

Los genes Hox en la etiología de la hernia diafragmática congénita y la atresia de esófago*

L. Martínez¹, W. Martínez-Calonge², R. Matesanz², V. Fernández-Dumont², F. Pederiva², M.T. Vallejo², J. Salinas², J.A. Tovar¹

¹Departamento de Cirugía Pediátrica. ²Unidad de Investigación. Hospital Universitario La Paz, Madrid.

RESUMEN: Introducción: La administración de adriamicina o nitrofen a las ratas gestantes produce en su descendencia, respectivamente, atresia esofágica (AE) con asociación VACTERL o hernia diafragmática congénita (HDC). La etiología de estas acciones no está clara, y han sido involucrados algunos genes como el sonic hedgehog, la familia Gli, la cascada de los retinoides y algunos genes homeóticos. Los genes Hox son los encargados de la segmentación del embrión y de controlar aspectos fundamentales del desarrollo. Los ratones con pérdida de función para Hoxa3, Hoxb3, Hoxc3, Hoxc4 y Hoxa5 muestran fenotipos compatibles con la asociación VACTERL, malformaciones cardíacas, bronquiales y pulmonares, atresia esofágica y malformaciones diafragmáticas. El presente trabajo resume nuestros hallazgos en las alteraciones de expresión de estos genes en ambos modelos experimentales.

Material y métodos: Para el modelo de AE usamos ratonas gestantes a las que se administró 4 mg/kg de adriamicina intraperitoneal en los días 7,5 y 8,5 de gestación (término=19 días). En el caso de la HDC se usó el mismo modelo, administrando nitrofen por vía intragástrica en el día 8. En ambos casos se usaron como grupo control animales a los que se dio por la misma vía el mismo volumen tan solo de excipiente. Los embriones fueron recuperados en los días 13, 14, 15 y 16 en el caso de la AE y en los días 14, 16 y 19 en el caso de la HDC. Los animales completos o sus pulmones y corazones se procesaron para técnicas morfológicas, inmunohistoquímicas y de biología molecular (RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real), centrándonos en los genes Hoxa3, Hoxa5, Hoxb3, Hoxb5, Hoxc4 y Hoxd3.

Resultados: AE: La inmunohistoquímica reveló grandes diferencias entre los fetos expuestos a adriamicina y los controles en la captación de los anticuerpos para Hoxa3, Hoxb3 y Hoxd3 en todos los tejidos salvo el corazón. La RT-PCR mostró una disminución en la expresión de esos genes en los pulmones pero no en el corazón en los animales tratados con el teratógeno. Lo mismo ocurrió además con Hoxc4.

HDC: la expresión de Hoxa3 y Hoxb5 fue similar en los corazones de los 2 grupos. Sin embargo el nitrofen ocasionó un incremento en la expresión de Hoxa5 y Hoxb3 en el corazón de los fetos expuestos en los días 14 y 19 y una disminución en el 16. En el análisis inmunohistoquímico no se encontraron diferencias entre los grupos.

Conclusiones: En ambos modelos experimentales son evidentes las alte-

raciones de los genes Hox estudiados, especialmente en tejido pulmonar y cardíaco. Las malformaciones de estos órganos asociadas a la AE y la HDC pueden ser debidas, entre otras causas, a alteraciones en la expresión de determinados genes Hox. Debido a su específica participación en la morfogénesis pulmonar y del intestino anterior, su estudio nos podría conducir a una mejor comprensión de la etiología de estas entidades.

PALABRAS CLAVE: Atresia de esófago; Hernia diafragmática congénita; Adriamicina; Nitrofen; Etiología; Genética; Genes Hox.

THE ETIOLOGY OF CONGENITAL DIAPHRAGMATIC HERNIA AND ESOPHAGEAL ATRESIA: THE HOX GENES

ABSTRACT: Background: SPrenatal administration of adriamycin or nitrofen to pregnant mice produce in the embryos, respectively, esophageal atresia/VACTERL association (EA) or congenital diaphragmatic hernia (CDH). Various genes and signalling pathways like sonic hedgehog, Gli family, retinoic acid and homeotic genes have been pointed out in the origin of these malformations. Hox genes are master regulatory genes involved in embryo segmentation and other main development processes. Hoxa3, Hoxb3, Hoxc3, Hoxc4 and Hoxa5 knock-out mice show cardiac, tracheal, lung and diaphragmatic malformations, EA and phenotypes that resemble that of VACTERL syndrome. We present herein some of our findings in the expression of these genes in both experimental models.

Material and methods: Pregnant mice were exposed either to 4 mg/kg of adriamycin or vehicle on embryonic days 7,5 and 8,5; embryos were recovered at four endpoints (E13 to 16). On the other hand, nitrofen was given to pregnant mice on embryonic day 8th and embryos were recovered at E14, E16 and E19. The embryos or, separately, their lungs and hearts, were randomly processed for immunohistochemical or molecular biology studies (RT-PCR). We used antibodies for Hoxa3, Hoxb3 and Hoxd3 proteins and specific primers for Hoxa3, Hoxa5, Hoxb3, Hoxb5, Hoxc4 and Hoxd3 genes.

Results: EA: Upon immunohistochemistry, adriamycin-exposed embryos showed a severe decrease in expression of Hoxa3, Hoxb3 and Hoxb3 proteins in heart, skin, foregut but not in the heart. RT-PCR studies showed a statistically significant decrease of the four genes studied in the lungs of OA mice when compared to controls. **CDH:** Upon RT-PCR assessment the expression of Hoxa5 and Hoxb3 were higher in nitrofen-exposed mice than in controls on E14 and E19 and weaker on E16. As regards immunohistochemical localization, expression of the three genes was similar in nitrofen and control animals.

Conclusions: Both experimental models exhibit an alteration in the expression of several proximal Hox genes, specially in lung and car-

Correspondencia: Dr. L. Martínez Martínez, Departamento de Cirugía Infantil, Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid. Email: lmartinezm.hulp@salud.madrid.org

*Este trabajo ha sido subvencionado en parte por ayudas del FIS (O3/0832), de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP) y de Fundación para la Investigación Mutua Madrileña.

Recibido: Mayo 2007

Aceptado: Octubre 2007

diac tissues. The malformations in these organs associated with CDH and EA could be in part caused by these alterations. Due to their specific participation in lung and foregut morphogenesis, their study could let us to better understand the mechanisms of CDH and EA.

KEY WORDS: Esophageal atresia; Congenital diaphragmatic hernia; Adriamycin; Nitrofen; Etiology; Hox genes.

INTRODUCCIÓN

La hernia diafragmática congénita (HDC) y la atresia de esófago son, seguramente, las dos entidades quirúrgicas neonatales más estudiadas en nuestra especialidad. Ambas se caracterizan, además de por el defecto anatómico que las define, por presentar cortejos sindrómicos acompañantes que afectan a múltiples órganos y que suelen condicionar el pronóstico funcional y vital del paciente⁽¹⁻⁵⁾.

En el caso de la HDC, el 100% de los fetos autopsiados con HDC y de un 40 a un 57% de los pacientes tienen malformaciones asociadas⁽¹⁻⁵⁾. Considerando los abortos, mortinatos y recién nacidos, las más frecuentes son defectos derivados del cierre del tubo neural, anomalías cardíacas, genitourinarias, gastrointestinales, esqueléticas, cromosómicas y pulmonares⁽⁶⁾. Son muy frecuentes por tanto los defectos del tubo neural⁽⁷⁾, las cardiopatías congénitas con defectos conotruncuales principalmente^(8,9), las malformaciones del esqueleto axial y los miembros^(10,11) y la asociación a síndromes derivados de malformaciones de los arcos branquiales⁽¹²⁾.

Por su parte, los pacientes con AE tienen una incidencia de malformaciones asociadas que puede llegar al 70%⁽¹³⁾. Las más frecuentes, por este orden, son cardiovasculares (especialmente aquellas relacionadas con el proceso de septación cardíaca y con los grandes vasos), anorrectales, genitourinarias, digestivas, vertebrales, esqueléticas, respiratorias y cromosómicas. En el caso concreto de la asociación VACTERL, se calcula que hasta el 25% de los recién nacidos con AE lo puede encuadrarse dentro de esta asociación sindrómica, lo que nos da una idea de la amplitud del defecto embriogénico que causa la malformación^(14,15).

Gran parte de lo poco que sabemos sobre la etiología de estas dos malformaciones procede de los dos modelos experimentales que reproducen en roedores no sólo la entidad clínica sino también la mayor parte de sus anomalías asociadas. En el caso de la HDC la exposición durante la vida embrionaria de roedores a nitrofen (2,4-dicloro-4'-nitrodifenil eter) ocasiona la hernia y el resto de malformaciones acompañantes^(16,17). Para la AE disponemos de un modelo basado en la administración intraperitoneal a la madre gestante de adriamicina⁽¹⁸⁾, un antibiótico extraído del *Streptomyces peucetius*. Como ocurre en la HDC, los fetos con AE presentan características que les permiten encuadrarse sin lugar a duda en el espectro de la asociación VACTERL⁽¹⁹⁾.

Por tanto, bien en la HDC o bien en la AE, es tan similar el cuadro polimalformativo en los roedores comparado con el humano, que no es aventurado predecir que el mecanis-

mo patogénico debe ser parecido^(9,20). Hasta la fecha se han estudiado múltiples vías que pueden explicar total o parcialmente este mecanismo. Han sido muchos los genes involucrados tales como sonic hedgehog, patched (PTCH)-smoothed (Smo), la familia Gli, la cascada de los retinoides y algunos genes homeóticos⁽²¹⁾.

Durante los últimos años una de nuestras líneas de investigación se ha centrado en el estudio de los genes Hox, una familia de genes homeóticos que se encargan de aportar información sobre el plan corporal que determina la segmentación axial y el desarrollo a lo largo del eje anteroposterior, e influyen fuertemente en la organogénesis regional a través de la diferenciación mesenquimal y de las interacciones epitelio-mesenquimales⁽²²⁾. Los 39 genes de la familia Hox en los mamíferos se encuentran agrupados en cuatro grupos o complejos en cuatro cromosomas diferentes (Hoxa, Hoxb, Hoxc y Hoxd)⁽²³⁾. La organización de los genes en cada complejo es fundamental para la regulación espaciotemporal precisa y, por tanto, para la correcta formación del embrión⁽²⁴⁾. Su función se puede conocer gracias a la creación de animales mutantes que pierden uno o los dos alelos de cada uno de los genes (en inglés knock-out)⁽²⁵⁾. Así, se sabe que los mutantes para Hoxa3, Hoxb3, Hoxc3, Hoxc4 y Hoxa5 muestran fenotipos compatibles con la asociación VACTERL, malformaciones cardíacas, bronquiales y pulmonares, atresia esofágica y malformaciones diafragmáticas, lo que les hace ser candidatos a participar en la etiología de la HDC y la AE⁽²⁶⁻³⁰⁾. El presente trabajo resume algunos de nuestros hallazgos en las alteraciones de expresión de estos genes en ambos modelos experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo experimental de HDC

Se usó el modelo de inducción de HDC mediante la administración de nitrofen a la ratona gestante. Brevemente, se emplearon 24 ratonas CBA hembra vírgenes de unos 30g de peso y machos de la misma raza con fertilidad probada, manipulados según las exigencias de la Unión Europea vigentes (EC 86/L609) y a las recogidas en el RD 1201/2005 de 10 de Octubre. Tras ser enjauladas 3 hembras por macho, el día 0,5 de la gestación fue contado a partir del momento en que el frotis vaginal demostró la presencia de espermatozoides. Las ratonas fueron entonces divididas en 2 grupos: control (n= 12) y nitrofen (n= 12). En el día 8 de gestación se administró a las madres del grupo nitrofen una dosis de 25 mg del teratógeno en 0,5 mL de aceite de oliva por vía intragástrica. Los animales del grupo control fueron tratados de idéntica forma con el mismo volumen de excipiente. Cada grupo se subdividió en 3 en función de la recuperación de los fetos: días 14 (n= 4), 16 (n= 4) y 19 (n= 4) de gestación (término 19,5) y se procesaron bien completamente o bien sus corazones por separado para las distintas técnicas empleadas.

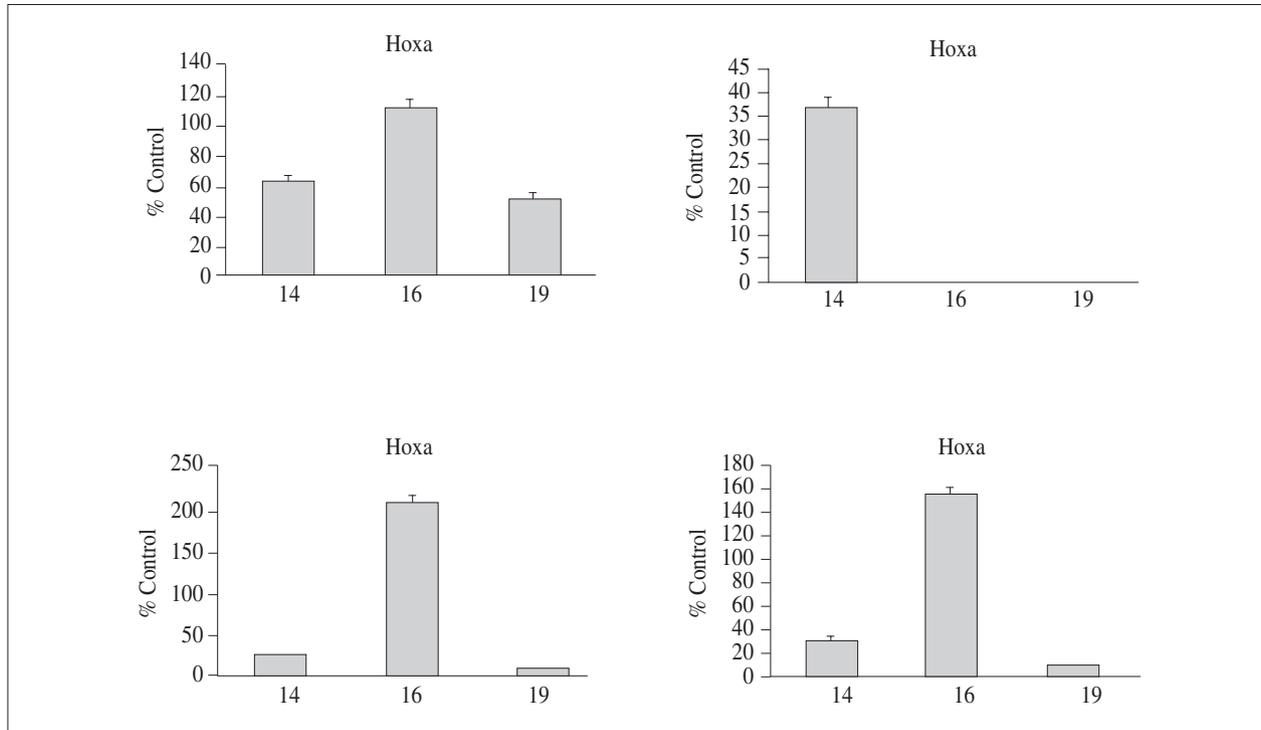


Figura 1. Expresión de los genes Hoxa3, Hoxb3, Hoxa5 y Hoxb5 medida en los pulmones de los embriones de ratonas expuestas a nitrofen y expresada en porcentaje de expresión respecto a la correspondiente en los controles en los 3 puntos de medición considerados, días 14, 16 y 19 del desarrollo.

Modelo experimental de AE

Para la AE seguimos el modelo de ratón desarrollado por Ioannides mediante la administración a la madre gestante de adriamicina⁽³¹⁾. Usamos para ello 32 ratonas CBA que fueron enjauladas durante la noche con machos de fertilidad probada (3x1) y en las que el día 0,5 de la gestación fue considerado la mañana en que se demostró la presencia de tapón vaginal espermático. Las 32 ratonas gestantes fueron expuestas bien a 4 mg/kg de adriamicina por vía intraperitoneal (grupo AE, n=16) o a excipiente por la misma vía (grupo control, n=16), los días 7,5 y 8,5. En función de la recuperación de los embriones, los grupos fueron subdivididos a su vez en 4: días 13 (n=4), 14 (n=4), 15 (n=4) y 16 (n=4) y procesados en bloque o sus pulmones y corazones por separado.

Técnicas de laboratorio

Además de estudios morfológicos al uso (hematoxilina/eosina), se usaron técnicas estándar de laboratorio para el estudio de los genes Hoxa3, Hoxa5, Hoxb3, Hoxb5, Hoxc4 y Hoxd3, ya que tras una revisión juiciosa de la literatura, consideramos que eran los más probablemente involucrados en la etiología de la HDC o la AE. Para la inmunohistoquímica se usaron antibióticos comercialmente disponibles para Hoxa3, Hoxb3 y Hoxd3. Para el estudio de la expresión génica de los 6 genes se aisló el RNA a partir de los tejidos pul-

monar o cardiaco, se pasó a DNA-c mediante retrotranscripción y se evaluó la expresión de los genes mediante PCR a tiempo real cuantificada por lightcycler⁽³²⁾. La secuencia de primers o cebadores para la amplificación se obtuvo mediante estudios de homología, búsqueda bibliográfica, o bien estudio de la secuencia del gen en bancos disponibles y uso de software específico. Se utilizaron estándares externos de concentración conocida para determinar la concentración de la muestra mediante comparación de curvas de fluorescencia. Para normalizar los resultados se usó la proteína ribosomal S18 de ratón.

RESULTADOS

Hernia diafragmática congénita

Por técnicas de inmunohistoquímica no se encontraron diferencias entre los 2 grupos en ninguno de los momentos de gestación estudiados, tanto en el corazón como en los pulmones. En lo que respecta a la RT-PCR, la expresión pulmonar de Hoxa3, Hoxb3, Hoxa5 y Hoxb5 se encontró muy disminuida en el día 14 de la gestación en el grupo Nitrofen, aumentado con respecto a los controles especialmente para Hoxa3, Hoxa5 y Hoxb5 en el día 16 y casi desapareciendo en el día 19 en los 4 genes (Fig. 1). En el corazón, encontramos diferencias en la expresión especialmente de Hoxa5 y

Tabla I Expresión medida por PCR a tiempo real de 4 genes Hox en el pulmón del embrión de ratón expuesto a adriamicina y recogido en 4 momentos diferentes del desarrollo. Los números expresan el porcentaje respecto a la correspondiente expresión medida en los animales del grupo control

	E13	E14	E15	E16
Hoxa3	1,12±1,56*	0,95±1,12*	0,05±0,14*	1,48±1,61*
Hoxb3	0,74±0,88*	0,82±0,50*	0,22±0,25*	6,38±1,61*
Hoxd3	0,00*	0,00*	2,10±1,12*	6,40±1,38*
Hoxc4	2,58±1,91*	0,64±0,87*	2,22±3,45*	2,81±3,13*

* $p < 0,05$ vs controles

Hoxb3, que se encontraba aumentada hasta 10 veces en los fetos expuestos a nitrofen con respecto a los controles en los días 14 y 19.

Atresia de esófago

La inmunohistoquímica reveló importantes diferencias entre los fetos expuestos a adriamicina y los controles en la captación de los anticuerpos para Hoxa3, Hoxb3 y Hoxd3, especialmente en los tejidos mesodérmicos, pulmonar, traqueal y piel. Sin embargo, el corazón parecía teñirse por igual en los 2 grupos en los 4 momentos de gestación considerados. En lo que respecta a los estudios con PCR a tiempo real, la expresión de Hoxa3, Hoxb3, Hoxd3 y Hoxc4 fue nula o casi nula en el tejido pulmonar de los ratones del grupo Adriamicina respecto a los controles (Tabla I). Sin embargo, esta expresión fue similar en el tejido cardíaco de los animales de ambos grupos.

DISCUSIÓN

Tanto la HDC como la AE constituyen complejos poli-malformativos que asocian, junto al defecto anatómico que les da nombre, multitud de anomalías que evidencian un trastorno embrionario precoz en su etiología última. Numerosas investigaciones hasta la fecha han intentado encontrar los mecanismos etiopatogénicos involucrados en dicha etiología⁽³³⁻³⁶⁾. La facilidad de reproducir en condiciones de laboratorio no sólo las malformaciones sino también su cortejo malformativo acompañante, ha permitido identificar numerosas vías moleculares y genéticas responsables de los dos defectos.

Uno de los candidatos a explicar genéticamente el origen de la HDC y la AE es, bajo nuestro punto de vista, el grupo de genes homeóticos. La palabra griega “homeo” significa semejante y estos genes de la *Drosophila melanogaster* fueron así bautizados por su capacidad, cuando eran mutados, para transformar un segmento del cuerpo del insecto en algo

parecido a otro segmento diferente⁽²²⁾. Este complejo homeobox de la mosca del vinagre está conservado hasta la escala superior, y su función tiene mucho que ver con el esquema corporal, la segmentación axial y el desarrollo anteroposterior del embrión. En el ratón y en el humano una parte de ellos se encuentra agrupada en el complejo Hox, compuesto por 39 genes organizados a su vez en 4 grupos parálogos o complejos compuestos por 9 a 11 genes cada uno y localizados en 4 cromosomas distintos: Hoxa, Hoxb, Hoxc y Hoxd, que en el humano se encuentran respectivamente en los cromosomas 7, 17, 12 y 2⁽³⁷⁾.

Curiosamente, la organización de los genes en cada complejo es fundamental para la regulación espaciotemporal precisa y, por tanto, para la correcta formación del embrión. De esta manera, el orden relativo de los genes Hox dentro de un mismo grupo condiciona su momento de activación y su lugar o dominio de expresión concreto a lo largo del eje anteroposterior (rostrocaudal): los genes más próximos al lugar 3' del cromosoma se expresan antes y en dominios más anteriores que los genes localizados más cercanos a 5', propiedad llamada colinearidad espacial⁽³⁷⁾.

¿Cómo puede saberse la función de cada uno de estos genes? Los experimentos más conocidos que tratan de responder a esta pregunta son aquellos en los que se crean animales mutantes sin uno o varios de estos genes, es decir, con “pérdida de función” o knock-out⁽²⁵⁾.

Las características de algunos de estos animales remedan, en gran parte, a anomalías como la AE o la HDC. Así, el mutante para Hoxa3 (en nomenclatura genética Hoxa3^{-/-}) exhibía grandes defectos faríngeos y cardiopatías congénitas que le asemejaban al síndrome de DiGeorge^(29, 38). Los Hoxa1^{-/-} y Hoxa2^{-/-} y los resultantes de combinar mutaciones en Hoxa3, Hoxb3 y Hoxd3, también presentaban características parecidas^(27, 29, 38, 39).

Por otro lado, la ausencia de Hoxc4 origina sorprendentemente una obstrucción esofágica por desaparición progresiva del tubo digestivo en el mesénquima torácico junto con malformaciones vertebrales⁽²⁸⁾, y ratones Hoxa5^{-/-} también presentan malformaciones laringotraqueales varias además de hipoplasia e inmadurez pulmonar⁽⁴⁰⁾. Hoxb5, por último, es necesario para el desarrollo pulmonar⁽⁴¹⁾. Toda esta semejanza, junto a la implicación de algunos factores de transcripción relacionados con estos genes en la etiología de la AE^(19, 42, 43) (tales como Sonic Hedgehog, HNF-3, y TTF-1), apoyan sin duda la participación de los genes Hox en el origen de esta enfermedad.

Una evidencia adicional la proporciona el que los genes Hox, especialmente los más próximos al extremo 3' del cromosoma y numerados del 1 al 5, juegan un papel fundamental en la migración de las células de la cresta neural a lo largo de los arcos faríngeos^(26, 27), además de ser fundamentales para el correcto desarrollo cardíaco⁽⁴⁴⁾. Tanto las malformaciones de los arcos branquiales como las cardiopatías que habitualmente acompañan a la AE y la HDC muestran una nueva relación de estos genes con las dos entidades.

Nuestro trabajo muestra, sin lugar a dudas, una evidencia más de la afectación de la cascada génica del grupo Hox en los modelos experimentales de HDC y AE. La elección de los genes estudiados en cada una de las malformaciones se hizo en base a estudios bibliográficos previos y a la disponibilidad, en cada momento, de anticuerpos comercialmente disponibles. En el caso de la HDC, aunque los hallazgos inmunohistoquímicos no parecieron determinantes, la expresión génica medida por técnicas de PCR a tiempo real demostró una afectación severa en los periodos precoces del desarrollo, tanto pulmonar como cardíaco. En la AE también los pulmones parecieron acusar el insulto causado por la adriamicina, tanto en la expresión proteica (inmunohistoquímica) como en la genética; sin embargo, estos hallazgos no se encontraron en el tejido pulmonar.

En suma, podemos afirmar que las alteraciones en los genes Hox estudiados son evidentes en ambos modelos, con algunas variaciones en términos de genes involucrados y tejidos afectados. Sin duda, las malformaciones en tejidos pulmonares y cardíacos que acompañan a la AE y la HDC podrían ser debidas, entre otras causas, a alteraciones en la expresión de determinados genes Hox. Debido a su específica participación en la morfogénesis pulmonar y del intestino anterior, su estudio nos conduce a una mejor comprensión de la etiología de estas entidades.

BIBLIOGRAFÍA

- Fauza DO, Wilson JM. Congenital diaphragmatic hernia and associated anomalies: their incidence, identification, and impact on prognosis. *J Pediatr Surg* 1994;**29**:1113-7.
- Robert E, Mutchinick O, Mastroiacovo P, Knudsen LB, Daltveit AK, Castilla EE, Lancaster P, Kallen B, Cocchi G. An international collaborative study of the epidemiology of esophageal atresia or stenosis. *Reprod Toxicol* 1993;**7**:405-21.
- Rokitansky A, Kolankaya A, Bichler B, Mayr J, Menardi G. Analysis of 309 cases of esophageal atresia for associated congenital malformations. *Am J Perinatol* 1994;**11**:123-8.
- Rokitansky AM, Kolankaya VA, Seidl S, Mayr J, Bichler B, Schreiner W et al. Recent evaluation of prognostic risk factors in esophageal atresia--a multicenter review of 223 cases. *Eur J Pediatr Surg* 1993;**3**:196-201.
- Skari H, Bjornland K, Haugen G, Egeland T, Emblem R. Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg* 2000;**35**:1187-97.
- Martinez-Frias ML, Prieto L, Urioste M, Bermejo E. Clinical/epidemiological analysis of congenital anomalies associated with diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet* 1996;**62**:71-6.
- Sweed Y, Puri P. Congenital diaphragmatic hernia: influence of associated malformations on survival. *Arch Dis Child* 1993;**69**:68-70.
- Allan LD, Irish MS, Glick PL. The fetal heart in diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 1996;**23**:795-812.
- Migliazza L, Otten C, Xia H, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Cardiovascular malformations in congenital diaphragmatic hernia: human and experimental studies. *J Pediatr Surg* 1999;**34**:1352-8.
- Martinez-Frias ML. Epidemiological analysis of the association of congenital diaphragmatic hernia with upper-limb deficiencies: a primary polytopic developmental field defect. *Am J Med Genet* 1996;**62**:68-70.
- Bajaj P, Tayal A, Logani KB, Bhan S. Congenital diaphragmatic hernia: a retrospective autopsy study. *Indian Pediatr* 1991;**28**:495-500.
- Bittar Z. Major congenital malformations presenting in the first 24 hours of life in 3865 consecutive births in south of Beirut. Incidence and pattern. *J Med Liban* 1998;**46**:256-60.
- Chittmittrapap S, Spitz L, Kiely EM, Brereton RJ. Oesophageal atresia and associated anomalies. *Arch Dis Child* 1989;**64**:364-8.
- Rittler M, Paz JE, Castilla EE. VACTERL association, epidemiologic definition and delineation. *Am J Med Genet* 1996;**63**:529-36.
- Rittler M, Paz JE, Castilla EE. VATERL: an epidemiologic analysis of risk factors. *Am J Med Genet* 1997;**73**:162-9.
- Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol* 1984;**169**:133-9.
- Kluth D, Kangah R, Reich P, Tenbrinck R, Tibboel D, Lambrecht W. Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: an animal model. *J Pediatr Surg* 1990;**25**:850-4.
- Diez-Pardo JA, Baoquan Q, Navarro C, Tovar JA. A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: preliminary report. *J Pediatr Surg* 1996;**31**:498-502.
- Beasley SW, Diez Pardo J, Qi BQ, Tovar JA, Xia HM. The contribution of the adriamycin-induced rat model of the VATER association to our understanding of congenital abnormalities and their embryogenesis. *Pediatr Surg Int* 2000;**16**:465-72.
- Losty PD, Connell MG, Freese R, Laval S, Okoye BO, Smith A, Kluth D, Lloyd DA. Cardiovascular malformations in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1999;**34**:1203-7.
- Mortell A, Montedonico S, Puri P. Animal models in pediatric surgery. *Pediatr Surg Int* 2006;**22**:111-28.
- Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res* 1997;**42**:421-9.
- Patel NH, Prince VE. Beyond the Hox complex. *Genome Biol* 2000; 1:REVIEWS1027.
- Duboule D, Morata G. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* 1994;**10**:358-64.
- Mark M, Lufkin T, Dolle P, Dierich A, LeMour M, Chambon P. Roles of Hox genes: what we have learnt from gain of function and loss of function mutations in the mouse. *C R Acad Sci III* 1993; **316**:995-1008.
- Manley NR, Capecchi MR. Hox group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Dev Biol* 1997;**192**:274-88.
- Manley NR, Capecchi MR. Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol* 1998;**195**:1-15.
- Boulet AM, Capecchi MR. Targeted disruption of *hoxc-4* causes esophageal defects and vertebral transformations. *Dev Biol* 1996; **177**:232-49.

29. Condie BG, Capecchi MR. Mice with targeted disruptions in the paralogous genes *hoxa-3* and *hoxd-3* reveal synergistic interactions. *Nature* 1994;**370**:304-7.
30. Chisaka O, Capecchi MR. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* 1991;**350**:473-9.
31. Ioannides AS, Chaudhry B, Henderson DJ, Spitz L, Copp AJ. Dorsoventral patterning in oesophageal atresia with tracheo-oesophageal fistula: Evidence from a new mouse model. *J Pediatr Surg* 2002;**37**:185-91.
32. Gonzalez-Reyes S, Fernandez-Dumont V, Martinez-Calonge W, Martinez L, Hernandez F, Tovar J. Pax3 mRNA is decreased in the hearts of rats with experimental diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 2005;**21**:203-7.
33. Donahoe PK. Genomic approaches to surgical diseases: 21st annual Samuel Jason Mixter lecture. *Arch Surg* 2006;**141**:409-13.
34. Slavotinek AM. The genetics of congenital diaphragmatic hernia. *Semin Perinatol* 2005;**29**:77-85.
35. Orford J, Manglick P, Cass DT, Tam PP. Mechanisms for the development of esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 2001;**36**:985-94.
36. Brunner HG, van Bokhoven H. Genetic players in esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. *Curr Opin Genet Dev* 2005;**15**:341-7.
37. Major D, Cadenas M, Fournier L, Leclerc S, Lefebvre M, Cloutier R. Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 1998;**13**:547-9.
38. Knittel T, Kessel M, Kim MH, Gruss P. A conserved enhancer of the human and murine *Hoxa-7* gene specifies the anterior boundary of expression during embryonal development. *Development* 1995;**121**:1077-88.
39. Manley NR, Capecchi MR. The role of *Hoxa-3* in mouse thymus and thyroid development. *Development* 1995;**121**:1989-2003.
40. Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Berard J, Jeannotte L. Early postnatal lethality in *Hoxa-5* mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol* 1997;**192**:432-45.
41. Volpe MV, Vosatka RJ, Nielsen HC. *Hoxb-5* control of early airway formation during branching morphogenesis in the developing mouse lung. *Biochim Biophys Acta* 2000;**1475**:337-45.
42. Kim J, Kim P, Hui CC. The VACTERL association: lessons from the Sonic hedgehog pathway. *Clin Genet* 2001;**59**:306-15.
43. Kim PC, Mo R, Hui Cc C. Murine models of VACTERL syndrome: Role of sonic hedgehog signaling pathway. *J Pediatr Surg* 2001;**36**:381-4.
44. Patterson KD, Cleaver O, Gerber WV, Grow MW, Newman CS, Krieg PA. Homeobox genes in cardiovascular development. *Curr Top Dev Biol* 1998;**40**:1-44.