



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN CANDIDATO *HOXA2* EN UNA MUESTRA DE
PACIENTES MEXICANOS CON ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
ESTANDÍA ORTEGA BERNARDETTE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX, NOVIEMBRE, 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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 09 de octubre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ESTANDÍA ORTEGA BERNARDETTE** con número de cuenta **507210728**, con la tesis titulada "**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN CANDIDATO HOXA2 EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL**:

Presidente: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
Vocal: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA
Secretario: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ
Suplente: DR. CARLOS SABAS CRUZ FUENTES
Suplente: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 06 de noviembre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM y a todos los que lo conforman por su extraordinaria asesoría y ayuda.

A los apoyos recibidos por CONACYT mediante la beca recibida a lo largo de la maestría.

A la Dra. Ariadna González del Ángel a quien tuve el honor de tener como tutora del proyecto de investigación de la maestría, le agradezco de manera especial por la confianza que tuvo en mí y por haberme brindado en todo momento su valioso apoyo, asesoría y ayuda para cumplir esta meta.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Marisol López López y el Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz, a quienes agradezco profundamente su calidez, objetividad e interés genuino al asesorarme durante la realización de mi proyecto de investigación. Fue un placer contar con su invaluable apoyo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Jerry, mi esposo, por creer siempre en mí y por darme el mayor impulso y motivación para llevar a cabo este proyecto. Es maravilloso caminar a tu lado!

A mis hijos Regina y Emiliano quienes sin duda siempre han sido mi mayor inspiración cada día. Me encanta tener su corazón tan cerca del mío!

A mis papás y mis hermanas por su amor incondicional en todo momento, la familia es lo más valioso al final del día.

A la Dra. Ariadna González del Angel a quien le agradezco de manera muy especial por su valiosa guía, confianza y apoyo incondicional a lo largo de esta grata experiencia. Gracias por su cariño e interés en verme crecer en el ámbito profesional y académico y porque siempre ha sido un placer para mí trabajar a su lado!

Al Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza por permitirme el honor de formar parte de su equipo de trabajo, por darme la oportunidad de desarrollarme más cada día en el ámbito profesional y por su apoyo y cariño siempre.

A la Dra. Liliana Fernández por el invaluable trabajo en equipo, su enorme ayuda y amable disposición durante la elaboración de este proyecto. Es un gusto colaborar juntas!

A mis amigos del Laboratorio de Biología Molecular: Lily, Miriam, Nancy, Majo y José por sus palabras de aliento, porras, risas, ayuda y cariño antes, durante y después de la maestría.

A todos mis maestros por transmitirme su valioso conocimiento y experiencia en esta etapa.

ÍNDICE

Índice de figuras y tablas	I
Resumen	1
Abstract.....	3
Antecedentes	5
Pregunta de investigación	13
Planteamiento del problema	13
Justificación	13
Objetivos	14
Clasificación de la investigación	15
Población elegible	15
Criterios de selección	15
Criterios de inclusión	15
Criterios de exclusión	15
Metodología	16
Descripción general	16
Tamaño de la muestra	19
Variables	19
Análisis estadístico	21
Aspectos éticos	21
Consideraciones de bioseguridad	21
Resultados	21
Discusión.....	28
Conclusiones	31
Literatura citada	33
Anexo #1 Hoja de captación de datos.....	38
Anexo #2 Carta de consentimiento informado para los padres/tutor.....	43
Anexo #3 Carta de consentimiento informado para sujetos en investigación.....	46
Anexo #4 Carta de asentimiento informado.....	49
Anexo #5 Carta de consentimiento informado para los padres/tutor de familiar afectado	51
Anexo #6 Carta de consentimiento informado para familiar afectado	54
Anexo #7 Carta de asentimiento informado para familiar afectado	57
Anexo #8 Secuencias de oligonucleótidos para amplificación por PCR del gen <i>HOXA2</i>	59

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.....	6
Figura 2.....	11
Figura 3.....	12
Figura 4.....	25
Figura 5.....	25
Figura 6.....	26
Figura 7.....	27
Figura 8.....	27
Tabla 1.....	8
Tabla 2.....	20
Tabla 3.....	22
Tabla 4.....	23
Tabla 5.....	24

RESUMEN

La microtia es una de las malformaciones congénitas más frecuentes (1/3000 nacimientos), sin embargo, cuando se presenta de manera aislada, en la mayoría de los casos únicos su etiología suele ser desconocida, mientras que en los casos familiares puede ser monogénica y en menor frecuencia multifactorial.

Uno de los genes involucrados en la embriogénesis del pabellón auricular es *HOXA2* por lo que variantes patogénicas o benignas en este podrían ser causales o predisponer a la presencia de microtia. Se consideró importante realizar el presente trabajo de investigación ya que a pesar de ser una malformación frecuente, a nivel internacional se conoce poco sobre su etiología ya que, con excepción del gen *HOXA2*, no hay estudios que hayan identificado variantes en otros genes que sean causales de la microtia y en México no existen reportes al respecto.

Cuanto la microtia se presenta asociada a otras malformaciones como vertebrales y/o renales se establece el diagnóstico de espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV). Sin embargo, a pesar de que la microtia se conoce como una entidad con amplia expresividad clínica, no existe un consenso que establezca exactamente qué estudios deben solicitarse para determinar expresión mínima en los padres y/o familiares.

Es un estudio observacional, descriptivo, transversal y prospectivo en el que se incluyeron, previa firma de consentimiento y/o asentimiento informado, casos únicos o familiares con microtia como expresión mínima de EFAV, de cualquier sexo y edad, de la consulta de Genética del Instituto Nacional de Pediatría. El tamaño de muestra se consideró a conveniencia con un mínimo de 100 pacientes, ya que se esperaba identificar variantes génicas con una frecuencia alélica igual o mayor a 0.05. Se realizó historia clínica con genealogía y exploración física, así como tomografía axial computarizada (TAC) de oído, ortopantomografía, radiografía de columna vertebral completa, ultrasonido renal y estudios audiológicos. Se incluyeron a los padres de los pacientes en quienes se realizó el mismo abordaje clínico y estudios de gabinete (excepto TAC de oído y estudios audiológicos) para descartar expresión mínima. Se tomó una muestra de sangre y/o de células de descamación de mucosa oral para la extracción de DNA. Se realizó PCR y secuenciación automatizada tipo Sanger de los exones codificantes y regiones unión exón-intrón del gen *HOXA2* para identificar variantes génicas en estado homocigoto o heterocigoto. En caso de identificar una variante génica en el caso índice, ésta se buscaría de manera dirigida en los padres y otros familiares. Las variantes génicas no descritas serían sometidas a evaluación *in silico* mediante programas que predicen un efecto dañino sobre la proteína resultante y/o durante splicing, y además se aplicaría el puntaje para interpretación del efecto biológico de variantes génicas recomendado por el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y de la Asociación de Patología Molecular en: patogénicas, probablemente patogénicas, probablemente benignas, benignas y de significado incierto.

Se captaron 22 pacientes (13 varones, 9 mujeres) con diagnóstico de microtia como expresión mínima de EFAV. Acorde a lo descrito en la literatura la mayoría de los casos fueron únicos (59%). Con relación al modo de herencia de los casos familiares de esta muestra, en la mayoría (66%) se sugirió una herencia multifactorial y en el 33% una herencia mendeliana (autosómica dominante o recesiva), contrario a lo descrito

previamente en población mexicana (n=145) en la que el 66% de los casos se consideró esporádico, el 28.3% autosómico dominante y el 5.5% autosómico recesivo. Los pacientes analizados presentaron características clínicas similares a las reportadas en la literatura con relación a la microtia. Dentro de las malformaciones asociadas se observaron: displasia de la cadena osicular (72%), microsomía hemifacial (38%), alteración en oído interno (4%) y alteraciones costales/vertebrales (4%); pero no se identificaron alteraciones a nivel renal, las cuales se han observado en el 5-23% de los pacientes con EFAV en otras poblaciones. Con base en estos hallazgos se sugiere que el abordaje clínico de pacientes con microtia como expresión mínima de EFAV se realice mediante exploración física completa, TAC de oídos, ortopantomografía y radiografía completa de columna vertebral, excepto ultrasonido renal. En las 22 madres y 16 padres incluidos, considerados individuos sanos antes de los estudios con excepción de 1 padre con apéndice preauricular derecho, se identificaron manifestaciones clínicas tales como microsomía hemifacial (~21%) y alteraciones vertebrales (~5%) las cuales sugieren expresividad mínima en la familia. Por lo anterior, la realización de la ortopantomografía y la radiografía de columna vertebral completa en los padres modificó la clasificación de algunos casos de únicos a familiares, el modo de herencia y el asesoramiento genético como ocurrió en un caso (EFAV-57) que no contaba con antecedentes heredofamiliares en la genealogía y que después de la realización de los estudios de gabinete en los padres se reclasificó de único a familiar con herencia autosómico dominante dado que el padre presentó alteración a nivel vertebral y renal.

En la secuencia codificante del gen *HOXA2* no se identificaron variantes génicas patogénicas (VGP) ni benignas (VPB) en la población de estudio. El no haber observado variantes génicas patogénicas podría explicarse porque el 59% de nuestros casos no fueron familiares con un modo de herencia definido a diferencia de los tres casos publicados de microtia, de origen iraní y caucásico, 1 con una variante probablemente patogénica y 2 con una variante patogénica en *HOXA2*. También podría explicarse por el reducido tamaño de muestra o a que variantes patogénicas en este gen sean una causa de microtia poco frecuente en poblaciones de origen hispano como la nuestra. Tampoco se identificaron variantes génicas benignas lo cual puede deberse a: a) la frecuencia alélica reportada de <0.01% para las variantes en *HOXA2* registradas en las principales bases de datos genotípicos, b) la variabilidad que puede existir en la frecuencia de estas variantes entre poblaciones y c) al reducido tamaño de la muestra.

El incremento en el tamaño de muestra y un abordaje por secuenciación de nueva generación de un panel de otros genes candidato (por ejem. *TCOF1*, *SALL1*, *EYAI* y *TBX1*) podría ampliar la posibilidad de identificar VGP o VGB asociadas a la microtia en nuestra población.

ABSTRACT

Microtia is one of the most frequent congenital anomalies (1/3000 births). When it occurs as an isolated birth defect is often a sporadic trait, although it may occasionally segregate following autosomal dominant or recessive inheritance patterns and in most of the single cases its etiology is usually unknown whereas in the familial cases it may be monogenic and in lower frequency multifactorial.

One of the genes involved in the embryogenesis of the external ear (auricle) is *HOXA2*, so that pathogenic or benign variants in it could be causal or predispose to the presence of microtia. It was considered important to carry out the present research work since microtia is a frequent malformation and little is known about its etiology, with the exception of the *HOXA2* gene, there are no international studies that have identified causal variants in other genes and in Mexico there are no reports on this.

When microtia is associated with vertebral and / or renal malformations, the diagnosis of oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS) is established. Since microtia is known as an entity with wide clinical expressivity, there is no consensus that establishes exactly what exams should be indicated to determine minimal expression in parents and / or siblings.

This is an observational, descriptive, cross-sectional and prospective study in which single or familial cases with microtia as a minimal expression of OAVS, of any gender or age and with written informed consent, were included at the Department of Genetics of the National Institute of Pediatrics. The sample size was considered at convenience with a minimum of 100 patients, since it was expected to identify genetic variants with an allelic frequency equal to or greater than 0.05. Clinical history with genealogy and physical examination, as well as computed axial tomography (CT) of the ear, orthopantomography, complete spine radiography, renal ultrasound and audiological studies were performed. We included the parents of patients in whom the same clinical approach and cabinet studies (except ear CT and audiological studies) were performed to rule out minimal expression of microtia. A blood and / or oral mucosal desquamation cells sample were taken for DNA extraction. We performed PCR and automated Sanger sequencing of coding exons and exon-intron junction regions of the *HOXA2* gene to identify genetic variants in homozygous or heterozygous state. In the case of identifying a genetic variant in the index case, it would be searched in a directed way in the parents and other relatives. The non-described genetic variants would be subjected to *in silico* evaluation by programs that predict a deleterious effect on the resulting protein and / or during splicing, and would also apply the score for interpretation of the biological effect of genetic variants recommended by the American College of Medical Genetics and Genomics in pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign and benign.

Our study population was comprised of 22 unrelated probands (13 males, 9 females) with microtia as a minimal expression of OAVS. According to the literature, most cases were single (59%). Regarding the mode of inheritance of the familial cases of this sample, a majority of the cases (66%) suggested a multifactorial inheritance and a Mendelian inheritance (autosomal dominant or recessive) in 33%, contrary to what was

previously described in the Mexican population (n = 145) in which 66% of the cases were considered sporadic, 28.3% autosomal dominant and 5.5% autosomal recessive.

The analyzed patients presented clinical characteristics similar to those reported in the literature in relation to the microtia. Among the associated malformations were: ossicular chain dysplasia (72%), hemifacial microsomia (38%), alteration in the inner ear (4%) and costal / vertebral alterations (4%); but no alterations were identified at the renal level, which have been observed in 5-23% of patients with OAVS in other populations.

Based on these findings, it is suggested that the clinical approach of patients with microtia as a minimal expression of OAVS is performed by complete physical examination, axial computed tomography, orthopantomography and complete spine radiography, except renal ultrasound. Clinical manifestations such as hemifacial microsomia (~ 21%) and vertebral alterations (~ 5%) were identified in some of the included mothers (n=22) and fathers (n=16), considered as healthy individuals before the studies with the exception of 1 father with a right preauricular appendix suggesting expressivity minimum in the family. Because of the above, the performance of orthopantomography and complete spine radiography in the parents modified the classification of some cases from single to familial, mode of inheritance and genetic counseling as happened in one case (EFAV-57) that did not had a family history of microtia in the genealogy and that after the completion of the studies of cabinet in the parents was reclassified from single to familial with autosomal dominant inheritance given that the father presented vertebral and renal anomalies.

In the coding sequence of the *HOXA2* gene no pathogenic or benign genetic variants were identified in the study population. Failure to observe pathogenic genetic variants (PGV) could be explained by the fact that 59% of our cases were not familial with a defined mode of inheritance unlike the three published cases of microtia, of Iranian and Caucasian origin, 1 with a likely pathogenic variant and 2 with a pathogenic variant in *HOXA2*. This could also be explained by the reduced sample size or to which pathogenic variants in this gene are an unfrequent cause of microtia in hispanic populations as ours. Neither benign genetic variants (BGV) were identified, which may be due to: a) the reported allele frequency of <0.01% for the variants in *HOXA2* recorded in the main genotypic databases, b) the variability that may exist in the frequency of these variants between populations and c) the small sample size.

The increase in sample size and a new generation sequencing approach of a panel of other candidate genes (eg *TCOF1*, *SALL1*, *EYA1* and *TBX1*) could raise the possibility of identifying PGV or BGV associated with microtia in our population.

ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN CANDIDATO *HOXA2* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

ANTECEDENTES

Aspectos epidemiológicos

La microtia (del *latín* "pequeña oreja") es una malformación congénita del pabellón auricular y del conducto auditivo externo que se origina por una alteración en la embriogénesis del mesénquima del primero y segundo arcos branquiales entre las semanas 5 y 6 de gestación (Carey et al., 2006; Cox et al., 2014). A nivel mundial la microtia tiene una incidencia de 1/500-1/3,000 recién nacidos vivos y una prevalencia de 0.83-17.44/10,000 nacimientos; sin embargo, estas varían según el origen étnico. Se ha documentado un mayor riesgo en los individuos originarios de Asia, Islas del Pacífico, Chile, Ecuador e hispanos y un menor riesgo en caucásicos y afroamericanos (Suutarla et al., 2007; Luquetti et al., 2012). 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 (<http://www.icbdsr.org/filebank/documents/ar2005/Report2014>).

Características fenotípicas

La microtia predomina en el sexo masculino (2:1), es más común que sea unilateral (~79-93%) y del lado derecho (~60%), mientras que los casos bilaterales suelen acompañarse con mayor frecuencia de otras alteraciones (Alasti y Van Camp, 2009). La microtia considerada como una expresión mínima del espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV), presenta gran variabilidad fenotípica por lo que el desarrollo de un sistema de clasificación clínica ideal ha sido un reto. Se han sugerido diferentes clasificaciones para la microtia a través del tiempo (Marx, 1926; Tanzer, 1978; Weerda, 1988). Una de las más utilizadas es la descrita por Hunter, la cual se considera sencilla y útil para la práctica diaria y en la cual se describen cuatro grados: I: estructura normal y disminución en la longitud de -2 desviaciones estándar (DE), es decir, una longitud aproximada de 3-5 cm con base a la edad cronológica (0 meses a 18 años), II: algunas estructuras normales y longitud de -2 DE, III: ninguna estructura normal y longitud de -2 DE y IV: anotia o ausencia total del pabellón auricular (Feingold y Bossert, 1974; Hunter et al., 2009) (Figura 1).



Además, la microtia puede acompañarse de microsomía hemifacial y alteraciones oculares, vertebrales, cardíacas, renales, entre otras. En el 85-90% de los casos se identifica hipoacusia conductiva por atresia o estenosis del conducto auditivo externo (CAE) y en el 3-9% hipoacusia neurosensorial (Suutarla et al., 2007). Cuando se presentan malformaciones asociadas a la microtia como vertebrales y/o renales se establece el diagnóstico de espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV). En la literatura existe controversia sobre el abordaje de la microtia como una entidad diferente al EFAV, sin embargo varios autores indican que la microtia es una expresión mínima del EFAV y lo consideran una misma patología (Luquetti et al., 2012; Cox et al., 2014). Por otro lado, no existe un consenso sobre cuáles son los estudios de gabinete (e.g. ortopantomografía, radiografía de columna completa, ultrasonido renal) que se deben solicitar a los padres y a los familiares de los pacientes con EFAV como parte de un abordaje clínico integral para descartar expresividad mínima y poder clasificar adecuadamente a los casos únicos vs familiares y con base en esto brindar un asesoramiento genético de certeza.

Etiología de la microtia

La microtia tiene una etiología muy heterogénea por lo que con base en la información obtenida durante el interrogatorio y la exploración física del paciente se debe determinar si es una alteración aislada o forma parte de una entidad sindrómica, acompañada de otras malformaciones y/o alteraciones en crecimiento somático y/o retraso en el neurodesarrollo, siendo la forma sindrómica más frecuente el EFAV. Los casos de microtia que son sindrómicos pueden tener una etiología cromosómica, mendeliana o teratogénica. Al realizar la genealogía e interrogar los antecedentes heredo-familiares (AHF), se puede definir si el caso de microtia (EFAV) es único (si solo el probando está afectado) o es familiar (si otros miembros de la familia tienen la misma entidad) e incluso se puede evidenciar algún modo de herencia. En el 50-85% de las ocasiones la microtia (EFAV) se presenta en forma aislada y la etiología más frecuente en los casos únicos suele ser desconocida por lo que se consideran esporádicos, mientras que en los casos familiares la causa puede ser monogénica autosómica dominante (AD) o autosómica recesiva (AR) e incluso se ha observado, en un menor número de casos, herencia multifactorial (Llano-Rivas et al., 1999; Alasti y Van Camp, 2009; Muñoz-Pedroza y Arenas-Sordo, 2013).

Factores ambientales

En la herencia multifactorial participan factores genéticos (variantes génicas) y factores ambientales de los cuales ya se han identificado algunos. En la literatura existen estudios de casos y controles sobre la asociación de exposición a ciertos factores ambientales durante el embarazo y mayor riesgo de microtia en el recién nacido. Algunos de estos factores de riesgo son: enfermedades maternas como la diabetes mellitus preconcepcional [OR 8.7 (IC:1.2-96.4) (Mastroiacovo et al., 1995), OR 3.75 (IC:1.04-13.51) (Correa et al., 2008)] y el consumo de teratógenos durante el embarazo como el alcohol [OR 4.065 (IC:1.764-9.212, p 0.01) (Lee et al., 2012)], retinoides [OR 25.6 (IC:11.4-57.5) (Lammer et al., 1985)] y mofetil-micofenolato [11/12 pacientes (Merlob et al., 2009) y 12/14 pacientes (Anderka et al., 2009)]. Por otro lado, la ingesta periconcepcional de suplementos vitamínicos con ácido fólico se ha asociado con un riesgo reducido de microtia en mujeres no-obesas [OR 0.63 (IC:0.44-0.91) (Ma et al., 2010)]. Sin embargo, los factores genéticos que contribuyen a la presencia de microtia aún no se han definido con certeza (Llano-Rivas et al., 1999).

Factores genéticos

La evidencia de la participación del genoma en el desarrollo de la microtia incluye: a) identificación de familias con herencia AD, AR y multifactorial (Llano-Rivas et al., 1999), b) mayor concordancia entre gemelos monocigóticos contra dicigóticos (38.5% vs 4.5%) (Artunduaga et al., 2009), c) diferencia en la prevalencia de microtia según el origen étnico [hispanos RR 6.5 (3.5-12.1), asiáticos RR 3.2 (1.4-7.4) (Shaw et al., 2004), originarios de las islas del Pacífico RR 2.26 (1.24-4.32) y filipinos RR 2.34 (1.23-4.64) (Forrester y Merz, 2005)], d) modelos animales (en particular murinos) con variantes génicas patogénicas en ciertos genes ortólogos (*Hoxa2*, *homeobox 2A*; *Tcof1*, *treacle ribosome biogenesis factor 1*; *Eya1*, *eyes absent*; *Tbx1*, *T-box 1*) (Luquetti et al., 2012; Minoux et al., 2013) que conducen al desarrollo de microtia como en el ser humano (*HOXA2*, *TCOF1*, *EYAI* y *TBX1*) (Alasti et al., 2008; Brown et al., 2013; Luquetti et al., 2012; Piceci et al., 2017), d) descripción de más de 50 síndromes genéticos (cromosómicos y monogénicos) que cursan con microtia (Luquetti et al., 2012).

Estudios genéticos

Se han realizado diversos estudios sobre genes con probable participación en la ocurrencia de microtia tanto en modelos animales, como en síndromes genéticos en humanos (Luquetti et al., 2012; Cox et al, 2014; Gendron et al, 2016) (Tabla 1).

Tabla 1. Genes relacionados con microtia	
Gen (es)	Síndrome en humanos
<i>FGF3</i>	Aplasia del laberinto, microtia y microdontia
<i>PLCB4, GNAI3</i>	Auriculo-condilar
<i>SIX 1*</i> , <i>EYAI*</i>	Braquio-ótico
<i>SIX 5*</i> , <i>EYAI*</i>	Braquio-oto-renal
<i>CHD7</i>	CHARGE
<i>EFTUD2</i>	Disostosis mandibulofacial con microcefalia
<i>HMX1*</i>	Espectro facio-aurículo- vertebral
<i>FRAS1, FREM2*</i> , <i>GRIP1</i>	Fraser
<i>MLL2, KDM6A</i>	Kabuki
<i>GDF6</i>	Klippel-Feil
<i>FGFR2, FGRF3, FGF10*</i>	Lacrimo-aurículo-dental-digital
<i>ORC1, ORC4, ORC6, CDT1, CDC6</i>	Meier-Gorlin (Ear-patella-short stature)
<i>GSC*</i>	Microsomía craneofacial
<i>HOXA2*</i>	Microtia, hipoacusia y paladar hendido
<i>DHODH</i>	Miller
<i>SF3B4</i>	Nager
<i>SALL1*</i>	Townes-Brocks
<i>TCOF1*</i> , <i>POL1RC, POL1RD</i>	Treacher Collins
<i>TBX1*</i>	Velo-cardio-facial
*También en modelos animales	

A continuación se comenta la evidencia de la participación de los genes *TCOF1*, *SALL1*, *EYAI* y *TBX1* en la presencia de microtia.

- *TCOF1*

En humanos, mutaciones en el gen *TCOF1* han sido asociadas con el síndrome de Treacher Collins Franceschetti (TCS; OMIM#154500), que cursa con malformaciones de oído externo y medio, así como hipoacusia conductiva (Isaac et al., 2000). El modelo murino del síndrome de Treacher Collins (*Tcof1*^{+/-}) muestra una penetrancia y expresividad de este síndrome similar a lo observado en humanos (Dixon et al., 2004). En 2007 se publicó un estudio de búsqueda de variantes génicas patogénicas en el gen *TCOF1* en pacientes con fenotipo de EFAV (n=4). Se identificó una mutación en un caso con cuadro clínico característico (microtia y atresia de CAE izquierdo, hipoplasia maxilar y mandibular ipsilateral, dermoide epibulbar y espina bífida C5-C7), de sentido erróneo en el exón 9 (c.1084G>A o p.Ala362Thr), definiendo su patogenicidad por ser una variante génica de sentido erróneo *de novo* y no identificada en 114 controles y dos variantes génicas sinónimas en los exones 10 y 23; en los otros 3 pacientes no se detectaron variantes génicas (Su et al., 2007). A la fecha es el único caso en el que se reporta una variante génica patogénica en el gen *TCOF1* en pacientes con cuadro clínico de EFAV y sin características clínicas típicas del síndrome de Treacher Collins.

- *EYAI*

En modelos murinos, se ha observado que los homocigotos para una mutación nula en el gen *Eya1*, presentan malformaciones o ausencia de los canales semicirculares y la cóclea, mientras que los heterocigotos cursan con alteraciones moderadas o leves en las estructuras del oído (Zou et al., 2008). Dado que *EYAI* participa en la formación del oído externo y medio en los humanos y es el gen causal de una entidad sindrómica (Branquio-oto-renal (BOR) (OMIM *113650) y Branquio-ótico (BOS1) (OMIM *602588)) que cursa con alteraciones auriculares, se ha sugerido que pueda estar implicado en casos de microtia aislada. Sin embargo, en tres familias con fenotipo de síndrome de Goldenhar con transmisión familiar AD no se identificaron variantes génicas en *EYAI* (Goodin et al., 2009).

- *SALL1*

En el modelo murino se demostró que la delección homocigota en *Sall1*, resulta en la falla del crecimiento de la yema ureteral con apoptosis del mesénquima lo que ocasiona displasia renal o agenesia completa (Nishinakamura et al., 2001), más no se identificaron alteraciones auriculares. Mutaciones en *SALL1* en humanos condicionan el síndrome de Townes-Brocks (TBS, OMIM#107480) caracterizado por pabellones auriculares malformados, apéndices preauriculares e hipoacusia neurosensorial, entre otras malformaciones. En algunos de los pacientes en los que se sobrelapa el cuadro clínico de TBS y EFAV se han identificado variantes génicas patogénicas y benignas en *SALL1*. En el primer caso se identificó en una paciente con fenotipo de EFAV la variante génica patogénica c.1277-1278del en el gen *SALL1* (Gabielli et al., 1993), en otro grupo de investigación en 4/ 8 casos se identificó la variante génica patogénica sin sentido c.826C>T en dicho gen (Keegan et al., 2001) y finalmente en una familia en la que la hermana mayor presentaba fenotipo de TBS, la hermana menor un fenotipo compatible con síndrome de Goldenhar y la madre displasia auricular, se identificó una mutación sin sentido en estado heterocigoto en ambas hermanas c.256T>A (Leu419*) (Kosaki et al., 2007).

- *TBX1*

Los ratones *Tbx1*^{-/-} presentan ausencia de oído externo y medio, oído interno con malformaciones que se caracterizan por ausencia de cóclea y/o del sistema vestibular. Los mutantes *Tbx1*^{+/-} presentan alteraciones en oído medio así como otitis media crónica, infiltración de células inflamatorias, engrosamiento submucoso y sordera asociada (Liao et al., 2004). Dado que el gen *TBX1* participa en la formación del oído y su haploinsuficiencia ocurre en el síndrome Velo-cardio-facial por la microdelección 22q11.2, es factible que puedan existir variantes génicas en pacientes con microtia aislada, sin embargo a la fecha no existen estudios en la literatura que lo evidencien.

Con base en la embriogénesis humana y los reportes en la literatura se seleccionó a *HOXA2* como uno de los primeros genes candidatos a ser estudiados en pacientes con microtia como expresión mínima de EFAV, ya que se expresa en el segundo arco branquial para la formación del oído externo durante la etapa embrionaria y

se sugiere que una deficiencia en su expresión podría originar malformaciones auriculares (Minoux et al., 2013; Cox et al., 2014).

HOXA2

(HGNC: 5103, Entrez Gene: 3199, Ensembl: ENSG00000105996, OMIM: 604685, UniProtKB: O43364, NG_012078.1 RefSeqGene, NM_006735.3).

A. ESTRUCTURA DEL GEN

Es un gen homeótico localizado en 7p15.2 y está conformado por 2,458 pb distribuidos en 2 exones y un intrón (Figura 2).

B. TRANSCRITOS

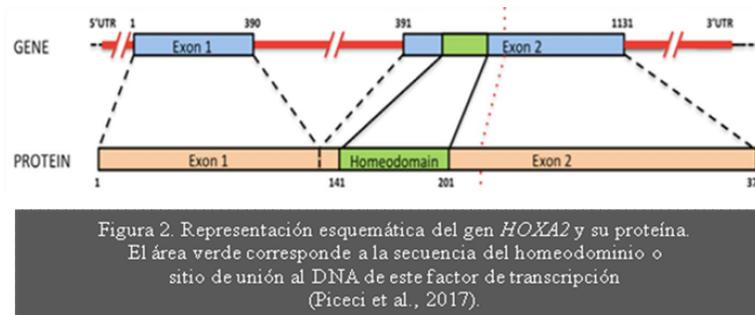
HOXA2 da lugar a dos transcritos por *splicing* alternativo: HOXA2-001 de 1814 pb que es traducido a una proteína de 376 aminoácidos (NM_006735.3), isoforma 1, la cual es la única codificante y HOXA2-002 de 1993 pb el cual retiene al intrón y no se traduce.

C. PROTEÍNA

La proteína codifica un factor de transcripción constituido por 376 aminoácidos que contiene un dominio de unión al DNA (homeodominio) entre los aminoácidos 146 y 202 (Figura 1). En el modelo murino, mediante análisis funcionales y moleculares se ha observado que *Hoxa2* controla la formación del pabellón auricular a través de la vía de señalización de *Bmp* (*bone morphogenetic protein*) al regular la expresión de *Bmp5* (*bone morphogenetic protein 5*), de *Bmp4* (*bone morphogenetic protein 4*) y de *Tsg* (*twisted gastrulation*). *Hoxa2* se une a la región no codificante de *Bmp4* y *Bmp5* lo que sugiere que son blancos directos; sin embargo, aunque estos genes no se expresan específicamente en el segundo arco branquial se requieren para la proliferación y diferenciación del cartílago auricular y de otras células (Minoux et al., 2013). Se ha observado que la inactivación de *Bmp5* resulta en microtia (Kingsley et al., 1992) y la de *Bmp4* impide parcialmente el desarrollo auricular (Minoux et al., 2010). Además, *Hoxa2* también regula la expresión de *Eya1* el cual es un coactivador transcripcional y fosfatasa que contribuye a regular la transcripción durante la organogénesis por lo que se requiere para el desarrollo embrionario normal de las estructuras craniofaciales como los pabellones auriculares. Por lo anterior, se considera a *Hoxa2* un regulador transcripcional fundamental en la coordinación de la morfogénesis de las estructuras auriculares (Minoux et al., 2013). Por otro lado, en un estudio con modelos murinos obtuvieron resultados mediante secuenciación masiva en paralelo con inmunoprecipitación de cromatina que sugieren que *Hoxa2* tiene una amplia cobertura genómica y es un potencial regulador de diversos genes, que incluye aquellos que participan en la vía de señalización Wnt involucrada en la formación del pabellón auricular (Donaldson et al., 2012).

D. EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Durante el periodo embrionario el gen *HOXA2* se expresa en el sistema nervioso (cerebro y tubo neural), así como en el mesénquima de la región craneofacial (sistema musculoesquelético) y crestas neurales del 2°, 3°, 4° y 6° arcos branquiales (www.genecards.org).



E. REGULACIÓN DEL GEN

Algunos de los genes que se expresan durante el desarrollo del pabellón auricular y que se han asociado a síndromes con microtia, como son *SIX1* (*homeobox 1*, síndrome Braquio-ótico o BO), *SIX5* (*homeobox 5*, síndrome Braquio-oto-renal o BOR), *EYA1* (*eyes absent*, síndrome BO o BOR) y *SALL1* (*spalt like transcription factor 1*, síndrome Townes Brocks), es posible que puedan estar involucrados en la regulación de la expresión de *HOXA2* en el segundo arco branquial. Sin embargo, la vía que regula a este gen aún no está bien descrita (Cox et al., 2014).

Por otro lado, un grupo de investigación abordó el análisis sobre los mecanismos reguladores que subyacen a la expresión específica de *Hoxa2* en las células de la cresta neural craneal y demostró en un modelo murino embrionario transgénico que los miembros de la familia de factores de transcripción AP-2 participan en la activación del *enhancer* de *Hoxa2* (*Krox20*) mediante su unión a una secuencia conocida como *NC4* ubicada hacia 3' del mismo (Maconochie et al., 1999).

F. MODELOS MURINOS

Se ha observado en el embrión murino con expresión ectópica de *Hoxa2* (es decir en el mesénquima del primer arco branquial, donde no se expresa normalmente) la presencia de duplicación "en espejo" de las estructuras auriculares, así como pequeños remanentes ectópicos de apéndices preauriculares (Minoux et al., 2013; Cox et al., 2014).

G. VARIANTES GÉNICAS DE *HOXA2* ASOCIADAS A MICROTIA EN HUMANOS

Existen tres reportes en la literatura en humanos con microtia causada por una variante génica patogénica en el gen *HOXA2* (OMIM *604685). El primero reporta una familia iraní consanguínea con cuatro mujeres con microtia bilateral grado II, hipoacusia mixta y paladar hendido incompleto, con un patrón de herencia AR

(Alasti et al., 2008). En esta familia se realizó el abordaje molecular mediante análisis de ligamiento amplio del genoma con 500 marcadores polimórficos (*simple tandem repeat polymorphisms*, STRP) y se delimitó la región del gen responsable en 7p14.3-7p15.3 (contiene 100 genes). Posteriormente se seleccionó a través de marcadores STRP a *HOXA* como el clúster de mayor interés en esta región (11 genes) y cuya secuenciación automatizada del gen *HOXA2* identificó una variante génica puntual de sentido erróneo en estado homocigoto (c.556C>A o p.Gln186Lys) en los individuos afectados. Esta variante génica es probablemente patogénica dado que ocasiona la sustitución de un residuo altamente conservado en la región del homeodominio de la proteína, los familiares heterocigotos eran sanos y no se identificó en controles (231 iraníes y 109 belgas). Además se identificó en los individuos afectados de la familia un haplotipo de riesgo para la enfermedad en ambos alelos (Alasti et al., 2008).

El segundo reporte describe una familia europea con siete miembros afectados con microtia bilateral, con/sin hipoacusia mixta (neurosensorial y conductiva) de herencia AD. Esta familia se estudió mediante exoma en cuatro de los individuos afectados y se identificó una variante génica puntual sin sentido en estado heterocigoto (c.703C>T o p.Gln235*). Esta variante sin sentido no fue encontrada en individuos sanos por lo que se consideró patogénica, aunque tras secuenciar todo el gen *HOXA2* no fue identificada como responsable de microtia en 119 casos provenientes de Colombia y Ecuador, países con las mayores prevalencias mundiales de microtia (Brown et al., 2013).

En el tercer reporte se describe una familia de origen italiano de cinco generaciones (seis afectados) con microtia bilateral de herencia AD. En tres de los miembros afectados de esta familia se realizó secuenciación tipo Sanger de la región codificante y de los bordes exón-intrón del gen *HOXA2*. Se identificó una variante génica (c.670G>T o p.Glu224*) en estado heterocigoto en el exón 2. Esta variante génica genera una proteína trunca, lo que sustenta que se trata de una variante patogénica (Piceci et al., 2017). En este artículo, se discute que se requieren más casos de familias con EFAV que presenten alguna variante génica patogénica en *HOXA2* para poder establecer una correlación genotipo-fenotipo más precisa (Figura 3).



H.VARIANTES GÉNICAS BENIGNAS

En una población de ocho pacientes con microtia aislada, siete de descendencia hispana y uno de descendencia africana del Bronx, Nueva York, se identificaron mediante secuenciación Sanger, 2 variantes de

nucleótido único o SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphism*) no descritos previamente en *HOXA2*: 391+241G>C y *108G>A en estado heterocigoto en el mismo paciente. Estas variantes estuvieron presentes en el 8% de su grupo control de individuos hispanos (Monks et al., 2010). Por otro lado, en China se realizó un estudio de 196 casos únicos con microtia aislada y 100 controles sanos en el que también a través de secuenciación Sanger se identificaron 2 variantes nuevas en *HOXA2*: g.90G>A y g.114A>C en la región 5'UTR, en estado heterocigoto, cada una en solo un paciente. Estos cambios se consideraron no codificantes y no se encontraron en el grupo control (Hao et al., 2017). Actualmente, en la base de datos dbSNP/dbVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) existen aproximadamente 424 variantes en el gen *HOXA2* (186 localizadas en las regiones codificantes) en población asiática, europea, africana y americana. Por otro lado, en el Exome Aggregation Consortium (ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>) se reporta un número de 173 variantes observadas en este gen (58 sinónimas, 113 de sentido erróneo y 2 sin sentido) en población asiática, europea, africana y latina y en el Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) se reportan de 30-35 variantes (26 en región codificante) sólo en población europea-americana y africana-americana. En todas estas bases de datos las frecuencias alélicas de las variantes de *HOXA2* son <0.01% en las poblaciones mencionadas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de variantes génicas (patogénicas y benignas) en el gen *HOXA2*, en una muestra de pacientes mexicanos con microtia como expresión mínima de EFAV?

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La microtia, considerada una expresión mínima del EFAV, es una malformación congénita cuya incidencia es alta en la población hispana y 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 dado que ocasiona problemas relacionados con la audición, el aspecto emocional y psicosocial. A pesar de ser una malformación frecuente, a la fecha son pocos los estudios a nivel nacional e internacional que han buscado e identificado factores genéticos que la favorecen por ello, es de gran relevancia estudiar los genes que puedan estar implicados en la formación del oído externo con el fin de entender mejor la etiología de algunos casos de microtia. Así mismo, en la literatura no existe un consenso sobre cuáles son los estudios de gabinete y moleculares que se deben solicitar a los padres y los familiares de los pacientes con EFAV para descartar expresividad mínima y no penetrancia lo cual permitiría clasificar adecuadamente a los casos únicos vs familiares y con base en ello brindar un asesoramiento genético más certero.

JUSTIFICACIÓN

En nuestro país, una de las causas de mortalidad y discapacidad en la infancia es el grupo de 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 ICBSR. En este registro se 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, con una incidencia de 1:1,500 recién nacidos vivos en la población mexicana. Uno de los genes que podría contribuir a la presencia de microtia es *HOXA2* ya que participa en el desarrollo craneofacial que involucra al pabellón auricular documentado a través de modelos murinos y a la descripción de formas monogénicas de microtia en humanos atribuibles a variantes patogénicas en dicho gen. Variantes génicas patogénicas o benignas en este gen podrían ser causales o predisponer a la presencia de microtia, como se ha evidenciado en otras malformaciones congénitas como defectos de cierre de tubo neural asociados a la variante c.677C>T en el gen *MTHFR* (Tsang et al., 2015) y labio y paladar hendido asociado a variantes en el gen *IRF6* (Velázquez-Aragón et al., 2012). En México, no existen estudios sobre el análisis de variantes génicas en pacientes con microtia considerada una expresión mínima de EFAV. Por lo anterior, consideramos importante realizar el presente trabajo con la finalidad de conocer la frecuencia de variantes génicas en *HOXA2* en población mexicana con EFAV y determinar su contribución en la etiología de esta entidad. Así mismo en la literatura no existe un consenso sobre cuáles son los estudios de gabinete que se deben solicitar a los padres y los familiares de los pacientes con EFAV para descartar expresividad mínima por lo que se espera que los resultados obtenidos arrojen argumentos para proponer un abordaje clínico de estos pacientes y sus familias. El conocer mejor la etiología de esta alteración y la identificación de casos con no penetrancia y/o expresividad mínima podría permitir brindar un asesoramiento genético más certero a las familias.

El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto intitulado "**Estudio molecular de genes candidatos en una muestra de pacientes mexicanos con microtia como expresión mínima del espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)**", el cual está aprobado por el Comité de Investigación, de Ética en Investigación y de Bioseguridad del Instituto Nacional de Pediatría con número de registro 004/2017.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de variantes génicas (patogénicas y benignas) en el gen *HOXA2* en una muestra de pacientes mexicanos con microtia como expresión mínima de EFAV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las características clínicas de los casos índices a nivel facial, vertebral y renal.
2. Identificar en los padres expresividad mínima mediante su valoración clínica y estudios de gabinete.
3. Sugerir los estudios de gabinete a realizar en los familiares de primer grado para identificar expresividad mínima.
4. Determinar la frecuencia de variantes génicas patogénicas en el gen *HOXA2* en un grupo de pacientes diagnosticados clínicamente como microtia como expresión mínima de EFAV (casos únicos y familiares).

5. Realizar el estudio molecular a los familiares de los pacientes con una variante génica patogénica identificada en *HOXA2* para identificar casos de no penetrancia o expresividad mínima y brindar un asesoramiento genético de certeza.
6. Describir el modo de herencia identificado en los casos familiares de EFAV que resulten con una variante génica patogénica en el gen *HOXA2*.

CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio observacional, descriptivo, transversal y prospectivo.

POBLACIÓN ELEGIBLE

Pacientes mexicanos de cualquier género y edad que presenten datos clínicos (hoyuelo o apéndice preauricular, microtia, anotia y/o microsomía hemifacial) y radiológicos (alteraciones estructurales en oído medio, columna vertebral y/o riñones) compatibles con el espectro facio-aurículo-vertebral y que asistan a la consulta de Genética del Instituto Nacional de Pediatría.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

- Pacientes no relacionados con diagnóstico clínico de EFAV que cuenten con exploración física completa, tomografía axial computarizada (TAC) de oído interno, estudios audiológicos, ortopantomografía, radiografía de columna vertebral completa y ultrasonido renal.
- Padres de pacientes que cuenten con exploración física completa, ortopantomografía, radiografía de columna vertebral completa y ultrasonido renal. Si después de realizar el estudio molecular de *HOXA2* alguno de los padres presenta la variante génica patogénica encontrada en el paciente deberá contar con TAC de oído interno y estudios audiológicos.
- Hermanos u otros familiares afectados que después del estudio molecular de *HOXA2* presenten la variante génica patogénica encontrada en el paciente y cuenten con exploración física completa, TAC de oído interno, estudios audiológicos, ortopantomografía, radiografía de columna vertebral completa y ultrasonido renal.
- Cualquier sexo.
- Cualquier edad.
- Casos únicos o familiares.
- Firma de carta de consentimiento y/o asentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Pacientes con una transfusión sanguínea en un periodo menor a tres meses.

- Pacientes que a pesar de cumplir los criterios clínicos de EFAV, presenten alguna otra malformación congénita (diferente a alteraciones en columna vertebral y/o riñones), alteración en el crecimiento somático (talla baja o alta) o discapacidad intelectual.
- Pacientes en los cuales se identifique, mediante el interrogatorio, exposición a teratógenos específicos que se han asociado a la presencia de microtia como expresión mínima de EFAV como: alcohol, retinoides, diabetes materna.
- Pacientes con una muestra de DNA insuficiente y que no se autorice una nueva toma de la misma se eliminarán del estudio.

METODOLOGÍA

Descripción general del estudio

a) Captación de pacientes, padres y hermanos u otros familiares. Los pacientes con diagnóstico de EFAV que cumplieron con los criterios de inclusión, se captaron a través de la Consulta Externa de Genética del Instituto Nacional de Pediatría. Se les invitó a participar en el estudio y posterior a la aceptación mediante la firma de la carta de consentimiento (Anexos 2, 3, 5 y 6) y/o asentimiento informado (Anexos 4 y 7), se llenó la hoja de captación sobre antecedentes heredofamiliares y valoración clínica (Anexo 1).

b) Valoración clínica del caso índice. Se describieron las características de la microtia: lateralidad, grado de acuerdo a la clasificación de Hunter et al. (2009), presencia o no de estenosis o atresia del conducto auditivo externo y se midió la longitud del pabellón auricular en el lado no afectado desde el borde superior del hélix hasta el borde inferior del lóbulo mediante una cinta métrica (Bozkir et al., 2006). Se consideró microtia si la longitud del pabellón auricular estaba por debajo de la percentila 3 con base en la gráfica de Feingold y Bossert (1974). Las mediciones de los pabellones auriculares de los pacientes se llevaron a cabo únicamente por la Dra. Bernardette Estandía Ortega, médico especialista en Genética Médica, para evitar sesgo inter-observador. Se determinó si existían malformaciones en el oído medio e interno mediante la TAC de oído e hipoacusia conductiva y neurosensorial a través de los estudios audiológicos. Para interpretar la ortopantomografía y definir si existía microsomía hemifacial se trazó una línea media vertical que pasaba por el hueso nasal y entre los incisivos superiores e inferiores, una línea horizontal que se localizaba en el borde superior de los cóndilos y una línea horizontal que se ubicaba en el plano de oclusión entre los dientes superiores e inferiores (Pruzansky, 1969). Se midió y comparó la longitud de ambos cóndilos y ramas mandibulares (cm) que iba desde el borde superior del cóndilo hasta el borde inferior del maxilar con base en el método de Habets et al. (1988) modificado y se consideró microsomía hemifacial si existía una diferencia de 0.4 cm entre ambos lados con base en lo observado por Balaji, (2010). La interpretación de la ortopantomografía se realizó únicamente por la Dra. Liliana Fernández Hernández, médico especialista en Genética Médica, para evitar sesgo inter-observador. Mediante la valoración de la radiografía de columna

vertebral completa y ultrasonido renal se descartaron malformaciones asociadas en estos niveles. En una sola ocasión se tomaron fotografías de la cara y los pabellones auriculares (de frente y laterales), esto con la finalidad de tener un registro de la estructura de los pabellones auriculares y la cara para que en caso de encontrarse una variante génica tratar de establecer una correlación genotipo-fenotipo posteriormente.

c) Valoración clínica de los padres. Se midió la longitud de los pabellones auriculares desde el borde superior del hélix hasta el borde inferior del lóbulo mediante una cinta métrica (Bozkiir et al., 2006) y se consideró microtia si la longitud del pabellón auricular estaba por debajo de la percentila 3 con base en la gráfica de Feingold y Bossert (1974). Las mediciones de los pabellones auriculares de los familiares se llevaron a cabo únicamente por la Dra. Bernardette Estandía Ortega, médico especialista en Genética Médica, para evitar sesgo inter-observador. En los padres que presentaron microtia se describieron sus características (lateralidad, grado de acuerdo a la clasificación de Hunter et al. (2009), presencia o no de estenosis o atresia del conducto auditivo externo). Para interpretar la ortopantomografía y definir si existía microsomía hemifacial como expresividad mínima se siguió la misma metodología y las mediciones de referencia mencionadas anteriormente para el caso índice. Mediante la valoración de la radiografía de columna vertebral completa y ultrasonido renal se descartó la presencia de malformaciones asociadas en estos niveles para identificar casos con expresión mínima. En una sola ocasión se tomaron fotografías de la cara y los pabellones auriculares (de frente y laterales), esto con la finalidad de tener un registro de la estructura de los pabellones auriculares y la cara para que en caso de encontrarse una variante génica tratar de establecer una correlación genotipo-fenotipo posteriormente.

d) Banco de DNA. Se tomó una muestra de sangre periférica en tubo con EDTA (5 ml) y/o células de descamación de mucosa bucal mediante raspado con cepillo en un tubo Falcon con 3ml de solución de lisis celular para la posterior extracción de DNA mediante columna de sílica en el Laboratorio de Biología Molecular del INP. La muestra fue codificada por los investigadores responsables del proyecto con una clave que no incluía nombre ni datos clínicos del paciente, quienes tras la extracción de DNA la almacenaron en un refrigerador a -4°C dentro del Laboratorio de Biología Molecular en su contenedor correspondiente para su posterior estudio.

e) Genotipificación.

1. 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 génicas patogénicas en estado homocigoto o heterocigoto. El diseño de los oligonucleótidos (Anexo 8) se realizó mediante herramientas en línea (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Los amplicones se obtuvieron mediante un programa de PCR de 35 ciclos, con temperaturas de alineación entre los 60°C y 63°C con 1-1.5 mmol de cloruro de magnesio.

2. La calidad y tamaño de los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con gel Star y visualizados y fotografiados bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador.
3. Se realizó secuenciación automatizada de ambas hebras de los productos de PCR para lo cual fueron enviados en placa de 96 pozos para su purificación y posteriormente para ser sometidos a la reacción BygDye Terminator a través de un servicio ofrecido por la compañía MacroGen USA Corp. (<https://www.macrogenusa.com/>)
4. Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias genómica (NG_012078.1 RefSeqGene) y del transcrito (NM_006735.3) de referencia del gen *HOXA2* depositadas en el GeneBank. En el caso de observar cambios descritos previamente como variantes génicas patogénicas o benignas se analizarían las bases de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), ExAC Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>) y Human Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), así como la evidencia en la literatura.
5. Para el caso de las variantes génicas de sentido erróneo no descritas se realizaría un análisis *in silico* usando los programas PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) y Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>) para predecir un posible efecto deletéreo del cambio. En tanto, para las variantes nuevas que afectarían a los sitios de unión exón-intrón o las regiones cercanas a éstos, se evaluarían mediante los programas ESE Finder (<http://rulai.cshl.edu/>), MaxEnt Scan (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html), NN Splice (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), GeneSplicer (<http://www.cs.jhu.edu/~genomics/GeneSplicer/>), y el Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/>).
6. Así mismo, las variantes génicas de sentido erróneo o que afectarían sitios de unión exón-intrón no reportadas, se buscarían de manera dirigida en 100 controles mexicanos sanos étnicamente relacionados cuyas muestras de DNA se encuentran bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular codificadas como anónimas.

f) Recolección de datos. Toda la información clínica, audiológica y radiológica obtenida en la hoja de captación (Anexo 1) y en el estudio molecular se almacenó en una base de datos.

g) Clasificación de variantes génicas. Las variantes génicas identificadas se interpretarían de acuerdo a las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y de la Asociación de Patología Molecular en: patogénicas, probablemente patogénicas, probablemente benignas, benignas y de significado incierto (Richards et al., 2015).

h) Asesoramiento genético. Se brindó asesoramiento genético a las familias con base en los resultados obtenidos mediante la valoración clínica (no penetrancia y/o expresividad mínima) y el estudio molecular de *HOXA2*.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de muestra se había considerado a conveniencia con un mínimo de 100 pacientes, con este número de individuos se esperaba identificar variantes génicas con una frecuencia alélica igual o mayor a 0.05.

VARIABLES: CLASIFICACIÓN Y DEFINICIONES OPERACIONALES

Variable dependiente. Microtia como expresión mínima de EFAV

Variable independiente. Variantes génicas patogénicas, probablemente patogénicas, probablemente benignas, benignas y variantes de significado incierto en el gen *HOXA2*.

Otras variables. Edad, género, antecedentes heredofamiliares, exposición a teratógenos (físicos, químicos, biológicos) y/o enfermedades maternas durante el embarazo, expresión mínima (hoyuelos y/o apéndices preauriculares), malformaciones asociadas (microsomía hemifacial, quiste dermoide epibulbar, alteraciones en oído medio (cadena osicular), vertebrales y/o renales) y audición (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las variables de estudio

Nombre de la variable	Características				Definición
Alteraciones en oído medio (cadena osicular)	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Ausencia, hipoplasia o malformación de los huesecillos que conforman la cadena osicular (martillo, yunque y/o estribo).
Alteraciones renales	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Hipoplasia o agenesia renal, quistes renales, vejiga lobulada, megauretero y/o doble sistema colector.
Alteraciones vertebrales	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Agenesia vertebral, fusión vertebral y/o hemivértabras a nivel cervical, torácico o lumbar y/o fusión costal.
Antecedentes heredo-familiares	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Historia de familiares afectados con la misma entidad que el probando.
Apéndice preauricular	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Malformación congénita caracterizada por un nódulo localizado en la región adyacente al pabellón auricular. Expresión mínima de la microtia.
Audición	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Conjunto de procesos psicofisiológicos que proporcionan al ser humano la capacidad de percibir un sonido a través del oído.
Edad	Cuantitativa	Numérica	Discreta	Se medirá en meses o años a partir de la fecha	Número de meses o años vividos por una persona desde su nacimiento.
Enfermedades maternas durante el embarazo	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Condiciones que no están causadas directamente por el embarazo pero que pueden ser un potencial riesgo para el desarrollo fetal, como la diabetes mellitus pregestacional.
Espectro facio-auricular-vertebral (EFAV)	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Entidad que se caracteriza por presentar microtia asociada a otras anomalías que pueden variar en severidad y cuya etiología es incierta.
Exposición a teratógenos	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Contacto durante la embriogénesis con un agente biológico, químico, bioquímico o físico que produce malformaciones congénitas o incrementa su incidencia.
Expresión mínima	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Rasgo o característica observable con un grado de severidad muy leve.
Género	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Categoría taxonómica que sirve para clasificar el sexo de una persona en femenino o masculino, según sus características fenotípicas.
Hoyuelo auricular	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Malformación congénita caracterizada por un hoyuelo localizado en un sitio adyacente al oído externo. Expresión mínima de la microtia.
Malformaciones asociadas	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Alteraciones en la formación de diversos órganos y/o sistemas que suelen presentarse junto con la microtia y contribuyen a la integración del diagnóstico de EFAV.
Microsomía hemifacial	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Alteración en el desarrollo de los tejidos blando y/u óseo de un lado de la cara que afecta principalmente las áreas auditiva, oral y mandibular y resulta en asimetría facial.
Microtia	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Malformación congénita del oído externo (pabellón auricular). Puede ser unilateral o bilateral.
No penetrancia	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Ausencia de datos clínicos en un individuo heterocigoto para una variante patogénica dominante germinal.
Quiste dermoide epibulbar	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Tumor congénito benigno que afecta al tejido de origen mesodérmico y ectodérmico y aparece como una lesión sólida elevada y circunscrita de color amarillento en la conjuntiva del ojo.
Variante génica benigna	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Cambios en la secuencia de DNA que no condicionan enfermedad. No es catalogado como causante de la enfermedad mediante evidencia completa: frecuencia alélica mayor al 5%, variantes identificadas en individuos sanos, estudios funcionales que demuestran que no existe daño a la función proteica o al splicing y falta de segregación en individuos afectados en la misma familia.
Variante génica de significado incierto	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Cambios en la secuencia de DNA los cuales no cumplen los criterios poblacionales, clínicos, bioinformáticos y funcionales para ser catalogados como variantes génicas patogénicas o benignas.
Variante génica patogénica	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Cambios en la secuencia de DNA causante de enfermedad mediante evidencia completa: variantes nulas, variantes originadas de novo, estudios funcionales demuestran un efecto deletéreo, ausentes en controles y presente en afectados y, análisis in silico predice efecto deletéreo en la función de la proteína o splicing.
Variante génica probablemente benigna	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Cambios en la secuencia de DNA que en general se asumen como no condicionantes de enfermedad, pero sin evidencia categórica aún disponible: variantes en regiones repetidas sin función conocida, evidencia bioinformática donde no hay impacto en el producto génico y variantes sinónimas con predicciones sin impacto en splicing.
Variante génica probablemente patogénica	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Cambios en la secuencia de DNA que se asumen como condicionantes de enfermedad, pero sin evidencia categórica aún disponible: variantes en hot spots o sitios críticos, ausentes en controles, variantes de sentido erróneo nuevas en aminoácidos previamente catalogados como patogénicos y asumidas de novo sin confirmación de maternidad y/o paternidad.
Variantes génicas en el gen <i>HOXA2</i>	Cualitativa	Categórica	Nominal	Dicotómica: 0=Ausente 1=Presente	Cambios permanentes y heredables, en la secuencia de dicho gen, los cuales pueden ser: patogénicos, probablemente patogénicos, de significado incierto, probablemente benignos o benignos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En caso de identificar variantes génicas patogénicas y/o benignas en el gen *HOXA2* se realizaría un análisis descriptivo para las frecuencias de las mismas obtenidas a partir del método de conteo alélico. Para variantes con una frecuencia alélica igual o mayor a 0.05 se determinaría si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg utilizando la prueba exacta de Fisher con dos colas con la finalidad de conocer si la distribución de genotipos era la esperada en nuestra población.

ASPECTOS ÉTICOS

Se solicitó la firma de la carta de consentimiento informado y/o asentimiento a los padres y pacientes. La información personal, clínica y molecular (genotipo de *HOXA2*) se manejó en forma estrictamente confidencial siguiendo las normas establecidas por la Declaración de Helsinki, La ley General de Salud y las Buenas Prácticas Clínicas y de Armonización y del ELSI (del inglés [Ethical, Legal and Social Issues]). Se solicitó aprobación y registro del protocolo de investigación por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Pediatría.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

En este proyecto se trabajaron muestras biológicas de humano (sangre periférica y/o células de descamación de mucosa bucal), así como reactivos inflamables (etanol e isopropanol). Los investigadores responsables del protocolo cumplieron con los lineamientos del manejo integral de residuos, productos biológicos y/o materiales potencialmente peligrosos establecidos en el Plan de Manejo de Materiales Peligrosos y Residuos Hospitalarios del Instituto Nacional de Pediatría. Así mismo, se contó con las instalaciones y equipo de seguridad para la realización de este proyecto de investigación.

RESULTADOS

CLÍNICOS

Se capturaron 22 pacientes no relacionados entre sí (13 varones, 9 mujeres) del Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico de microtia como expresión mínima de EFAV, sin antecedente de exposición a teratógenos (Tabla 3).

Tabla 3. Información clínica de los pacientes captados													
Pacientes	Edad	AHF	Microtia	Grado	CAE	Dermoide		Malformaciones en		Microsomía		Alteraciones vertebrales	Alteraciones renales
						epibulbar	cadena osicular	hemifacial	Hipoacusia				
EFAV-22	16a7m	Sí	Derecha	II	Atresia	No	No	No	CD	No	No	No	No
EFAV-26	1a10m	Sí	Derecha	II	Atresia	No	Sí	Derecha	CD	No	No	No	No
				III derecha,									
EFAV-28	6a8m	No	Bilateral	II izquierda	Atresia	No	Sí	Derecha	CB	No	No	No	No
EFAV-32	2a3m	Sí	Bilateral	III	Atresia	No	No	Derecha	CB	No	No	No	No
EFAV-35	2a5m	No	Izquierda	III	Estenosis	No	Sí	No	CI	No	No	No	No
EFAV-38	9a	Sí	Izquierda	III	Atresia	No	Sí	No	CI	No	No	No	No
EFAV-40	6a8m	Sí	Derecha	III	Atresia	No	Sí	No	CD	No	No	No	No
EFAV-42	2a3m	Sí	Derecha	III	Atresia	No	Sí	Derecha	CD	No	No	No	No
				Atresia									
EFAV-45	6a11m	No	Derecha	III		No	Sí*	No	CD	Arco costal T1 extra	No	No	No
EFAV-47	1a11m	No	Derecha	III	Atresia	No	No	No	CD	No	No	No	No
EFAV-50	3a8m	Sí	Izquierda	III	Atresia	No	Sí	No	CI	No	No	No	No
EFAV-52	2a7m	No	Izquierda	III	Atresia	No	Sí	No	CI	No	No	No	No
EFAV-55	1a9m	No	Derecha	III	Atresia	No	Sí	No valorable	CD	No	No	No	No
EFAV-57	9a	No	Izquierda	II	Estenosis	No	No	No	CI	No	No	No	No
EFAV-64	1a5m	No	Derecha	III	Atresia	No	Sí	No	CD	No	No	No	No
EFAV-67	7a	No	Derecha	II	Estenosis	No	Sí	Derecha	MB	No	No	No	No
EFAV-70	11a7m	No	Derecha	III	Atresia	No	Sí	No	MD	No	No	No	No
EFAV-75	8a11m	No	Izquierda	III	Atresia	No	Sí	Izquierda	CI	No	No	No	No
EFAV-77	14a	Sí	Derecha	II	Atresia	No	Sí	Derecha	CD	Fusión C2-C3	No	No	No
EFAV-79	2a5m	Sí	Derecha	II	Atresia	No	Sí	No	CD	No	No	No	No
EFAV-82	11m	No	Izquierda	II	Estenosis	No	No	Izquierda	MI	No	No	No	No
EFAV-84	4a 6m	No	Derecha	II	Atresia	No	No	No	CD	No	No	No	No

En 9/22 (40.9%) casos incluidos en este estudio se consignaron antecedentes heredofamiliares de microtia en la genealogía por lo que se clasificaron como casos familiares. De estos 1/9 (EFAV-79) sugiere un patrón de herencia AD porque el padre presenta 1 pit preauricular como expresión mínima de microtia a la exploración física, en 1/9 (EFAV-40) parece un modo de herencia AR ya que el paciente tiene una hermana con apéndice preauricular izquierdo con padres sanos y en 1/9 (EFAV-38) podría tratarse de herencia multifactorial vs dominante pues se refirió que el padre tiene un apéndice preauricular derecho al igual que la prima hermana materna. En los 6/9 restantes podría tratarse de herencia multifactorial porque los afectados son de 2° y/o 3° de parentesco (EFAV-22, 26, 32, 42, 50 y 77). De los progenitores, todas las madres (22/22) y la mayoría de los padres (16/22) de los pacientes fueron estudiados mediante ortopantomografía, radiografía de columna vertebral completa y ultrasonido renal. Seis de los padres no cuentan con estudios porque 2 no aceptaron participar en el estudio y en 4 la pareja está disuelta.

Mediante los estudios de gabinete, en 4/22 de las madres se observó microsomía hemifacial, 3 de lado izquierdo (EFAV-35, 38 y 70) y 1 del derecho (EFAV-79), en 1/22 se identificó una hemivértebra extra colapsada entre T8-T9 (EFAV-26) y en 22/22 el ultrasonido renal no evidenció alteraciones estructurales congénitas. En 3/15 padres se observó microsomía hemifacial izquierda (EFAV-32, 38 y 57) y en 1 padre está pendiente la realización de la ortopantomografía, en 1/16 se identificaron las vértebras cervicales C3 y C4 hendidas (EFAV-57) en la radiografía de columna vertebral y en 15/15 no se encontraron alteraciones en el ultrasonido renal (en 1 padre está pendiente la realización del ultrasonido renal) (Tabla 4).

Tabla 4. Información clínica de los padres de los pacientes				
	Microtia	Microsomía hemifacial	Malformaciones vertebrales	Malformaciones renales
Madre de:				
EFAV-26	-	-	Hemivértebra extra colapsada entre T8-T9	-
EFAV-35	-	Izquierda	-	-
EFAV-38	-	Izquierda	-	-
EFAV-70	-	Izquierda	-	-
EFAV-79	-	Derecha	-	-
Padre de:				
EFAV-32	-	Izquierda	-	-
EFAV-38	Apéndice preauricular derecho	Izquierda	-	-
EFAV-57	-	Izquierda	Vértebras cervicales hendidas (C3y C4)	Pendiente ultrasonido renal
EFAV-79	Pit preauricular izquierdo	-	-	-

Tras la realización de los estudios de gabinete en los padres de los pacientes se reclasificó un caso único (EFAV-57) a familiar con herencia autosómico dominante dado que no contaba con antecedentes heredofamiliares en la genealogía, pero el padre resultó con alteración a nivel facial y vertebral en los estudios de gabinete (Figura 4). En otros dos casos únicos (EFAV- 35 y 70) la madre de ambos pacientes sólo presentó microsomía hemifacial izquierda leve sin otro órgano afectado, lo cual podría sugerir herencia autosómica dominante. Por otro lado, hubo un caso (EFAV-79) en el que se sugería herencia autosómico dominante por el padre afectado pero que después de los estudios la madre resultó con microsomía hemifacial derecha, lo que genera también la posibilidad de herencia multifactorial. Finalmente en dos casos (EFAV-26 y 32) en los que inicialmente se documentó herencia multifactorial, se consideró también la posibilidad de que se trate de una herencia autosómico dominante por el hallazgo de hemivértebra extra colapsada entre T8-T9 en la madre (EFAV-26) y microsomía hemifacial izquierda en el padre (EFAV-32) en los estudios de gabinete (Tabla 5)(Figura 5 y 6).

Tabla 5. Reclasificación de casos únicos a familiares con base en los estudios de gabinete.				
Pacientes	AHF	Modo de herencia con base en la genealogía	Resultado de los estudios de gabinete de los padres	Modo de herencia posterior a la realización de los estudios de gabinete
EFAV-22	Prima hermana paterna con microtia II	Multifactorial	Ambos padres sin alteraciones.	Multifactorial
EFAV-26	Tío paterno con apéndices preauriculares de lado izquierdo	Multifactorial	Madre con hemivértebra extra colapsada entre T8-T9. Padre sin alteraciones.	Multifactorial vs autosómico dominante
EFAV-28	No	Esporádico	Ambos padres sin alteraciones.	Esporádico
EFAV-32	Tío materno con apéndice preauricular derecho. Tía abuela materna con pabellón auricular displásico que requirió reparación quirúrgica	Multifactorial	Padre con microsomía hemifacial izquierda. Madre sin alteraciones. Madre con microsomía hemifacial izquierda. Padre sin alteraciones.	Multifactorial vs autosómico dominante Esporádico vs autosómico dominante
EFAV-35	No	Esporádico	Padre sin alteraciones.	Esporádico
EFAV-38	Padre con apéndice preauricular derecho. Prima hermana materna con apéndice preauricular	Multifactorial vs autosómico dominante	Madre y padre con microsomía hemifacial izquierda.	Multifactorial vs autosómico dominante
EFAV-40	Hermana con apéndice preauricular izquierdo	Recesivo	Ambos padres sin alteraciones (pendiente ortopantomografía del padre)	Recesivo
EFAV-42	Tía paterna con displasia auricular. Tío abuelo paterno con apéndices preauriculares de forma unilateral	Multifactorial	Madre sin alteraciones. No se estudió al padre.	Multifactorial
EFAV-45	No	Esporádico	Madre sin alteraciones. No se estudió al padre.	Esporádico
EFAV-47	No	Esporádico	Ambos padres sin alteraciones.	Esporádico
EFAV-50	Primo hermano materno con microtia	Multifactorial	Madre sin alteraciones. No se estudió al padre.	Multifactorial
EFAV-52	No	Esporádico	Ambos padres sin alteraciones.	Esporádico
EFAV-55	No	Esporádico	Madre sin alteraciones. No se estudió al padre.	Esporádico
EFAV-57	No	Esporádico	Padre con microsomía hemifacial izquierda y vértebras cervicales C3 y C4 hendidas (pendiente ultrasonido renal). Madre sin alteraciones.	Autosómico dominante
EFAV-64	No	Esporádico	Ambos padres sin alteraciones.	Esporádico
EFAV-67	No	Esporádico	Ambos padres sin alteraciones.	Esporádico
EFAV-70	No	Esporádico	Madre con microsomía hemifacial izquierda. Padre sin alteraciones.	Esporádico vs autosómico dominante
EFAV-75	No	Esporádico	Madre sin alteraciones. No se estudió al padre.	Esporádico
EFAV-77	Bisabuelo paterno con apéndice preauricular	Multifactorial	Madre sin alteraciones. No se estudió al padre.	Multifactorial
EFAV-79	Padre con pit preauricular derecho	Autosómico dominante	Madre con microsomía hemifacial derecha. Padre sin alteraciones.	Multifactorial vs autosómico dominante
EFAV-82	No	Esporádico	Ambos padres sin alteraciones.	Esporádico
EFAV-84	No	Esporádico	Ambos padres sin alteraciones.	Esporádico

Figura 4. EFAV-57

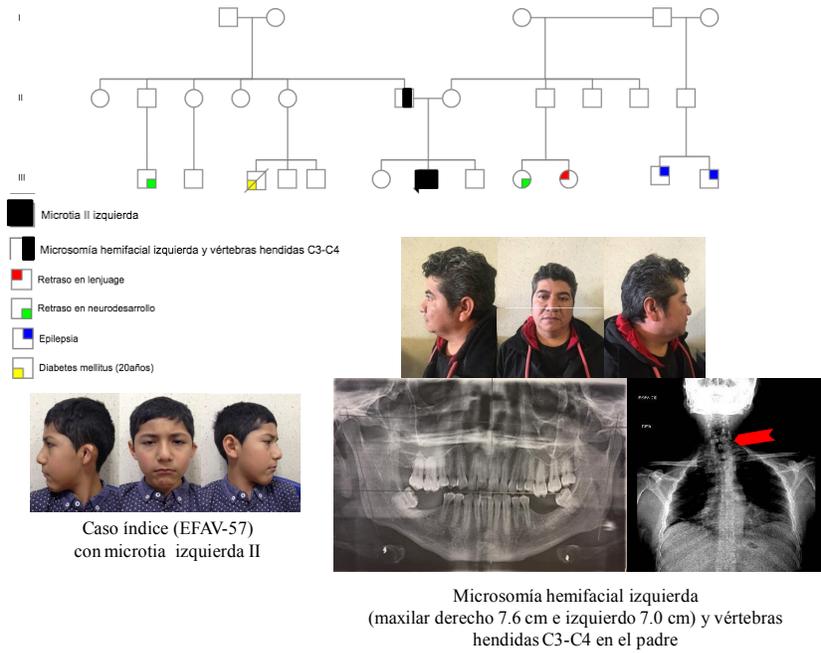


Figura 5. EFAV-26

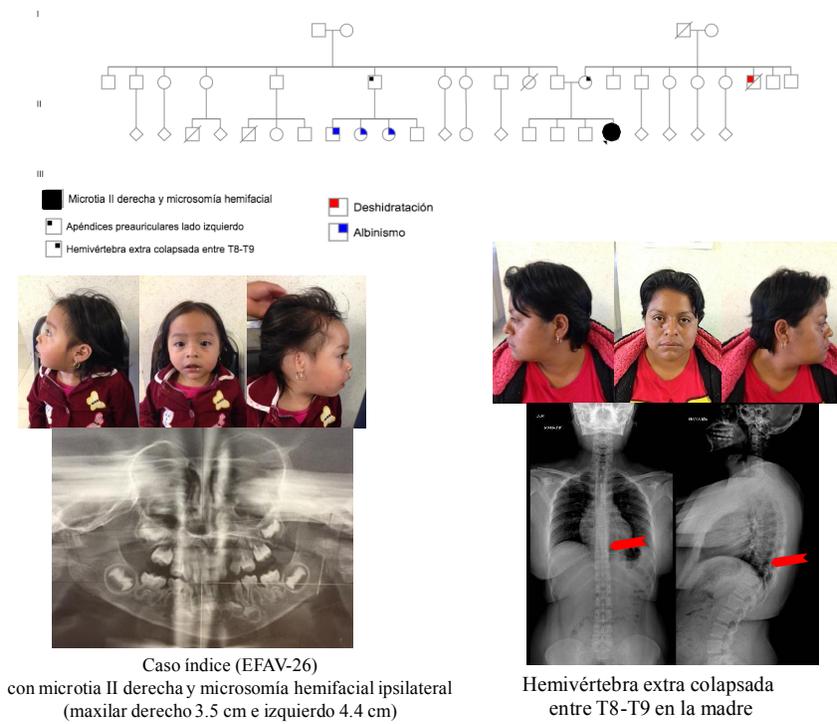
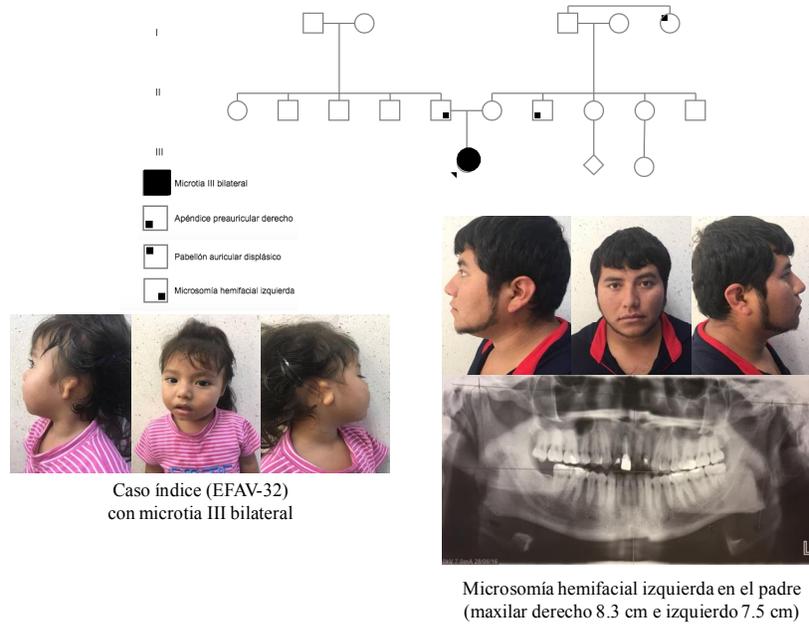


Figura 6. EFAV-32



MOLECULARES

En los 22 casos se realizó PCR de los 2 exones que conforman *HOXA2* y se logró la obtención de un producto de buena calidad (Figura 7). Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación automatizada de los dos exones de dicho gen (*HOXA2*-EX1: NM_006735.3: EX1 c.1-c.391 más bordes 5' UTR y exón-intrón (10 pb) y *HOXA2*-EX2: NM_006735.3: EX2 c.392-c.1131 más bordes exón intrón y 3' UTR (10 pb)) y se obtuvieron electroferogramas analizables en todos los casos. En ninguno de los 22 pacientes estudiados se identificaron variantes génicas patogénicas y/o benignas, incluyendo las variantes patogénicas que se han reportado en la literatura (Figura 8).

Condiciones (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):	0.5 ul/rxn
Buffer PCR	3 ul/rxn
MgCl ₂ [25 mM]	3 ul/rxn
PCR Enh Solution Invitrogen [10X]	6 ul/rxn
Taq Polimerasa [5U/ul]	0.3 ul/rxn
DNA genómico (dil. con H ₂ O dd 1:5, ~100 ng)	3 ul/rxn
H ₂ O dd (cbp 30 ul/rxn)	9.2 ul/rxn

Programa PCR común a ambos exones:

94° C 5 min.	} 5 ciclos
94° C 40 seg.	
63-59° C (dism. 1° C / ciclo) 50 seg.	
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.	

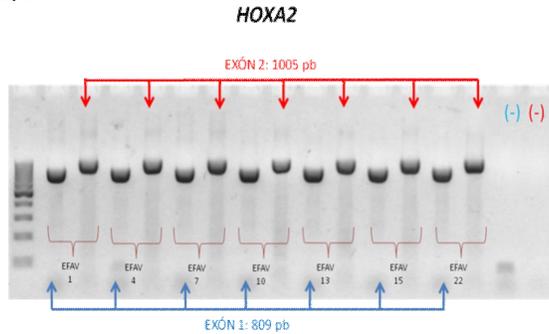


Figura 7. Se muestran las condiciones de la PCR y la imagen de electroforesis de algunas muestras en la que se observa un producto de PCR para los exones 1 y 2 del gen *HOXA2* de buena cantidad y acorde al peso molecular esperado.

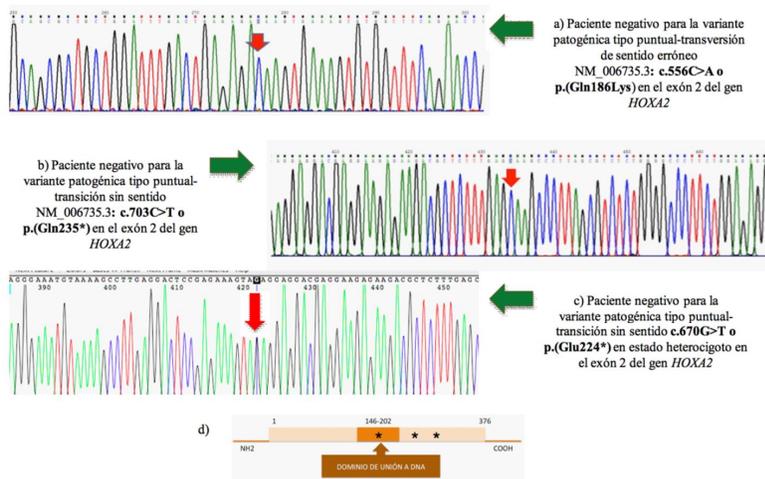


Figura 8. a) Paciente con resultado negativo para la variante patogénica tipo puntual-transversión de sentido erróneo NM_006735.3: c.556C>A o p.(Gln186Lys), b) paciente con resultado negativo para la variante patogénica tipo puntual-transición sin sentido NM_006735.3: c.703C>T o p.(Gln235*), c) paciente con resultado negativo para la variante patogénica tipo puntual-transición sin sentido c.670G>T o p.(Glu224*) en estado heterocigoto en el exón 2 del gen *HOXA2*. La flecha roja indica el nucleótido donde se espera observar cada una de las variantes mencionadas. d) Esquema representativo de la estructura proteica de *HOXA2*, la región naranja indica el sitio del homeodominio y los asteriscos la ubicación de las variantes patogénicas asociadas a microtia en humanos (Alasti et al., 2008; Brown et al., 2013; Picci et al., 2017).

DISCUSIÓN

En nuestra población de estudio, la cual pertenecía a edad pediátrica, se refirieron antecedentes de microtia en el 40% (9/22) de las familias por lo que la mayoría de los casos fueron únicos como ya se ha descrito en la literatura (Mastroiacovo et al., 1995; Llano-Rivas et al., 1999). Como se mencionó anteriormente, la etiología más frecuente de las microtias aisladas en casos únicos suele ser desconocida, mientras que en casos familiares la causa puede ser monogénica (AD o AR) o en menor proporción multifactorial (Llano-Rivas et al., 1999), por lo que es de llamar la atención que en la mayoría (77%) de los casos familiares de esta muestra (n=7) se sugirió una herencia multifactorial por la agregación de familiares afectados y en el 22% (n=2) una herencia mendeliana (AD o AR) por la presencia de microtia en un familiar de primer grado. Es probable que el predominio de una herencia multifactorial en los casos familiares se haya debido al número de pacientes que se analizó en este proyecto de investigación (n=22) el cual es menor al que se estudió previamente en pacientes mexicanos de nuestro instituto (n= 145) (Llano-Rivas et al., 1999).

Se observó que las características fenotípicas de los pacientes están acorde a lo reportado en la literatura ya que la microtia predominó en el sexo masculino (59% vs ~60%), la presentación unilateral fue la más común (90% vs ~60-90%) y el lado derecho el más frecuente (65% vs ~60%). Además se identificó hipoacusia conductiva por atresia o estenosis del CAE en todos los pacientes (100% vs 55-93%), de los cuales 3 tuvieron hipoacusia mixta por déficit auditivo de tipo neurosensorial agregado (13.6% vs ~3-9%) (Rollnick et al., 1987; Eavey, 1995; Okajima et al., 1996; Llano-Rivas et al., 1999; Tasse et al., 2005; Suutarla et al., 2007). Con relación al grado de severidad, todos los pacientes presentaron microtia II o III, lo cual puede deberse a que el Instituto Nacional de Pediatría es un hospital de tercer nivel en el que se tratan las malformaciones más severas que requieren de intervención quirúrgica y no es común que se ingresen pacientes con microtias de grado I que son pabellones auriculares estructuralmente normales pero de menor tamaño, sin embargo, llama la atención que no observamos casos más severos con anotia (ausencia de pabellón auricular) o grado IV (~5-8%) (Forrester y Merz, 2005; Suutarla et al., 2007), lo cual puede deberse al tamaño pequeño de la muestra.

En cuanto a las malformaciones asociadas al espectro facio-aurículo-vertebral ninguno de los pacientes presentó quiste dermoide epibulbar ni alteraciones renales, los cuales se han observado en el 4-20% y 5-23% de los pacientes en otras poblaciones, respectivamente (Rollnick et al., 1987; Vento et al, 1991; Tasse et al., 2005; Toulitaou et al, 2006; Barisic et al., 2014). El no haber observado estas alteraciones clínicas podría explicarse por nuestro número de pacientes (n=22) o por la frecuencia baja de éstas en algunas poblaciones como la nuestra ya que en 58 pacientes mexicanos con EFAV estudiados con anterioridad sólo se identificaron 2 casos (3.4%) con malformación renal (Llano-Rivas et al., 1999).

Las malformaciones asociadas observadas en los pacientes al igual que en otras poblaciones fueron microsomía hemifacial (38% vs ~49-83%) y alteraciones costales/vertebrales (4%/4% vs ~7-8%/18-24%) (Rollnick et al., 1987; Vento et al, 1991; Tasse et al., 2005; Toulitaou et al, 2006; Barisic et al., 2014), así como displasia de la cadena osicular de oído medio (72% vs ~74%) (Davide et al., 2017) y alteración en oído interno (4% vs ~20%) (Vendramini et al, 2007).

Abordaje clínico de los pacientes con microtia como expresión mínima de EFAV

A pesar de que el EFAV se conoce como una entidad con amplia expresividad clínica (Elalaloui et al., 2010) en la literatura no existe un consenso sobre cuáles son los estudios de gabinete que se deben solicitar a los pacientes con microtia como expresión mínima de EFAV para descartar malformaciones asociadas por lo que con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación sugerimos que el abordaje clínico de estos pacientes se realice mediante exploración física completa, estudios de gabinete como TAC de oídos, ortopantomografía y radiografía completa de columna vertebral (excepto ultrasonido renal) y estudios audiológicos.

En nuestra población los padres y madres de los pacientes fueron estudiados mediante ortopantomografía, radiografía de columna vertebral completa y ultrasonido renal y algunos presentaron manifestaciones clínicas tales como microsomía hemifacial (~20%) y alteraciones vertebrales (~5%) consideradas como expresividad mínima en la familia lo cual nos permitió reclasificar adecuadamente a 1 caso único como familiar y modificar el asesoramiento genético. Este caso se consideraba "único" por genealogía (EFAV-57) y se reclasificó como "familiar" con herencia autosómico dominante dado que se identificó en el padre microsomía hemifacial izquierda (diferencia de 0.6 cm entre ramas mandibulares) y vértebras cervicales hendidas (C3 y C4). En otros 2 de los casos únicos (EFAV- 35 y 70) se sugirió la presencia de expresión mínima de EFAV en la familia ya que en las madres de ambos pacientes se determinó una diferencia de 0.4 cm entre las ramas mandibulares lo cual fue considerado como microsomía hemifacial leve con base en lo observado por Balaji (2010) ; sin embargo, dado que estas madres sólo presentaron la afección facial en grado leve y al considerar que la microsomía hemifacial puede presentarse en población general con una ocurrencia de 1/3500 a 1/5000 nacimientos (Caron et al., 2017) es difícil aseverar que se trate de expresión mínima de EFAV y con base en ello reclasificarlos de casos únicos con presentación esporádica a familiares con herencia monogénica. Posterior a la realización de los estudios de gabinete en los padres, el número de casos familiares ascendió de 9 a 10 casos, lo que indica que la realización de los estudios de gabinete en los padres, además de la exploración física, tiene un impacto al determinar si existen otros afectados en la familia o no.

Actualmente no existe un consenso reportado en la literatura sobre cuáles son los estudios de gabinete que se deben solicitar a los padres y los familiares de los pacientes con EFAV para descartar expresividad mínima, por lo que con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación sugerimos que su abordaje clínico de los padres se realice mediante exploración física completa, estudios de gabinete (ortopantomografía y radiografía completa de columna vertebral). Tomando en consideración los resultados no estaría justificado incluir en el abordaje el ultrasonido renal en los padres dado que no se identificó ninguna alteración a este nivel en los que fueron estudiados, sin embargo, esto se podría definir con más certeza una vez que se cuente con el tamaño de muestra esperado. Por otro lado, como se menciona anteriormente la realización de los estudios de gabinete en los padres, en particular la ortopantomografía y la radiografía de columna vertebral completa, si puede modificar la clasificación de los casos en únicos o familiares, el modo de herencia y el asesoramiento genético como se observó en el caso EFAV-57.

El tamaño de muestra del presente estudio se consideró inicialmente a conveniencia con un mínimo de 100 pacientes, con la finalidad de identificar variantes génicas con una frecuencia alélica igual o mayor a 0.05. Sólo se logró la captación del 22% de la muestra estimada, lo cual es posible que se deba a los criterios de inclusión considerados en este proyecto ya que sólo se incluyeron pacientes con microtia con o sin alteraciones vertebrales y/o renales, mientras que no se consideraron aquellos con alguna otra malformación o alteración en el crecimiento y/o desarrollo; sin embargo, los criterios de inclusión que se consideraron fueron establecidos con la finalidad de que el diagnóstico de EFAV en los pacientes estuviera sustentado mediante la clínica y los estudios de gabinete y se evitara con mayor certeza la captación de pacientes con entidades distintas, por ejemplo la embriopatía diabética y entidades genéticas como síndrome de Di George y síndrome de CHARGE, que al igual que EFAV cursan con microtia y cardiopatía congénita (Correa et al., 2008; Digilio et al., 2008; Alasti et al., 2008). Dado que este trabajo forma parte de una línea de investigación vigente en el Laboratorio de Biología Molecular, se continuará la captación de los pacientes con microtia como expresión mínima de EFAV para alcanzar el tamaño de muestra propuesto (n=100).

Para conocer la participación de variantes génicas en los pacientes con EFAV en población mexicana se decidió estudiar el gen *HOXA2* por su expresión embriológica en el segundo arco branquial que da lugar a los pabellones auriculares y por los 3 casos familiares con microtia reportados en la literatura que presentan variantes patogénicas en este gen (Alasti et al., 2008; Brown et al., 2013; Picci et al., 2017). La secuenciación automatizada de los 2 exones que conforman al gen no reveló la presencia de variantes génicas patogénicas, ni benignas en la porción codificante, parte de ambas UTR y bordes exón-intrón en los 22 pacientes con EFAV no relacionados e incluidos en el presente estudio. De igual forma, la secuenciación automatizada no identificó ninguna de las variantes génicas enlistadas en las principales bases de datos poblacionales genotípicas, lo cual puede deberse a que la frecuencia alélica de las variantes en *HOXA2* en dbSNP/dbVar, ExAC Browser y Exome Variant Server en las diferentes poblaciones (asiática, europea, africana, americana y latina) es muy baja (<0.01%), por lo que consideramos que la posibilidad de encontrarlas en nuestra población de estudio era reducida o nula, aunado a la variabilidad que puede existir en la distribución de frecuencia y alelos entre poblaciones con diferencias étnicas (Girirajan y Eichler, 2010). El incremento en el tamaño de muestra permitiría corroborar estas posibilidades.

El no haber observado variantes génicas patogénicas en el gen candidato *HOXA2* puede deberse en primer lugar a que las variantes patogénicas en este gen sean poco frecuentes como causales de microtia en poblaciones particulares, como se reportó en el estudio de Monks et al. (2010) que analiza una población étnicamente similar a la nuestra (n= 8 casos, 7 hispanos y 1 africano) y en el de Hao et al. (2017) con un mayor número de pacientes (n=196 casos chinos) pero en donde tampoco encontraron variantes patogénicas en *HOXA2*. También podría deberse a que el 59% de los casos de este estudio son únicos (no cuentan con antecedentes heredofamiliares de microtia) aunque esto no necesariamente explicaría la ausencia de VGP dado que no se conoce la tasa de mutaciones nuevas en el gen estudiado. Así sólo en dos de nuestros casos familiares (EFAV-40 y EFAV-79) se observa un modo de herencia definido en la genealogía que pudiera sugerir una etiología monogénica (AD y AR, respectivamente) como ocurrió en los 3 casos ya publicados de

familias con microtia con una variante probablemente patogénica en *HOXA2* (Alasti et al, 2008; Brown et al, 2013; Piceci et al, 2017). Además, el no haber encontrado variantes en *HOXA2* en los pacientes con EFAV de nuestra población también podría explicarse por el tamaño de muestra y probablemente el aumentarlo permitirá la identificación de variantes en este gen.

En los 2 casos considerados inicialmente como únicos cuyas madres presentaron microsomía hemifacial leve sin otra alteración (EFAV- 35 y 70) se podría sugerir herencia autosómica dominante a pesar de que en el gen *HOXA2* no se haya identificado ninguna variante patogénica. En estos casos la forma de herencia AD se podría deber a la participación de otro locus, por lo que en el futuro, en esta misma población de estudio se realizará la búsqueda de variantes génicas en otros genes candidatos (*TCOF1*, *SALL1*, *EYAI* y *TBX1*) con el objetivo de ampliar la posibilidad de encontrar una etiología genética de la microtia en nuestros pacientes.

La identificación de variantes en *HOXA2* y en otros genes que se relacionen con la presencia de la microtia permitiría conocer más sobre la fisiopatología de esta malformación, así como tener un diagnóstico más preciso para brindar un asesoramiento genético más certero a las familias.

CONCLUSIONES

1. El 59% (13/22) de los casos con EFAV en nuestra población fueron únicos, acorde a lo descrito en la literatura.
2. Llama la atención que en la mayoría de los casos familiares de esta muestra (n=7/9, 77%) se sugirió una herencia multifactorial y en el 22% (n=2/9) una herencia mendeliana (AD o AR) a diferencia de lo observado previamente en pacientes de la misma Institución.
3. Las características fenotípicas con relación a la microtia de nuestros pacientes estudio están acorde a lo reportado en la literatura.
4. Las malformaciones asociadas que se identificaron en los pacientes con EFAV en comparación con lo reportado en la literatura fueron displasia de la cadena osicular (72% vs ~74%), alteración en oído interno (4% vs ~20%), microsomía hemifacial (38% vs ~49-83%) y alteraciones costales/vertebrales (4%/4% vs ~7-8%/18-24%). No se identificaron malformaciones a nivel renal las cuales se han observado en el 5-23% de los pacientes con EFAV en otras poblaciones.
5. Se sugiere que el abordaje clínico de pacientes con microtia como expresión mínima de EFAV se realice mediante exploración física completa, estudios de gabinete como TAC de oídos, ortopantomografía y radiografía completa de columna vertebral (excepto ultrasonido renal) y estudios audiológicos.
6. Algunos de los padres de los pacientes presentaron manifestaciones clínicas tales como microsomía hemifacial (~20%) y alteraciones vertebrales (~5%) consideradas como expresividad mínima en la familia.
7. La realización de la ortopantomografía y la radiografía de columna vertebral completa en los padres puede modificar la clasificación de los casos en únicos o familiares, el modo de herencia y el

asesoramiento genético como se observó en el caso EFAV-57. Sin embargo, se requiere estudiar a un número mayor de padres para saber con certeza si se requeriría o no el ultrasonido renal.

8. Al menos en la muestra de pacientes hasta ahora analizada, no se identificó la presencia de variantes patogénicas en el gen *HOXA2*.
9. El no haber observado variantes génicas patogénicas (VGP) en el gen candidato *HOXA2* puede deberse a que sea una causa genética poco común de microtia en poblaciones de origen hispano como la nuestra. A que el 59% de nuestros casos no son familiares como se describe en los 3 casos publicados de microtia con VGP en el gen analizado, sin embargo, el haber estudiado casos únicos no descartaba la posibilidad de encontrar VGP dado que no se conoce la tasa de mutaciones nuevas en el gen *HOXA2*. Finalmente la ausencia de VGP podría explicarse por el tamaño de muestra reducido que se analizó.
10. Tampoco se identificaron variantes génicas benignas (VGB) lo cual puede deberse a la frecuencia alélica <0.01% de las variantes en *HOXA2* reportadas en las bases de datos, a la variabilidad que puede existir en la frecuencia de estas variantes entre poblaciones de origen étnico distinto y al tamaño reducido de la muestra analizada.
11. El incremento en el tamaño de muestra y un abordaje por secuenciación de nueva generación de un panel de otros genes candidato (por ejem. *TCOF1*, *SALL1*, *EYAI* y *TBX1*) podría ampliar la posibilidad de identificar VGP o VGB asociadas a la microtia en nuestra población.

LITERATURA CITADA

- Alasti F, Sadeghi A, Sanati MH, Farhadi M, Stollar E, Somers T, Van Camp G. (2008). A mutation in *HOXA2* is responsible for autosomal-recessive microtia in an Iranian family. *Am J Hum Genet*, 82, 982-991.
- Alasti F, Van Camp G. (2009). Genetics of microtia and associated syndromes. *J Med Genet*, 46(6), 361-369.
- Anderka MT, Lin AE, Abuelo DN, Mitchell AA, Rasmussen SA. (2009). Reviewing the evidence for mycophenolate mofetil as a new teratogen: case report and review of the literature. *Am J Med Genet A*, 149A(6), 1241-1248.
- Artunduaga MA, Quintanilla-Dieck Mde L, Greenway S, Betensky R, Nicolau Y, Hamdan U, Jarrin P, Osorno G, Brent B, Eavey R, Seidman C, Seidman JG. (2009). A classic twin study of external ear malformations, including microtia. *N Engl J Med*, 361(12), 1216-1218.
- Balaji SM. (2010). Change of Lip and Occlusal Cant After Simultaneous Maxillary and Mandibular Distraction Osteogenesis in Hemifacial Microsomia. *J Maxillofac Oral Surg*, 9(4), 344-349.
- Barisic I, Odak L, Loane M, Garne E, Wellesley D, Calzolari E, Dolk H, Addor MC, Arriola L, Bergman J, Bianca S, Doray B, Khoshnood B, Klungsoyr K, McDonnell B, Pierini A, Rankin J, Rissmann A, Rounding C, Queisser-Luft A, Scarano G, Tucker D. (2014). Prevalence, prenatal diagnosis and clinical features of oculo-auriculo-vertebral spectrum: a registry-based study in Europe. *Eur J Hum Genet*, 22(8), 1026-1033.
- Bozkir MG, Karakas P, Yavuz M, Dere F. (2006). Morphometry of the External Ear in Our Adult Population. *Aesth Plast Surg*, 30, 81-85.
- 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. (2013). *HOXA2* haploinsufficiency in dominant bilateral microtia and hearing loss. *Hum Mutat*, 34(10), 1347-1351.
- Carey JC, Park AH, Muntz HR. (2006). External Ear. In: RE Stevenson (Ed), *Human malformations and related anomalies* (pp. 329-338). New York: Oxford University Press.
- Correa A, Gilboa SM, Besser LM, Botto LD, Moore CA, Hobbs CA, Cleves MA, Riehle-Colarusso TJ, Waller DK, Reece EA and the National Birth Defects Prevention Study. (2008). Diabetes mellitus and birth defects. *Am J Obstet Gynecol*, 199, 237.e1-237.e9.
- Caron CJJM, Pluijmers BI, Maas BDJ, Klazen YP, Katz ES, Abel F, van der Schroeff MP, Mathijssen IMJ, Dunaway DJ, Mills C, Gill DS, Bulstrode N, Padwa BL, Wolvius EB, Joosten KFM, Koudstaal MJ. (2017). Obstructive sleep apnoea in craniofacial microsomia: analysis of 755 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*, pii: S0901-5027(17)31483-2. doi: 10.1016/j.ijom.2017.05.020.
- Cox TC, Camci ED, Vora S, Luquetti DV, Turner EE. (2014). The genetics of auricular development and malformation: new findings in model systems driving future directions for microtia research. *Eur J Med Genet*, 57(8), 394-401.

- Davide B, Renzo M, Sara G, Elisa L, Rodica M, Irene T, Alessandro C, Giovanni S, Valentina S, Roberto B, Patrizia T, Alessandro M. (2017). Oculo-auriculo-vertebral spectrum: going beyond the first and second pharyngeal arch involvement. *Neuroradiology*, 59(3), 305-316.
- Digilio MC, Calzolari F, Capolino R, Toscano A, Sarkozy A, de Zorzi A, Dallapiccola B, Marino B. (2008). Congenital Heart Defects in Patients With Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum (Goldenhar Syndrome). *Am J Med Genet A*, 146A, 1815-1819.
- Dixon J, Ellis I, Bottani A, Temple K, Dixon MJ. (2004). Identification of mutations in *TCOF1*: use of molecular analysis in the pre- and postnatal diagnosis of Treacher Collins syndrome. *Am J Med Genet A*, 127A(3), 244-248.
- Donaldson IJ, Amin S, Hensman JJ, Kutejova E, Rattray M, Lawrence N, Hayes A, Ward CM, Bobola N. (2012). Genome-wide occupancy links *Hoxa2* to Wnt β -catenin signaling in mouse embryonic development. *Nucleic Acids Res*, 40(9), 3990-4001.
- Eavey RD. (1995). Microtia and significant auricular malformation. Ninety-two pediatric patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 121(1), 57-62.
- Elalaloui SC, Jaouad IC, Rifai L, Sefiani A. (2010). Autosomal dominant microtia. *Eur J Med Genet* 53, 100-103.
- Feingold M, Bossert WH. (1974). Normal values for selected physical parameters: an aid to syndrome delineation. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 10(13), 1-16.
- Forrester MB, Merz RD. (2005). Descriptive epidemiology of anotia and microtia, Hawaii, 1986-2002. *Congenit Anom*, 45(4), 119-124.
- Gabrielli O, Bonifazi V, Offidani AM, Cellini A, Coppa GV, Giorgi PL. (1993). Description of a patient with difficult nosological classification: Goldenhar syndrome or Townes-Brocks syndrome. *Minerva Pediatr*, 45, 459-462.
- Gendron C, Schwentker A, van Aalst JA. (2016). Genetic Advances in the Understanding of Microtia. *J Pediatr Genet*, 5(4), 189-197.
- Girirajan S, Eichler EE. (2010). Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. *Hum Mol Genet*, 19(R2), R176-187.
- Goodin K, Prucka S, Woolley AL, Kohlhase J, Smith RJH, Grant J, Robin NH. (2009). Familial transmission of oculoauriculovertebral spectrum (Goldenhar Syndrome) is not due to mutations in either *EYAI* or *SALL1*. *Am J Med Genet Part A*, 149A(3), 535-538.
- Habets LLMH, Bezuur M, Naeiji M, Hansson TL. (1988). The Orthopantomogram, an aid in diagnosis of temporomandibular joint problems. II. The vertical symmetry. *J Oral Rehabil*, 15(5), 465-471.
- Hao S, Jin L, Li C, Wang H, Zheng F, Ma D, Zhang T. (2017). Mutational analysis of *GSC*, *HOXA2* and *PRKRA* in 106 Chinese patients with microtia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 93, 78-82.

- Hunter A, Frias JL, Gillessen-Kaesbach G, Hughes H, Jones KL, Wilson L. (2009). Elements of morphology: standard terminology for the ear. *Am J Med Genet A*, 149A(1), 40-60.
- Isaac C, Marsh KL, Paznekas WA, Dixon J, Dixon MJ, Jabs EW, Meier UT. (2000). Characterization of the nucleolar gene product, treacle, in Treacher Collins syndrome. *Mol Biol Cell*, 11(9), 3061-3071.
- Kawakami Y, Uchiyama Y, Rodriguez Esteban C, Inenaga T, Koyano-Nakagawa N, Kawakami H, Marti M, Kmita M, Monaghan-Nichols P, Nishinakamura R, Izpisua Belmonte JC. (2009). Sall genes regulate region-specific morphogenesis in the mouse limb by modulating Hox activities. *Development*, 136(4), 585-594.
- Keegan CE, Mulliken JB, Wu BL, Korf BR. (2001). Townes-Brocks syndrome versus expanded spectrum hemifacial microsomia: review of eight patients and further evidence of a "hot spot" for mutation in the SALL1 gene. *Genet Med*, 3(4), 310-313.
- Kingsley DM, Bland AE, Grubber JM, Marker PC, Russell LB, Copeland Ng and Jenkins NA (1992). The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* 71, 399-410.
- Kosaki R, Fujimaru R, Samejima H, Yamada H, Izumi K, Iijima K, Kosaki K.(2007). Wide phenotypic variations within a family with *SALL1* mutations: Isolated external ear abnormalities to Goldenhar syndrome. *Am J Med Genet A*, 143A(10), 1087-1090.
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW, Lott IT, Richard JM, Sun SC. (1985). Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*, 313(14), 837-841.
- Lee KT, Yang EJ, Lim SY, Pyon JK, Mun GH, Bang SI, Oh KS. (2012). Association of congenital microtia with environmental risk factors in South Korea. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 76(3), 357-61.
- Liao J, Kochilas L, Nowotschin S, Arnold JS, Aggarwal V, Epstein JA, Brown MC, Adams J, Morrow BE. (2004). Full spectrum of malformations in velo- cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome mouse models by altering Tbx1 dosage. *Human Molecular Genetics*, 13(15), 1577-1585.
- Llano-Rivas I, González-del Ángel A, del Castillo V, Reyes R, Carnevale A. (1999). Microtia: A clinical and genetic study at the National Institute of Pediatrics in Mexico City. *Arch Med Res*, 30, 120-124.
- Luquetti DV, Heike CL, Hing AV, Cunningham ML, Cox TC. (2012). Microtia: epidemiology and genetics. *Am J Med Genet A*, 158A(1), 124-139.
- Ma C, Carmichael SL, Scheuerle AE, Canfield MA, Shaw GM. (2010). Association of Microtia With Maternal Obesity and Periconceptional Folic Acid Use. *Am J Med Genet A*, 152A(11), 2756-2761.
- Maconochie M, Krishnamurthy R, Nonchev S, Meier P, Manzanares M, Mitchell PJ, Krumlauf R. (1999). Regulation of Hoxa2 in cranial neural crest cells involves members of the AP-2 family. *Development*, 126, 1483-1494.

- Marx, H. (1926). Die Missbildungen des ohres. In: AKO Denker (Ed), Handbuch der Spez Path Anatomie Histologie Berlin (p.131). Germany: Springer.
- Mastroiacovo P, Corchia C, Botto LD, Lanni R, Zampino G, Fusco D. (1995). Epidemiology and genetics of microtia-antia: a registry based study on over one million births. *J Med Genet*, 32(6), 453-457.
- Merlob P, Stahl B, Klinger G. (2009). Tetrad of the possible mycophenolate mofetil embryopathy: a review. *Reprod Toxicol*, 28(1), 105-108.
- Minoux M, Rijli FM. (2010). Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development*, 137(16), 2605-2621.
- Minoux M, Kratochwil CF, Ducret S, Amin S, Kitazawa T, Kurihara H, Bobola N, Vilain N, Rijli FM. (2013). Mouse *Hoxa2* mutations provide a model for microtia and auricle duplication. *Development*, 140, 4386-4397.
- Monks DC, Jahangir A, Shanske AL, Samanich J, Morrow BE, Babcock M. (2010). Mutational analysis of *HOXA2* and *SIX2* in a Bronx population with isolated microtia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 74(8), 878-882.
- Muñoz-Pedroza LA, Arenas-Sordo ML. (2013). Clinical features of 149 patients with facio-auriculo-vertebral spectrum. *Otorrinolaringol Esp*, 64(5), 359-362.
- Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, Sato A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Scully S, Lacey DL, Katsuki M, Asashima M, and Yokota T. (2001). Murine homolog of *SALL1* is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development (Camb.)*, 128, 3105-3115.
- Okajima H, Takeichi Y, Umeda K, Baba S. (1996). Clinical analysis of 592 patients with microtia. *Acta Otolaryngol Suppl*, 525, 18-24.
- Piceci F, Morlino S, Castori M, Buffone E, De Luca A, Grammatico P, Guida V. (2017). Identification of a second *HOXA2* nonsense mutation in a family with autosomal dominant non-syndromic microtia and distinctive ear morphology. *Clin Genet*, 91(5), 774-779.
- Pruzansky S. (1969). Not all dwarfed mandibles are alike. *Birth Defects*, 1, 120-129.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. (2015). 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*, 17(5), 405-424.
- Rollnick BR, Kaye CI, Nagatoshi K, Hauck W, Martin AO. (1987). Oculoauriculovertebral dysplasia and variants: phenotypic characteristics of 294 patients. *Am J Med Genet*, 26(2), 361-375.
- Shaw GM, Carmichael SL, Kaidarova Z, Harris JA. (2004). Epidemiologic characteristics of anotia and microtia in California, 1989-1997. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 70(7), 472-475.
- Su PH, Yu JS, Chen JY, Chen SJ, Li SJ, Chen HN. (2007). Mutations and new polymorphic changes in the *TCOF1* gene of patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum and Treacher-Collins

syndrome. *Clin Dysmorphol*, 16(4), 261-267.

- Suutarla S, Rautio J, Ritvanen A, Ala-Mello S, Jero J, Klockars T. (2007). Microtia in Finland: comparison of characteristics in different populations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 71(8), 1211-1217.
- Tanzer RC. (1978). Microtia. *Clin Plast Surg*, 5(3), 317-336.
- Tasse C, 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, Gillissen-Kaesbach G, Wieczorek D. (2005). Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): clinical evaluation and severity scoring of 53 patients and proposal for a new classification. *Eur J Med Genet*, 48(4), 397-411.
- Tsang BL, Devine OJ, Cordero AM, Marchetta CM, Mulinare J, Mersereau P, Guo J, Qi YP, Berry RJ, Rosenthal J, Crider KS, Hamner HC. (2015). Assessing the association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T polymorphism and blood folate concentrations: a systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *Am J Clin Nutr*, 101(6), 1286-1294.
- Velázquez-Aragón JA, Alcántara-Ortigoza MA, Estandia-Ortega B, Reyna-Fabián ME, Cruz-Fuentes C, Villagómez S, González-del Angel A. (2012). Association of interactions among the IRF6 gene, the 8q24 region, and maternal folic acid intake with non-syndromic cleft lip/palate in Mexican Mestizos. *Am J Med Genet A*, 158A(12), 3207-3210.
- Touliatou V, Fryssira H, Mavrou A, Kanavakis E, Kitsiou-Tzeli S. (2006). Clinical manifestations in 17 Greek patients with Goldenhar syndrome. *Genet Couns*, 17, 359-370.
- Vendramini S, Richieri-Costa A, Guion-Almeida ML. (2007). Oculoauriculovertebral spectrum with radial defects: a new syndrome or an extension of the oculoauriculovertebral spectrum? Report of fourteen Brazilian cases and review of the literature. *Eur J Hum Genet*, 15(4), 411-421.
- Vento AR, LaBrie RA, Mulliken JB. (1991). The O.M.E.N.S. classification of hemifacial microsomia. *Cleft Palate Craniofac J*, 28, 68-76.
- Weerda H. (1988). Classification of congenital deformities of the auricle. *Facial Plastic Surgery*, 5(5), 385-388.
- Zou D, Erickson C, Kim E-U, Jin D, Fritsch B, Xu P-X. (2008). *Eya1* gene dosage critically affects the development of sensory epithelia in the mammalian inner ear. *Hum Mol Genet*, 17(21), 3340-3356.

ANEXO 1. Hoja de captación de datos de la población objetivo, padres y familiares afectados

PROYECTO: ESTUDIO MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTIA COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

I. Datos Generales.

Nombre del Paciente: _____
Sexo del paciente: 1.M() 2. F ()
Edad actual: _____ Fecha de nacimiento: _____
Lugar de nacimiento: _____
Institución: 1. INP Expediente _____ 2. INR Expediente _____
3. Ambas _____
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 de DNA: _____
Teléfonos (casa/celular): _____
Dirección: _____

II. Antecedentes familiares y árbol genealógico.

Consanguinidad: 0. No() 1. Sí () Endogamia: 0. No() 1. Sí ()
Caso: 1. Familiar() 2. Unico ()
Indicar familiares con microtia y/o malformaciones congénitas:

III. Antecedentes perinatales.

Exposición a teratógenos (primer trimestre del embarazo): 0. No() 1. Sí ()
¿Cuál(es)? _____

IV. Cuadro clínico y estudios (Caso índice)

Clasificación de la microtia

Lateralidad: 1. Bilateral () 2. Unilateral izquierda () 3. Unilateral derecha ()

Longitud de pabellones auriculares (cm):

Derecho: _____ 1. $Pc < 3$ () 2. $Pc > 3$ () Izquierdo: _____ 1. $Pc < 3$ () 2. $Pc > 3$ ()

Conducto auditivo externo izquierdo: 1. Normal () 2. Estenosis () 3. Atresia ()

Conducto auditivo externo derecho: 1. Normal () 2. Estenosis () 3. Atresia ()

Tomografía de oído con malformación: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Grado de la microtia (lado izquierdo): 1. I () 2. II () 3. III () 4. IV ()

Grado de la microtia (lado derecho): 1. I () 2. II () 3. III () 4. IV ()

Audición

Audiometría:

Oído derecho 1. Normal () 2. Hipoacusia conductiva () 3. Hipoacusia neurosensorial

4. Hipoacusia mixta ()

Oído izquierdo 1. Normal () 2. Hipoacusia conductiva () 3. Hipoacusia neurosensorial

4. Hipoacusia mixta ()

Malformaciones asociadas

Longitud de rama mandibular derecha: _____ Longitud de rama mandibular izquierda: _____

Microsomía hemifacial por ortopantomografía: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Alteraciones vertebrales por radiografía de columna vertebral completa:

0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Alteraciones renales por ultrasonido: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Presencia de quiste dermoide: 0. No () 1. Sí ()

Fotografías: frente y lateral de cara y de pabellón auricular derecho e izquierdo

V. Cuadro clínico y estudios (Madre)

Clasificación de la microtia

Lateralidad: 1. Bilateral () 2. Unilateral izquierda () 3. Unilateral derecha ()

Longitud de pabellones auriculares (cm):

Derecho: _____ 1. Pc<3 () 2. Pc>3 () Izquierdo: _____ 1. Pc<3 () 2. Pc>3 ()

Conducto auditivo externo izquierdo: 1. Normal () 2. Estenosis () 3. Atresia ()

Conducto auditivo externo derecho: 1. Normal () 2. Estenosis () 3. Atresia ()

En caso de mutación identificada en el hijo: Tomografía de oído con malformación: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Grado de la microtia (lado izquierdo): 1. I () 2. II () 3. III () 4. IV ()

Grado de la microtia (lado derecho): 1. I () 2. II () 3. III () 4. IV ()

Audición

Audiometría:

Oído derecho 1. Normal () 2. Hipoacusia conductiva () 3. Hipoacusia neurosensorial

4. Hipoacusia mixta ()

Oído izquierdo 1. Normal () 2. Hipoacusia conductiva () 3. Hipoacusia neurosensorial

4. Hipoacusia mixta ()

Malformaciones asociadas

Longitud de rama mandibular derecha: _____ Longitud de rama mandibular izquierda: _____

Microsomía hemifacial por ortopantomografía: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Alteraciones vertebrales por radiografía de columna vertebral completa:

0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Alteraciones renales por ultrasonido: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Presencia de quiste dermoide: 0. No () 1. Sí ()

Fotografías: frente y lateral de cara y de pabellón auricular derecho e izquierdo

VI. Cuadro clínico y estudios (Padre)

Clasificación de la microtia

Lateralidad: 1. Bilateral () 2. Unilateral izquierda () 3. Unilateral derecha ()

Longitud de pabellones auriculares (cm):

Derecho: _____ 1. $Pc < 3$ () 2. $Pc > 3$ () Izquierdo: _____ 1. $Pc < 3$ () 2. $Pc > 3$ ()

Conducto auditivo externo izquierdo: 1. Normal () 2. Estenosis () 3. Atresia ()

Conducto auditivo externo derecho: 1. Normal () 2. Estenosis () 3. Atresia ()

En caso de mutación identificada en el hijo: Tomografía de oído con malformación: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Grado de la microtia (lado izquierdo): 1. I () 2. II () 3. III () 4. IV ()

Grado de la microtia (lado derecho): 1. I () 2. II () 3. III () 4. IV ()

Audición

Audiometría:

Oído derecho 1. Normal () 2. Hipoacusia conductiva () 3. Hipoacusia neurosensorial

4. Hipoacusia mixta ()

Oído izquierdo 1. Normal () 2. Hipoacusia conductiva () 3. Hipoacusia neurosensorial

4. Hipoacusia mixta ()

Malformaciones asociadas

Longitud de rama mandibular derecha: _____ Longitud de rama mandibular izquierda: _____

Microsomía hemifacial por ortopantomografía: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Alteraciones vertebrales por radiografía de columna vertebral completa:

0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Alteraciones renales por ultrasonido: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Presencia de quiste dermoide: 0. No () 1. Sí ()

Fotografías: frente y lateral de cara y de pabellón auricular derecho e izquierdo

VI. Familiares afectados.

Nombre del paciente: _____

Individuo de la genealogía: _____

Registro interno para la muestra de DNA: _____

Clasificación de la microtia

Lateralidad: 1. Bilateral () 2. Unilateral izquierda () 3. Unilateral derecha ()

Longitud de pabellones auriculares (cm):

Derecho: _____ 1. $Pc < 3$ () 2. $Pc > 3$ () Izquierdo: _____ 1. $Pc < 3$ () 2. $Pc > 3$ ()

Conducto auditivo externo izquierdo: 1. Normal () 2. Estenosis () 3. Atresia ()

Conducto auditivo externo derecho: 1. Normal () 2. Estenosis () 3. Atresia ()

En caso de mutación identificada en el familiar: Tomografía de oído con malformación: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Grado de la microtia (lado izquierdo): 1. I () 2. II () 3. III () 4. IV ()

Grado de la microtia (lado derecho): 1. I () 2. II () 3. III () 4. IV ()

Audición

Audiometría:

Oído derecho 1. Normal () 2. Hipoacusia conductiva () 3. Hipoacusia neurosensorial

4. Hipoacusia mixta ()

Oído izquierdo 1. Normal () 2. Hipoacusia conductiva () 3. Hipoacusia neurosensorial

4. Hipoacusia mixta ()

Malformaciones asociadas

Longitud de rama mandibular derecha: _____ Longitud de rama mandibular izquierda: _____

Microsomía hemifacial por ortopantomografía: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Alteraciones vertebrales por radiografía de columna vertebral completa:

0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Alteraciones renales por ultrasonido: 0. No () 1. Sí ()

Descripción: _____

Presencia de quiste dermoide: 0. No () 1. Sí ()

Fotografías: frente y lateral de cara y de pabellón auricular derecho e izquierdo

ANEXO 2. Carta de Consentimiento Informado para los padres/tutor

PROYECTO: ESTUDIO MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTTIA COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

¿Para qué se efectúa este estudio?

Para conocer más sobre la causa genética de la alteración del pabellón auricular (microttia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV) que presenta su hijo(a) y con los resultados poder contribuir al diagnóstico y entendimiento de esta malformación.

¿En qué consiste el estudio?

Se tomará una muestra de sangre periférica (3-5 ml) y/o de células de descamación de mucosa oral para obtener el material genético (ADN) de su hijo(a), el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones de genes que pueden estar implicadas en la alteración del pabellón auricular (microttia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)). Además, en una sola ocasión, se tomarán fotografías de la cara y los pabellones auriculares y se medirán estos últimos. Se espera contar con la participación de mínimo 100 pacientes para este estudio.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría e Instituto Nacional de Rehabilitación que tengan diagnóstico de alteración del pabellón auricular (microttia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) y sus familiares con la misma alteración.

¿Quiénes no podrán participar en el estudio?

Aquellos pacientes que no deseen participar en el estudio y no firmen cartas de consentimiento y/o asentimiento informado.

¿Qué se le pedirá a mi hijo(a) que haga?

Se le pedirá que coopere durante la toma de una muestra de sangre periférica (3 a 5 ml) y/o de células de descamación de mucosa oral, que se realizará en una sola ocasión por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad como la utilización de guantes y material estéril y desechable. También se le pedirá su disposición para la medición de los pabellones auriculares y la toma de fotografías de estos últimos y de la cara.

¿Quién sufragará los gastos del estudio?

La TAC de oído, radiografías de columna y ultrasonido renal del paciente dado que forman parte del abordaje de microttia deberán ser pagados por los padres/tutor. La ortopantomografía y el estudio molecular de los cinco genes candidatos no tendrá costo para usted. Tampoco recibirá una compensación económica por aceptar participar en el mismo.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas sobre este estudio?

Puede comunicarse con los investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Lilitana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Puede comunicarse con el investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402.

En caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante puede comunicarse con el Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

¿Mi hijo(a) puede negarse a participar en este estudio o abandonar el estudio?

La participación de su hijo(a) es total y absolutamente voluntaria. En cualquier momento puede abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su hijo(a) en los servicios de la Institución.

¿Quiénes van a tener información de los datos de mi hijo(a)?

Los datos personales de su hijo(a) en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica impresa de su hijo(a) que se recabe para el presente proyecto quedará resguardada bajo llave y las fotografías e información genética en archivos electrónicos encriptados. Para preservar la confidencialidad sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información, de los pacientes del INP la Dra. Ariadna González del Angel y de los pacientes del INR la Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Los estudios de gabinete solicitados se resguardarán en los archivos correspondientes de cada institución (clínico y radiológico). En caso de que se identifique una variante génica en su hijo(a) se le contactará vía telefónica o mediante telegrama para solicitarle su autorización para publicar la información clínica (incluyendo las fotografías) y genética en una revista médica de arbitraje internacional.

¿Qué se va a hacer con la muestra biológica (extracción de DNA) de mi hijo(a)?

La muestra será codificada con una clave que no incluya su nombre y datos clínicos en su contenedor y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La muestra sólo puede ser analizada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto y quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud durante los 3 años que durará la realización de este estudio. Esta muestra será para uso exclusivo de este proyecto y en caso de ser requerida para futuros estudios de investigación se le volverá a contactar vía telefónica o mediante telegrama para firmar una nueva carta de consentimiento informado, siempre y cuando usted lo autorice (sí autorizo ___ no autorizo ___). En caso de no dar autorización para su almacenamiento y estudio posterior, la muestra será desechada al término de este proyecto. En todos los casos se mantendrá la confidencialidad de la información derivada de dichos estudios.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Sí, si usted lo desea recibirá posteriormente una consulta con los genetistas clínicos donde se le informará sobre los hallazgos obtenidos de la valoración clínica y de los estudios de gabinete solicitados así como de los hallazgos en el ADN (moleculares) encontrados (sí deseo recibir resultados___ no deseo recibir resultados___).

¿Qué beneficios obtendrá mi hijo(a) por participar en el estudio?

El seguimiento y manejo del paciente no se verá modificado por los resultados obtenidos en este estudio de investigación, ya que el objetivo del proyecto es conocer más sobre la causa genética de la alteración del pabellón auricular (microtía o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) para poder contribuir al diagnóstico y entendimiento de esta malformación. Por lo que su hijo(a) no obtendrá un beneficio directo por participar.

¿Podría existir algún evento adverso durante el estudio?

Sí, en caso de obtener poco material genético al tomar la muestra de sangre y/o de células de descamación de mucosa oral se le recontactará vía telefónica o mediante telegrama por los investigadores responsables del proyecto para solicitarle a su hijo(a) que acuda a una nueva toma de muestra.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que acepto la participación de mi hijo(a) en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente, se me ha informado que si deseamos no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo(a) dentro de la Institución y cuáles de los estudios del presente proyecto de investigación no tendrán un costo para mí.

Atentamente

	Firma	Fecha
--	-------	-------

	Firma	Fecha
--	-------	-------

Nombre del paciente: _____

	Dirección	Fecha y Firma
--	-----------	---------------

	Dirección	Fecha y Firma
--	-----------	---------------

Obtuvo el consentimiento: _____

	Nombre	Fecha
--	--------	-------

Investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Liliana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402.

Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

ANEXO 3. Carta de Consentimiento Informado para sujetos en investigación

PROYECTO: ESTUDIO MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTIA COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

¿Para qué se efectúa este estudio?

Para conocer más sobre la causa genética de la alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV) que presenta usted y con los resultados poder contribuir al diagnóstico y entendimiento de esta malformación.

¿En qué consiste el estudio?

Se le tomará una muestra de sangre periférica (3-5 ml) y/o de células de descamación de mucosa oral para obtener su material genético (ADN), el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones de genes que pueden estar implicadas en la alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)). Además, en una sola ocasión, se le tomarán fotografías de la cara y los pabellones auriculares y se medirán estos últimos. Se espera contar con la participación de mínimo 100 pacientes para este estudio.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría e Instituto Nacional de Rehabilitación que tengan diagnóstico de alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) y sus familiares con la misma alteración.

¿Quiénes no podrán participar en el estudio?

Aquellos pacientes que no deseen participar en el estudio y no firmen cartas de consentimiento y/o asentimiento informado.

¿Qué se le pedirá que haga?

Se le pedirá que coopere durante la toma de una muestra de sangre periférica (3 a 5 ml) y/o de células de descamación de mucosa oral, que se realizará en una sola ocasión, por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como la utilización de guantes y material estéril y desechable. También se le pedirá su disposición para la medición de los pabellones auriculares y la toma de fotografías de estos últimos y de la cara.

¿Quién sufragará los gastos del estudio?

La TAC de oído, radiografías de columna y ultrasonido renal dado que forman parte del abordaje de microtia deberán ser pagados por el paciente. La ortopantomografía y el estudio molecular de los cinco genes candidatos no tendrá costo para usted. Tampoco recibirá una compensación económica por aceptar participar en el mismo.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas sobre este estudio?

Puede comunicarse con los investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Liliana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Puede comunicarse con el investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402.

En caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante puede comunicarse con el Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

¿Puedo negarme a participar o abandonar el estudio?

Su participación es total y absolutamente voluntaria. En cualquier momento, puede abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en su atención en los servicios de la Institución.

¿Quiénes van a tener información de mis datos?

Sus datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda su información clínica impresa que se recabe para el presente proyecto quedará resguardada bajo llave y las fotografías e información genética en archivos electrónicos encriptados. Para preservar la confidencialidad sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información, de los pacientes del INP la Dra. Ariadna González del Angel y de los pacientes del INR la Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Los estudios de gabinete solicitados se resguardarán en los archivos correspondientes de cada institución (clínico y radiológico). En caso de que se identifique una variante génica en usted se le contactará vía telefónica o mediante telegrama para solicitarle su autorización para publicar la información clínica (incluyendo las fotografías) y genética en una revista médica de arbitraje internacional.

¿Qué se va a hacer con mi muestra biológica (extracción de DNA)?

La muestra será codificada con una clave que no incluya su nombre y datos clínicos en su contenedor y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La muestra sólo puede ser analizada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto y quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud durante los 3 años que durará la realización de este estudio. Esta muestra será para uso exclusivo de este proyecto y en caso de ser requerida para futuros estudios de investigación se le volverá a contactar vía telefónica o mediante telegrama para firmar una nueva carta de consentimiento informado, siempre y cuando usted lo autorice (sí autorizo___ no autorizo___). En caso de no dar autorización para su almacenamiento y estudio posterior, la muestra será desechada al término de este proyecto. En todos los casos se mantendrá la confidencialidad de la información derivada de dichos estudios.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Sí, si usted lo desea recibirá posteriormente una consulta con los genetistas clínicos donde se le informará sobre los hallazgos obtenidos de la valoración clínica y de los estudios de gabinete solicitados así como de los hallazgos en el ADN (moleculares) encontrados (sí deseo recibir resultados___ no deseo recibir resultados___).

¿Qué beneficios obtendré por participar en el estudio?

Su seguimiento y manejo no se verá modificado por los resultados obtenidos en este estudio de investigación, ya que el objetivo del proyecto es conocer más sobre la causa genética de la alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) para poder contribuir al diagnóstico y entendimiento de esta malformación. Por lo que no obtendrá un beneficio directo por participar.

¿Podría existir algún evento adverso durante el estudio?

Sí, en caso de obtener poco material genético al tomar la muestra de sangre y/o de células de descamación de mucosa oral se le recontactará vía telefónica o mediante telegrama por los investigadores responsables del proyecto para solicitarle que acuda a una nueva toma de muestra.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que participaré en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente, se me ha informado que si deseo no participar, ello no repercutirá en mi atención médica dentro de la Institución y cuáles de los estudios del presente proyecto de investigación no tendrán un costo para mí.

Atentamente

Nombre	Firma	Fecha
--------	-------	-------

Nombre del testigo	Dirección	Fecha y Firma
--------------------	-----------	---------------

Nombre del testigo	Dirección	Fecha y Firma
--------------------	-----------	---------------

Obtuvo el consentimiento: _____

Nombre	Fecha
--------	-------

Investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Liliana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402.

Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

ANEXO 4. Carta de Asentimiento Informado

PROYECTO: ESTUDIO MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTIA COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

¿Para qué se hace este estudio?

Para conocer mejor la causa genética que origina tu enfermedad.

¿En qué consiste el estudio?

Se te tomará una muestra de 3-5 ml de sangre y/o un raspado con un cepillo fino del interior de tu boca y lengua y se estudiarán regiones de genes que pueden estar relacionadas con tu enfermedad. Además, en una sola ocasión, se tomarán fotos de tu cara y pabellones auriculares y se medirán estas últimas. Se espera contar con la participación de mínimo 100 niños como tú para este estudio.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría e Instituto Nacional de Rehabilitación que tengan alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) y sus familiares con la misma alteración.

¿Quiénes no podrán participar en el estudio?

Aquellos niños que no deseen participar en el estudio.

¿Qué se te pedirá que hagas?

Se te tomará una muestra de sangre (3 a 5 ml) y/o un raspado con un cepillo fino del interior de tu boca y lengua por personas calificadas y bajo todas las medidas de seguridad, como el uso de guantes, material limpio y desechable. También se te pedirá ayuda para medir tus pabellones auriculares y tomar las fotos de estos últimos y de tu cara.

¿Quién pagará los gastos del estudio?

Los estudios del oído, columna y riñón (TAC de oído, radiografías de columna y ultrasonido renal) como forman parte del estudio de tu enfermedad deberán ser pagados por tus padres/tutor. El estudio de la cara (ortopantomografía) y el estudio de tu información genética no tendrá costo para tus padres/tutor. Tampoco recibirás dinero por participar en este estudio.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?

Puedes comunicarte con los investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega, Dra. Liliana Fernández Hernández y/o a la Dra. María de la Luz Arenas Sordo, así como con la Dra. Matilde Ruíz García en caso de que tengas dudas sobre tus derechos.

¿Puedo negarme a participar en este estudio o abandonar el estudio?

Puedes participar si quieres o puedes decidir ya no participar en el estudio en cualquier momento, sin que esto afecte tu atención en el hospital.

¿Quiénes van a tener la información de mis datos?

Toda tu información será mantenida en secreto y no será compartida con otras personas, sólo la conocerán los médicos e investigadores que te invitaron a participar en este proyecto.

¿Qué van a hacer con la muestra que ya no usen?

A tu muestra se le pondrá una clave que no tenga tu nombre y no será compartida con nadie si tú no lo permites. Quedará guardada en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud. Tu muestra sólo se usará para este estudio y en caso de que se necesite en un futuro se te volverá a llamar para firmar una nueva.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Sí, si tú quieres recibirás después una plática con los médicos quienes te explicarán lo que se encontró en el estudio.

¿Qué voy a ganar por participar en el estudio?

Tus consultas en el hospital no cambiarán si participas o no en este estudio. Lo que se quiere conocer con este proyecto es qué causó la alteración de tu pabellón auricular para poder entender mejor tu enfermedad. Por lo tanto no ganarás nada extra por participar.

¿Podría existir algún problema durante el estudio?

Sí, si se obtiene poca muestra de sangre y/o células de tu boca se te llamará para que vengas al hospital a que se te tome otra muestra.

DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que participaré en este estudio. He leído con cuidado esta carta, me explicaron claramente de que se trata este estudio y respondieron mis dudas. Entiendo que no recibiré dinero por participar. Me explicaron que aunque no quiera participar mi atención médica en el hospital será la misma y cuáles estudios no tendrán un costo para mí ni para mis papás.

Atentamente

Nombre del Paciente	Firma	Fecha y Firma
Nombre del testigo	Dirección	Fecha y Firma
Nombre del testigo	Dirección	Fecha y Firma
Obtuvo el consentimiento:	Nombre	Fecha

Investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Liliana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402.

Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

ANEXO 5. Carta de Consentimiento Informado para los padres/tutor de familiar afectado

PROYECTO: ESTUDIO MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTIA COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

¿Para qué se efectúa este estudio?

Para conocer más sobre la causa genética de la alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV) que presenta su hijo(a) y con los resultados poder contribuir al diagnóstico y entendimiento de esta malformación.

¿En qué consiste el estudio?

Se tomará una muestra de sangre periférica (3-5 ml) y/o de células de descamación de mucosa oral para obtener el material genético (ADN) de su hijo(a), el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones de genes que pueden estar implicadas en la alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)). Además, en una sola ocasión, se tomarán fotografías de la cara y los pabellones auriculares y se medirán estos últimos. Se espera contar con la participación de mínimo 100 pacientes para este estudio.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría e Instituto Nacional de Rehabilitación que tengan diagnóstico de alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) y sus familiares con la misma alteración.

¿Quiénes no podrán participar en el estudio?

Aquellos pacientes que no deseen participar en el estudio y no firmen cartas de consentimiento y/o asentimiento informado.

¿Qué se le pedirá a mi hijo(a) que haga?

Se le pedirá que coopere durante la toma de una muestra de sangre periférica (3 a 5 ml) y/o de células de descamación de mucosa oral, que se realizará en una sola ocasión por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad como la utilización de guantes y material estéril y desechable. También se le pedirá su disposición para la medición de los pabellones auriculares y la toma de fotografías de estos últimos y de la cara.

¿Quién sufragará los gastos del estudio?

La TAC de oído, radiografías de columna y ultrasonido renal del paciente dado que forman parte del abordaje de microtia deberán ser pagados por los padres/tutor. La ortopantomografía y el estudio molecular de los cinco genes candidatos no tendrá costo para usted. Tampoco recibirá una compensación económica por aceptar participar en el mismo.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas sobre este estudio?

Puede comunicarse con los investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Liliana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Puede comunicarse con el investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402.

En caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante puede comunicarse con el Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

¿Mi hijo(a) puede negarse a participar en este estudio o abandonar el estudio?

La participación de su hijo(a) es total y absolutamente voluntaria. En cualquier momento puede abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su hijo(a) en los servicios de la Institución.

¿Quiénes van a tener información de los datos de mi hijo(a)?

Los datos personales de su hijo(a) en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica impresa de su hijo(a) que se recabe para el presente proyecto quedará resguardada bajo llave y las fotografías e información genética en archivos electrónicos encriptados. Para preservar la confidencialidad sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información, de los pacientes del INP la Dra. Ariadna González del Angel y de los pacientes del INR la Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Los estudios de gabinete solicitados se resguardarán en los archivos correspondientes de cada institución (clínico y radiológico). En caso de que se identifique una variante génica en su hijo(a) se le contactará vía telefónica o mediante telegrama para solicitarle su autorización para publicar la información clínica (incluyendo las fotografías) y genética en una revista médica de arbitraje internacional.

¿Qué se va a hacer con la muestra biológica (extracción de DNA) de mi hijo(a)?

La muestra será codificada con una clave que no incluya su nombre y datos clínicos en su contenedor y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La muestra sólo puede ser analizada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto y quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud durante los 3 años que durará la realización de este estudio. Esta muestra será para uso exclusivo de este proyecto y en caso de ser requerida para futuros estudios de investigación se le volverá a contactar vía telefónica o mediante telegrama para firmar una nueva carta de consentimiento informado, siempre y cuando usted lo autorice (sí autorizo___ no autorizo___). En caso de no dar autorización para su almacenamiento y estudio posterior, la muestra será desechada al término de este proyecto. En todos los casos se mantendrá la confidencialidad de la información derivada de dichos estudios.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Sí, si usted lo desea recibirá posteriormente una consulta con los genetistas clínicos donde se le informará sobre los hallazgos obtenidos de la valoración clínica y de los estudios de gabinete solicitados así como de los hallazgos en el ADN (moleculares) encontrados (sí deseo recibir resultados___ no deseo recibir resultados___).

¿Qué beneficios obtendrá mi hijo(a) por participar en el estudio?

El seguimiento y manejo del paciente no se verá modificado por los resultados obtenidos en este estudio de investigación, ya que el objetivo del proyecto es conocer más sobre la causa genética de la alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) para poder contribuir al diagnóstico y entendimiento de esta malformación. Por lo que su hijo(a) no obtendrá un beneficio directo por participar.

¿Podría existir algún evento adverso durante el estudio?

Sí, en caso de obtener poco material genético al tomar la muestra de sangre y/o de células de descamación de mucosa oral se le recontactará vía telefónica o mediante telegrama por los investigadores responsables del proyecto para solicitarle a su hijo(a) que acuda a una nueva toma de muestra.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que acepto la participación de mi hijo(a) en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente, se me ha informado que si deseamos no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo(a) dentro de la Institución y cuáles de los estudios del presente proyecto de investigación no tendrán un costo para mí.

Atentamente

	Firma	Fecha
--	-------	-------

	Firma	Fecha
--	-------	-------

Nombre del paciente: _____

	Dirección	Fecha y Firma
--	-----------	---------------

	Dirección	Fecha y Firma
--	-----------	---------------

Obtuvo el consentimiento: _____

	Nombre	Fecha
--	--------	-------

Investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Liliana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402.

Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

ANEXO 6. Carta de Consentimiento Informado para familiar afectado

PROYECTO: ESTUDIO MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTIA COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

¿Para qué se efectúa este estudio?

Para conocer más sobre la causa genética de la alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV) que presenta usted y con los resultados poder contribuir al diagnóstico y entendimiento de esta malformación.

¿En qué consiste el estudio?

Se le tomará una muestra de sangre periférica (3-5 ml) y/o de células de descamación de mucosa oral para obtener su material genético (ADN), el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones de genes que pueden estar implicadas en la alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)). Además, en una sola ocasión, se le tomarán fotografías de la cara y los pabellones auriculares y se medirán estos últimos. Se espera contar con la participación de mínimo 100 pacientes para este estudio.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría e Instituto Nacional de Rehabilitación que tengan diagnóstico de alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) y sus familiares con la misma alteración.

¿Quiénes no podrán participar en el estudio?

Aquellos pacientes que no deseen participar en el estudio y no firmen cartas de consentimiento y/o asentimiento informado.

¿Qué se le pedirá que haga?

Se le pedirá que coopere durante la toma de una muestra de sangre periférica (3 a 5 ml) y/o de células de descamación de mucosa oral, que se realizará en una sola ocasión, por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como la utilización de guantes y material estéril y desechable. También se le pedirá su disposición para la medición de los pabellones auriculares y la toma de fotografías de estos últimos y de la cara.

¿Quién sufragará los gastos del estudio?

La TAC de oído, radiografías de columna y ultrasonido renal dado que forman parte del abordaje de microtia deberán ser pagados por el paciente. La ortopantomografía y el estudio molecular de los cinco genes candidatos no tendrá costo para usted. Tampoco recibirá una compensación económica por aceptar participar en el mismo.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas sobre este estudio?

Puede comunicarse con los investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Liliana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Puede comunicarse con el investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402. En caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante puede comunicarse con el Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

¿Puedo negarme a participar o abandonar el estudio?

Su participación es total y absolutamente voluntaria. En cualquier momento, puede abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en su atención en los servicios de la Institución.

¿Quiénes van a tener información de mis datos?

Sus datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda su información clínica impresa que se recabe para el presente proyecto quedará resguardada bajo llave y las fotografías e información genética en archivos electrónicos encriptados. Para preservar la confidencialidad sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información, de los pacientes del INP la Dra. Ariadna González del Angel y de los pacientes del INR la Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Los estudios de gabinete solicitados se resguardarán en los archivos correspondientes de cada institución (clínico y radiológico). En caso de que se identifique una variante génica en usted se le contactará vía telefónica o mediante telegrama para solicitarle su autorización para publicar la información clínica (incluyendo las fotografías) y genética en una revista médica de arbitraje internacional.

¿Qué se va a hacer con mi muestra biológica (extracción de DNA)?

La muestra será codificada con una clave que no incluya su nombre y datos clínicos en su contenedor y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La muestra sólo puede ser analizada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto y quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud durante los 3 años que durará la realización de este estudio. Esta muestra será para uso exclusivo de este proyecto y en caso de ser requerida para futuros estudios de investigación se le volverá a contactar vía telefónica o mediante telegrama para firmar una nueva carta de consentimiento informado, siempre y cuando usted lo autorice (sí autorizo___ no autorizo___). En caso de no dar autorización para su almacenamiento y estudio posterior, la muestra será desechada al término de este proyecto. En todos los casos se mantendrá la confidencialidad de la información derivada de dichos estudios.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Sí, si usted lo desea recibirá posteriormente una consulta con los genetistas clínicos donde se le informará sobre los hallazgos obtenidos de la valoración clínica y de los estudios de gabinete solicitados así como de los hallazgos en el ADN (moleculares) encontrados (sí deseo recibir resultados___ no deseo recibir resultados___).

¿Qué beneficios obtendré por participar en el estudio?

Su seguimiento y manejo no se verá modificado por los resultados obtenidos en este estudio de investigación, ya que el objetivo del proyecto es conocer más sobre la causa genética de la alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) para poder contribuir al diagnóstico y entendimiento de esta malformación. Por lo que no obtendrá un beneficio directo por participar.

¿Podría existir algún evento adverso durante el estudio?

Sí, en caso de obtener poco material genético al tomar la muestra de sangre y/o de células de descamación de mucosa oral se le recontactará vía telefónica o mediante telegrama por los investigadores responsables del proyecto para solicitarle que acuda a una nueva toma de muestra.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que participaré en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente, se me ha informado que si deseo no participar, ello no repercutirá en mi atención médica dentro de la Institución y cuáles de los estudios del presente proyecto de investigación no tendrán un costo para mí.

Atentamente

Nombre	Firma	Fecha
Nombre del testigo	Dirección	Fecha y Firma
Nombre del testigo	Dirección	Fecha y Firma
Obtuvo el consentimiento:	Nombre	Fecha

Investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Liliana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402.

Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

ANEXO 7. Carta de Asentimiento Informado para familiar afectado

PROYECTO: ESTUDIO MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON MICROTIA COMO EXPRESIÓN MÍNIMA DEL ESPECTRO FACIO-AURÍCULO-VERTEBRAL (EFAV)

¿Para qué se hace este estudio?

Para conocer mejor la causa genética que origina tu enfermedad.

¿En qué consiste el estudio?

Se te tomará una muestra de 3-5 ml de sangre y/o un raspado con un cepillo fino del interior de tu boca y lengua y se estudiarán regiones de genes que pueden estar relacionadas con tu enfermedad. Además, en una sola ocasión, se tomarán fotos de tu cara y pabellones auriculares y se medirán estas últimas. Se espera contar con la participación de mínimo 100 niños como tú para este estudio.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría e Instituto Nacional de Rehabilitación que tengan alteración del pabellón auricular (microtia o espectro facio-aurículo-vertebral (EFAV)) y sus familiares con la misma alteración.

¿Quiénes no podrán participar en el estudio?

Aquellos niños que no deseen participar en el estudio.

¿Qué se te pedirá que hagas?

Se te tomará una muestra de sangre (3 a 5 ml) y/o un raspado con un cepillo fino del interior de tu boca y lengua por personas calificadas y bajo todas las medidas de seguridad, como el uso de guantes, material limpio y desechable. También se te pedirá ayuda para medir tus pabellones auriculares y tomar las fotos de estos últimos y de tu cara.

¿Quién pagará los gastos del estudio?

Los estudios del oído, columna y riñón (TAC de oído, radiografías de columna y ultrasonido renal) como forman parte del estudio de tu enfermedad deberán ser pagados por tus padres/tutor. El estudio de la cara (ortopantomografía) y el estudio de tu información genética no tendrá costo para tus padres/tutor. Tampoco recibirás dinero por participar en este estudio.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?

Puedes comunicarte con los investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega, Dra. Liliana Fernández Hernández y/o a la Dra. María de la Luz Arenas Sordo, así como con la Dra. Matilde Ruíz García en caso de que tengas dudas sobre tus derechos.

¿Puedo negarme a participar en este estudio o abandonar el estudio?

Puedes participar si quieres o puedes decidir ya no participar en el estudio en cualquier momento, sin que esto afecte tu atención en el hospital.

¿Quiénes van a tener la información de mis datos?

Toda tu información será mantenida en secreto y no será compartida con otras personas, sólo la conocerán los médicos e investigadores que te invitaron a participar en este proyecto.

¿Qué van a hacer con la muestra que ya no usen?

A tu muestra se le pondrá una clave que no tenga tu nombre y no será compartida con nadie si tú no lo permites. Quedará guardada en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud. Tu muestra sólo se usará para este estudio y en caso de que se necesite en un futuro se te volverá a llamar para firmar una nueva.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Sí, si tú quieres recibirás después una plática con los médicos quienes te explicarán lo que se encontró en el estudio.

¿Qué voy a ganar por participar en el estudio?

Tus consultas en el hospital no cambiarán si participas o no en este estudio. Lo que se quiere conocer con este proyecto es qué causó la alteración de tu pabellón auricular para poder entender mejor tu enfermedad. Por lo tanto no ganarás nada extra por participar.

¿Podría existir algún problema durante el estudio?

Sí, si se obtiene poca muestra de sangre y/o células de tu boca se te llamará para que vengas al hospital a que se te tome otra muestra.

DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que participaré en este estudio. He leído con cuidado esta carta, me explicaron claramente de que se trata este estudio y respondieron mis dudas. Entiendo que no recibiré dinero por participar. Me explicaron que aunque no quiera participar mi atención médica en el hospital será la misma y cuáles estudios no tendrán un costo para mí ni para mis papás.

Atentamente

--	--	--

--	--	--

--	--	--

Obtuvo el consentimiento: _____

Nombre	Fecha
--------	-------

Investigadores responsables del INP: Dra. Ariadna González del Ángel, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza, Dra. Bernardette Estandía Ortega y Liliana Fernández Hernández. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. 1306.

Investigador responsable del INR: Dra. María de la Luz Arenas Sordo. Servicio de Genética, 3° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, S.S. Tel 59-99-10-00 ext. 19402.

Presidente del Comité de Ética (INP): Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 ext. ext. 1581.

ANEXO 8. Secuencias de oligonucleótidos para amplificación por PCR del gen *HOXA2*

El diseño de los primers se realizó mediante herramientas en línea
(<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>)

Gen *HOXA2*

Secuencias de primers para el estudio de los exones codificantes y los bordes exón-intrón del gen *HOXA2*.

NM_006735.3, *NP_006726.1*

EXÓN	PRIMER F	T _m	PRIMER R	T _m	pb
1	CCCATACGGCTGTAATCAGT		CCCACATTACACAAGTTCG G		809
2	GAAAGGCAGCACAATAGCT C		GGAAGGGGTAGGTCAAGA AG		1005