénquima frontonasal y de los arcos faríngeos en E9.5 Aquellos embriones con una mutación constitutiva en un alelo del gen ortólogo de *tcof1* mostraron características similares a las de las personas con síndrome de Treacher Collins (TCS) (Dixon, et al. 2006)

#### f. Microtia en humanos

*TCOF1* es el principal gen asociado al desarrollo del TCS, también conocido como disostosis mandibulofacial, el cual es una entidad autosómica dominante que tiene una prevalencia de 1 en 50,000 recién nacidos vivos. Dentro de las manifestaciones clínicas descritas en este síndrome, se presentan malformaciones de oído externo y medio e hipoacusia conductiva, así como alteraciones craneofaciales. Se han reportado variantes patogénicas en el gen *TCOF1* en el 93% de los pacientes estudiados (Dai et al, 2016), de los cuales el 60% son casos *de novo* porque no cuentan con antecedentes familiares y en los casos familiares las variantes suelen ser privadas (exclusivas de cada familia) con excepción de una delección de 5 pb en el exón 24. El espectro mutacional del gen es muy amplio: la mayoría (57%) son microdelecciones y microduplicaciones (1-41 pares de bases), que causan corrimiento del marco de lectura, lo que resulta en una proteína trunca por codones de paro prematuros; 23% variantes génicas sin sentido, 16% afectan el splicing y el 4% de sentido erróneo, sumando más de 130 variantes patogénicas familia-específicas identificadas hasta la fecha. Las variantes génicas, tanto

patogénicas como benignas, se pueden encontrar a lo largo de los 26 exones codificantes del gen. Los exones 10, 15, 16, 23 y 24 se consideran los principales puntos calientes o “hot spots” de mutación, ya que son responsables de aproximadamente el 50% de las variantes patogénicas actualmente descritas en varias poblaciones. No existe una correlación genotipo-fenotipo clara, ya que no hay evidencia de asociación entre la severidad de la enfermedad y la presentación (*de novo* o familiar), con el origen parental y/o el tipo de variante patogénica (Dai et al, 2016).

#### g. Variantes génicas patogénicas

En pacientes con fenotipo de EFAV (n=4) se analizó el gen *TCOF1* y se identificó una variante de sentido erróneo en el exón 9 (c.1084G>A, p.Ala362Thr) en un caso con fenotipo característico (microtia y atresia del conducto auditivo externo izquierdo, hipoplasia maxilar y mandibular ipsilateral, quiste dermoide epibulbar y espina bífida C5-C7); esta variante se definió como *de novo* y no se identificó en 114 controles lo que apoyó su patogenicidad (Su et al, 2007).

#### h. Variantes génicas benignas

En 4 pacientes con EFAV y un paciente con TCS se reportaron en el gen *TCOF1*: variantes benignas en los exones 10 (p.P449P), 11 (p.G510G), 12 (p.P588A), 16 (p.A810V), 21 (p.R1099P), 22 (p.D1149D) y 23 (p.V1313A) previamente descritas y presentes en 51 controles de Taiwan, y cuatro no descritas con anterioridad en los exones 9 (p.E419E), 17 (p.P881P), y 22 (p.A1168Q). de *TCOF1* (Su et al, 2007).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La microtia, considerada como una expresión mínima del EFAV, es una malformación congénita cuya incidencia es alta en la población hispana y representa una causa de discapacidad, principalmente auditiva con impacto en la calidad de vida del paciente. Como otras alteraciones que se presentan al nacimiento, la microtia requiere de un manejo multidisciplinario a largo plazo. A pesar de ser una malformación frecuente, se desconocen los factores genéticos que la favorecen y no existen estudios que los analicen en población hispana.

Uno de los genes candidatos relacionados a microtia es *TCOF1*, ya que se ha demostrado que se expresa principalmente en las estructuras que se derivan del primer y segundo arcos faríngeos durante la embriogénesis y codifica para una proteína que ejerce un efecto directo sobre la reproducción celular. Así mismo, *TCOF1* es el principal gen asociado al desarrollo al TCS, también conocido como disostosis mandibulofacial, en el cual se presentan malformaciones de oído externo y medio, así como hipoacusia conductiva.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la frecuencia de variantes génicas en el gen *TCOF1* en una muestra de pacientes mexicanos con microtia como expresión mínima de EFAV?

## **JUSTIFICACIÓN**

En nuestro país, una de las principales causas de mortalidad y discapacidad en la infancia son las malformaciones congénitas, razón por la cual se consideran una línea de investigación prioritaria en el Sector Salud. En México, el único registro que reporta una prevalencia de microtia es el Programa de Vigilancia de Defectos Congénitos del Departamento de Genética y Defectos Congénitos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, como participante en el reporte anual (2014) de The Centre of ICBDSR. Este refiere una cifra de 0.42 casos por cada 10,000 recién nacidos vivos. Además, la microtia, al igual que muchos otros defectos al nacimiento, tiene un gran impacto en la calidad de vida del paciente y requiere de un manejo multidisciplinario a largo plazo, ya que ocasiona problemas relacionados con la audición, lenguaje, el aspecto emocional y psicosocial. Uno de los genes que podrían contribuir a la etiología de microtia es *TCOF1*, el cual participa en el desarrollo craneofacial que involucra al pabellón auricular. Variantes génicas en este gen podrían ser causales o predisponer a la presencia de microtia, como se ha evidenciado en otras malformaciones congénitas como en la disostosis mandibulofacial presente en el TCS. Así mismo, existe evidencia de modelos de embriones murinos KO (*knock-out*) para el gen *tcof1* que desarrollaron un fenotipo semejante a dicho síndrome en humanos.

En México, no existen estudios sobre el análisis sobre variantes génicas en pacientes con microtia/EFAV, por lo que consideramos importante realizar el estudio molecular de *TCOF1* en

población mexicana con esta entidad. Conocer mejor la etiología de la microtia podría permitir un asesoramiento genético más certero en las familias.

## **OBJETIVO**

Determinar la frecuencia de variantes génicas en el gen *TCOF1* en una muestra de pacientes mexicanos con microtia como expresión mínima de EFAV.

## **HIPÓTESIS**

El estudio molecular del gen *TCOF1* permitirá determinar la frecuencia de variantes génicas en una muestra de pacientes mexicanos con microtia como expresión mínima de EFAV.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Pacientes mexicanos de cualquier género y en una edad de 0-18 años con datos clínicos de microtia/EFAV (foseta o apéndice preauricular, microtia, anotia y/o microsomía hemifacial) con alteraciones estructurales en oído medio, columna vertebral y/o riñones, compatibles con esta entidad que acudieron a la consulta de Genética del Instituto Nacional de Pediatría.

### **TAMAÑO DE LA MUESTRA**

El tamaño de muestra se determinó a conveniencia con un mínimo de 50 pacientes con base en el número de pacientes con microtia aislada que ingresan cada año y los que están en seguimiento en Genética en el Instituto Nacional de Pediatría. No se pudo calcular el tamaño de la muestra con base a la frecuencia de las variantes encontradas en el gen candidato en pacientes con microtia, dada la poca evidencia en la literatura.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes no relacionados con diagnóstico clínico de microtia/EFAV con:

- a) Exploración física completa realizada por un genetista
  - b) Tomografía axial computarizada (TAC) de oído
  - c) Evaluación audiológica (audiometría, PEACT)
  - d) Ortopantomografía
  - e) Radiografía de columna vertebral completa
  - f) Ultrasonido renal
- Cualquier sexo
  - Cualquier edad
  - Casos únicos o familiares
  - Carta de consentimiento y/o asentimiento informado firmada

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- a) Pacientes con una transfusión sanguínea en un periodo menor a tres meses.
- b) Pacientes con microtia/EFAV, y otra malformación congénita (diferente a alteraciones vertebrales y/o renales), alteración en el crecimiento somático (talla baja o alta) o discapacidad intelectual.
- c) Pacientes con antecedente de exposición a teratógenos específicos asociados a microtia/EFAV (alcohol, retinoides y diabetes materna).
- d) Pacientes con una muestra de ADN insuficiente y sin autorización para realizar una nueva toma de la misma (criterio de eliminación).

## CAPTACIÓN DE PACIENTES

Los pacientes diagnosticados con microtia/EFAV que cumplieron con los criterios de inclusión fueron ingresados en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, posterior a la firma de consentimiento informado.

## ESTUDIO MOLECULAR

Se realizó secuenciación de siguiente generación (*Next-Generation Sequencing*, NGS) del gen *TCOF1* a partir del ADN de una muestra de sangre periférica o de células de descamación oral de los pacientes. Las librerías para la SNG se prepararon con un kit de sondas de captura para el gen *TCOF1* (IDT xGen™) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se secuenció en una plataforma Illumina MiSeq 2x150 (San Diego, CA, USA) a través de Admera Health Company (South Plainfield, NJ, USA). Posteriormente, se realizó el análisis bioinformático en nuestro laboratorio el cual incluyó la evaluación de la calidad y la eliminación de lecturas de baja calidad, el alineamiento con la secuencia de referencia humana GRCh38 y el llamado de variantes de nucleótido único (del inglés *Single Nucleotide Variant*, SNV) y pequeñas inserciones-delecciones. Para llevar a cabo la anotación y el filtrado de las variantes se utilizaron los paquetes bioinformáticos GATK Toolkit (McKenna et al., 2010) y Alamut Batch, Focus and Visual (Interactive Biosoftware, Rouen, France).

## CLASIFICACIÓN DE LAS VARIANTES GÉNICAS

Las variantes génicas identificadas se clasificaron de acuerdo a los criterios del American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) a través de una herramienta en línea ([https://www.medschool.umaryland.edu/Genetic\\_Variant\\_Interpretation\\_Tool1.html/](https://www.medschool.umaryland.edu/Genetic_Variant_Interpretation_Tool1.html/)) para determinar si eran patogénicas, probablemente patogénicas, benignas, probablemente benignas y/o variante de significado incierto (*variant of uncertain significance*, VUS) (Richards et al., 2015).

Inicialmente se realizó la búsqueda de las variantes en las bases de datos de poblaciones sanas de diferente origen étnico como dbSNP, Exome Variant Server, GnomAD y Proyecto de los 1000 Genomas para identificar su frecuencia alélica en estado heterocigoto y/u homocigoto. Posteriormente, se revisaron las bases de datos de pacientes (Human Gene Mutation Database, LOVD y ClinVar) para conocer si la variante de interés se había reportado previamente en casos con microtia/EFAV. Para las variantes génicas de sentido erróneo descritas o no descritas se realizó un análisis *in silico* usando los programas PolyPhen, SIFT, HOPE y Mutation Taster para predecir un posible efecto deletéreo en la proteína. Se realizó una búsqueda dirigida mediante secuenciación de tipo Sanger en aquellos padres cuyos hijos presentaron una variante génica de sentido erróneo de baja frecuencia para definir si ésta se encontraba presente en alguno de ellos o era *de novo*.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias alélicas de las variantes génicas identificadas en el gen *TCOF1* se obtuvieron a partir del método de conteo alélico. Se determinó si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg utilizando la prueba exacta de Fisher de dos colas con la finalidad de conocer si la distribución de los genotipos era la esperada en nuestra población. Además se realizó un análisis de asociación para comparar las frecuencias genotípicas con las reportadas para estas variantes en población mexicana de Los Ángeles (Proyecto de los 1000 Genomas).

## RESULTADOS

Se incluyeron 49 pacientes no relacionados (31 hombres, 18 mujeres; en un rango de edad de 0-18 años) del Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico de microtia/EFAV. Con base en la genealogía de la historia clínica 25 casos fueron clasificados como familiares y 24 como esporádicos. Dentro de los casos familiares el patrón de herencia predominante fue el multifactorial seguido del mendeliano.

Los resultados clínicos de la población de estudio están acordes a la literatura en su mayoría y ya se encuentran publicados (Estandia-Ortega et al, 2022).

Se identificaron 6 variantes no sinónimas en estado heterocigoto en el gen *TCOF1* (Tabla 1). Cuatro de estas variantes, p.(Ala588Pro)/rs2071240, p.(Val810Ala)/rs7713638), p.(Pro1099Arg)/rs1136103 y p.(Ala1313Val)/rs15251, tienen una frecuencia alélica (FA) de >5% en el Proyecto de 1000 Genomas y GnomAD (criterio BA1), por lo que fueron clasificadas como variantes benignas de acuerdo a los criterios del ACMG/AMP. Además son variantes puntuales de sentido erróneo en un gen para el cual se sabe que principalmente las variantes sin sentido causan la enfermedad (criterio BP1), la evidencia computacional del análisis *in silico* predice que no hay impacto en la proteína que produce el gen (criterio BP4) e información reciente de fuentes confiables como las diferentes bases de datos (HGMD, LOVD, ClinVar) las reportan como benignas (criterio BP6).

Tabla 1 .Comparación de las frecuencias alélicas (FA) de las seis variantes no sinónimas identificadas en el gen <i>TCOF1</i> en nuestra población con las reportadas en el grupo de referencia (Mexicanos residentes en Los Ángeles, Proyecto de los 1000 Genomas). Modificado de Estandia-Ortega et al, 2022.												
				Casos en nuestro estudio				Grupo de referencia				
n	cDNA	Proteína	SNP	HoRA	Hetero	HoMA	FA	HoRA	Hetero	HoMA	FA	Valor de p
1	c.503C>T	p.(Thr168Met)	rs181203524	48	1	0	0.01	63	0	0	0	0.99
4	c.1762G>C	p.(Ala588Pro)	rs2071240	45	4	0	0.96	65	1	1	0.98	0.47
6	c.2429T>C	p.(Val810Ala)	rs7713638	43	6	0	0.94	57	9	1	0.92	0.55
4	c.3296C>G	p.(Pro1099Arg)	rs1136103	45	3	1	0.95	51	16	0	0.88	0.07
21	c.3938C>T	p.(Ala1313Val)	rs15251	28	20	1	0.78	38	22	7	0.73	0.45
1	c.4061G>C	p.(Gly1354Ala)	rs45491898	48	1	0	0.99	63	0	0	1	0.25

Abreviaturas: HoRA: homocigoto para el alelo de referencia, Hetero: heterocigoto, HoMA: homocigoto para el alelo menor, FA: frecuencia alélica

La variante p.(Gly1354Ala)/rs45491898, reportada en un solo paciente, si bien no presenta una frecuencia alélica mayor al 5% en el Proyecto de 1000 Genomas ni GnomAD, presenta una frecuencia alélica mayor a la esperada para la enfermedad (criterio BS1) y ha sido observada en adultos sin el fenotipo de estudio, es decir, microtia/EFAV (criterio BS2). Además es una variante puntual de sentido erróneo en un gen para el cual se sabe que principalmente las variantes sin sentido causan la enfermedad (criterio BP1), la evidencia computacional del análisis *in silico* predice que no hay impacto en la proteína (criterio BP4) e información reciente de fuentes confiables como las diferentes bases de datos (HGMD, LOVD, ClinVar) la reportan

como benigna (criterio BP6). Por lo tanto con estos criterios del ACMG/AMP, se clasificó como benigna.

Finalmente, la variante p.(Thr168Met)/rs181203524, se clasificó como probablemente benigna, ya que cumple también con los criterios BS1, BS2, BP1, BP4 y BP6 del ACMG/AMP, mencionados anteriormente. Sin embargo, en el grupo de referencia no se cuenta con la frecuencia alélica.

Se compararon las frecuencias de las seis variantes no sinónimas identificadas en nuestra población con el grupo de referencia (proyecto de los 1000 genomas), sin embargo, en este estudio de asociación, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las seis variantes (valor de  $p > 0.05$ ) (Tabla1).

En cuanto a las variantes sinónimas, se reportaron 4 en nuestros pacientes estudiados (Tabla 2).

Tabla 2 . Variantes sinónimas identificadas en nuestra población. Modificado de Estandia-Ortega et al, 2022.												
n	cADN	Proteína	SNP	Casos en nuestro estudio				Grupo de referencia				Valor de $p$
				HoRA	Hetero	HoMA	FA	HoRA	Hetero	HoMA	FA	
1	c.630A>G	p.(Thr210=)	rs765654624	48	1	0	0.99	NR	NR	NR	NR	NR
5	c.1578C>T	p.(Pro526=)	rs2071238	44	5	0	0.95	54	9	1	0.91	0.32
1	c.1761G>T	p.(Gly587=)	rs7701163	48	1	0	0.99	56	8	0	0.94	0.04
5	c.1842A>G	p.(Ser614=)	rs2071239	44	5	0	0.95	54	9	1	0.91	0.32

Abreviaturas: HoRA: homocigoto para el alelo de referencia, Hetero: heterocigoto, HoMA: homocigoto para el alelo menor, FA: frecuencia alélica, NR: no reportado

En el estudio de asociación se identificó que la FA de la variante p.(Gly587=)/rs7701163, al compararla con la FA del grupo de referencia (individuos mexicanos de Los Ángeles del Proyecto 1000 Genomas), presenta una diferencia estadísticamente significativa con base en el valor de  $p$  (0.04), lo cual no se evidenció en las otras variantes.

En la secuenciación del gen *TCOF1* no se observaron variantes patogénicas, probablemente patogénicas ni VUS.

## DISCUSIÓN

La etiología de la microtia no se ha comprendido por completo. Se sabe que tanto factores genéticos y no genéticos contribuyen a la presencia de microtia/EFAV (Gendron et al., 2016). Por lo anterior, en este estudio, no se incluyeron a los pacientes con exposición prenatal a teratógenos como alcohol, retinoides o diabetes materna, ya que estos factores ambientales se han considerado como causales de esta entidad (Foroud et al., 2012; Gendron et al., 2016; Berenger et al., 2018).

Con relación a los factores genéticos relacionados con la microtia existen algunos estudios en la literatura que los abordan (Tingaud-Sequeira et al., 2021). Sin embargo, es relevante estudiar a pacientes de origen latinoamericano debido a la alta frecuencia de microtia reportada (Shaw et al., 2004) y a la escasa información que existe sobre su etiología (Estandia-Ortega et al., 2022).

*TCOF1* se seleccionó como un gen candidato porque se ha demostrado que se expresa en las estructuras derivadas del primero y segundo arcos faríngeos durante la embriogénesis (Vitelli et al., 2003; Dixon et al., 2006; Cox et al., 2014), existe un modelo murino *knock-out* para el gen ortólogo (*tcof1*) que genera microtia (Valdez et al., 2004; Dai et al., 2016; Gendron et al., 2016) y variantes patogénicas en este gen son causales de TCS (Luquetti et al., 2012; Gendron et al., 2016).

Dado lo anterior el presente estudio tuvo como objetivo la identificación de variantes génicas en *TCOF1* en pacientes mexicanos con microtia como expresión mínima del EFAV, con el fin de contribuir al conocimiento sobre la etiología de la microtia y con ello brindar un asesoramiento genético de certeza a las familias.

En los pacientes estudiados se reportaron 6 variantes no sinónimas en el gen *TCOF1* de los 49 pacientes estudiados. Cinco de estas variantes fueron clasificadas como benignas y una como probablemente benigna, por lo que se considera que su presencia no se considera causal del fenotipo de microtia /EFAV.

En el análisis de asociación de la FA de las variantes no sinónimas identificadas en nuestra población considerando la FA reportada en individuos mexicanos de Los Ángeles (Proyecto 1000 Genomas), no se observó una diferencia estadísticamente significativa en ninguna variante, por lo tanto no se relacionan con riesgo o protección para microtia/EFAV.

También se identificaron 4 variantes sinónimas en las cuales existe un cambio de una base nitrogenada por otra pero que conservan la misma estructura de aminoácidos. Al comparar sus FA con las del grupo de referencia, se mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) sólo en la variante p.(Gly587=) en *TCOF1*. La FA para esta variante fue mayor en el grupo de referencia, lo cual sugiere que puede considerarse un factor protector para microtia/EFAV en lugar de riesgo en la población mexicana, como se ha reportado para variantes en otros genes asociadas a otras malformaciones (Lupo et al., 2019).

Las variantes sinónimas, se sabe que pueden tener consecuencias funcionales a pesar de que el cambio no altere la secuencia de aminoácidos de la proteína. Las variantes sinónimas pueden afectar la unión del factor de transcripción, splicing del pre-ARNm, la estabilidad y estructura secundaria del ARNm y, el doblamiento cotranslacional, por lo que pueden alterar la estructura y por lo tanto la función de la proteína (Pagani et al, 2005; Plotkin et al, 2011; Stergachis et al, 2013; Pechmann et al, 2013; Presnyak et al, 2015).

Existe un reporte en la literatura sobre una variante sinónima *novel* en el gen *TCOF1* c.3612A>C que se consideró causal de TCS. Se realizó RT-PCR de los exones 21-23 de *TCOF1*, en donde el paciente tuvo un producto de 110 pb, en contraste con el producto de 291 pb del control. La secuenciación del producto del RT-PCR más corto mostró pérdida del exón 22, la cual predice un cambio en el marco de lectura con un codón de paro prematuro en el exón 23. En ninguna de las isoformas resultantes del *splicing* de *TCOF1* que se han reportado se observa la pérdida de este exón. La traducción del transcrito aberrante genera una proteína con ausencia de 320 aminoácidos C-terminal, lo que corresponde a aproximadamente 21% de la proteína "treacle". Este reporte resalta la importancia del estudio de las variantes sinónimas, en este gen y en otros genes candidatos de microtia (Macaya et al., 2009).

En nuestra población de estudio no se observaron variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS en este gen por lo que sería importante expandir el número de genes de estudio o considerar exoma (Xue et al., 2015), para tratar de comprender la etiología de esta entidad pues en la mayoría de los casos de microtia/EFAV no ha sido identificada.

## BIBLIOGRAFÍA

Alasti F and Van Camp G. Genetics of microtia and associated syndromes. *J Med Genet* 2009; 46(6):361-369.

Berenguer M, Darnaudery M, Claverol S, Bonneu M, Lacombe D and Rooryck C. Prenatal retinoic acid exposure reveals candidate genes for craniofacial disorders. *Sci Rep* 2018; 8(1):17492.

Cox TC, Camci ED, Vora S, Luquetti DV, and Turner EE. The genetics of auricular development and malformation: New findings in Model Systems Driving Future Directions for Microtia Research. *European Journal of Medical Genetics*. 2014; 57(8), 394–401.

Dai J, Si J, Wan M, Huan L, Fan B, Sh J, Wang X, and Shen G. TCOF1-related molecular networks in Treacher Collins syndrome. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2016; 27(6): 1420–1426.

Dixon J, Jones N, Sandell L, Jayasinghe S, Crane J, Rey J, Dixon M, and Trainor P. Tcof1/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(36):13403-13408.

Estandia-Ortega B, Fernández-Hernández L, Alcántara-Ortigoza MA, and González-Del Angel A. Proposed clinical approach and imaging studies in families with oculo-auriculo-vertebral spectrum to assess variable expressivity. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 2022; 188(5), 1515–1525.

Estandia-Ortega B, Reyna-Fabián ME, Velázquez-Aragón JA, González-del Angel A, Fernández-Hernández L, and Alcántara-Ortigoza MA. The enigmatic etiology of oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): An exploratory gene variant interaction approach in candidate genes. *Life*. 2022; 12(11), 1723.

Foroud T, Wetherill L, Vinci-Booher S, Moore ES, Ward RE, Hoyme E, Robinson LK, Rogers J, Meintjes EM, Molteno CD, Jacobson JL and Jacobson SW. Relation over time between facial measurements and cognitive outcomes in fetal alcohol exposed children. *Alcohol Clin Exp Res* 2012; 36(9): 1634–1646.

Gendron C, Schwentker A and van Aalst JA. Genetic Advances in the Understanding of Microtia. *J Pediatr Genet* 2016; 5(4):189-197.

Grzanka M and Piekiełko-Witkowska A. The role of TCOF1 gene in health and disease: Beyond Treacher Collins syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(5), 2482.

Lammer E, Chen D, Hoar R, Agnish N, Benke P, Braun J, Curry C, Fernhoff P, Grix A, Lott I, and Richard J. Retinoic Acid Embryopathy. *New England Journal of Medicine*. 1985; 315(4), 262-263.

Lupo PJ, Mitchell LE and Jenkins MM. Genome-wide association studies of structural birth defects: A review and commentary. *Birth Defects Res* 2019; 111(18):1329-1342.

Luquetti DV, Heike CL, Hing AV, Cunningham ML, and Cox TC. Microtia: Epidemiology and Genetics. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2012; 158A(1), 124–139.

Macaya D, Katsanis SH, Hefferon TW, Audlin S, Mendelsohn NJ, Roggenbuck J, and Cutting, GR. A synonymous mutation in *intcof1* causes Treacher Collins syndrome due to mis-splicing of a constitutive exon. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2009; 149A(8), 1624–1627.

Merlob P, Stahl B, and Klinger G. Tetrad of the possible mycophenolate Mofetil Embryopathy: A review. *Reproductive Toxicology*. 2009; 28(1), 105–108.

McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M and De Pisto MA. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*. 2010; 20:1297-1303.

Muñoz-Pedroza LA and Arenas-Sordo ML. Clinical features of 149 patients with facio-auriculo-vertebral spectrum. *Acta Otorrinolaringologica*. 2013; 64(5), 359–362.

Pagani F, Raponi M, and Baralle FE. Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102(18), 6368–6372.

Pechmann S and Frydman J. Evolutionary conservation of codon optimality reveals hidden signatures of cotranslational folding. *Nature Structural Molecular Biology*. 2013; 20(2), 237–243.

Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, Martin S, Morris N, Kline N, Olson S, Weinberg D, Baker KE, Graveley BR and Collier J. Codon optimality is a major determinant of mrna stability. *Cell*. 2015, 160(6).

Plotkin JB and Kudla G. Synonymous but not the same: The causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*. 2010, 12(1), 32–42.

Programa de Vigilancia de Defectos Congénitos del Departamento de Genética y Defectos Congénitos; Universidad Autónoma de Nuevo León. 2014.

Richards S, Aziz N, Bale S, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, and Rehm HL. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17, (5), 405-424.

Shaw GM, Carmichael SL, Kaidarova Z, and Harris JA. Epidemiologic characteristics of anotia and microtia in California, 1989-1997. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004; 70 (7), 472-475.

Shows KH, and Shiang, R. Regulation of the mouse Treacher Collins syndrome homolog (TCOF1) promoter through differential repression of constitutive expression. *DNA and Cell Biology*. 2008; 27(11), 589–600.

Singhal D and Tripathy K. Oculo Auriculo Vertebral Spectrum. In *StatPearls*. StatPearls Publishing, 2023.

Stergachis AB, Haugen E, Shafer A, Fu W, Vernot B, Reynolds A, Raubitschek A, Ziegler S, LeProust EM, Akey JM and Stamatoyannopoulos JA. Exonic transcription factor binding directs codon choice and affects protein evolution. *Science*. 2013, 342(6164), 1367–1372.

Suutarla S, Rautio J, Ritvanen A, Ala-Mello S, Jero J and Klockars T. Microtia in Finland: Comparison of characteristics in different populations. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2007; 71(8), 1211–1217.

Su PH, Yu JS, Chen Jy, Chen SJ, Li SY, and Chen HN. Mutations and new polymorphic changes in the TCOF1 gene of patients with oculo–auriculo–vertebral spectrum and Treacher–Collins syndrome. *Clinical Dysmorphology*. 2007; 16(4), 261–267.

Tingaud-Sequeira A, Trimouille A, Salaria M, Stapleton R, Claverol S, Plaisant C, Bonneu M, Lopez E, Arveiler B, Lacombe D and Rooryck C. A recurrent missense variant in *EYA3* gene is associated with oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Hum Genet* 2021;140(6):933-944.

Valdez B, Henning D, So R, Dixon J, and Dixon M. The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(29):10709-10714.

Xue Y, Ankala A, Wilcox WR and Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med* 2015; 17(6):444–451.

Zhang QG, Zhang J, Yu P, and Shen H. Environmental and genetic factors associated with congenital microtia: A case-control study in Jiangsu, China, 2004 to 2007. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2009; 124(4), 1157–1164.