



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**BASES GENÉTICAS
DE LA MALOCCLUSIÓN CLASE III ESQUELÉTICA**

Marta Morales Fernández

Universidad de Sevilla 2017

DIRECTORES

D. José Enrique Solano Reina
D. Alejandro Iglesias Linares

Gracias a mis directores de tesis, Dr. Alejandro Iglesias y Dr. Enrique Solano por
por darme la oportunidad de lograr este trabajo.

Gracias a mis padres y a mi marido por todo el apoyo incondicional.

Facultad de Odontología
Dpto. de Estomatología
C/ Avicena s/n
41009 Sevilla

D. José Enrique Solano Reina, Catedrático de Ortodoncia de la Universidad de Sevilla y **D. Alejandro Iglesias Linares**, Profesor del Máster de Ortodoncia y Ortopedia Dentofacial de la Universidad de Sevilla, CERTIFICAN:

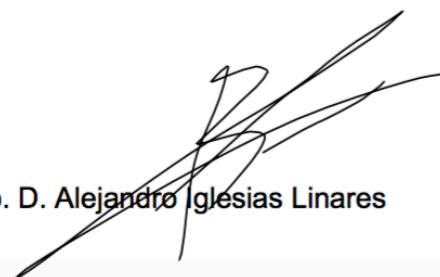
Que la tesis doctoral presentada por Dña. Marta Morales Fernández bajo el título *“Bases genéticas de la maloclusión Clase III esquelética”*, ha sido realizada bajo nuestra dirección como trabajo de investigación conducente a la obtención del título de Doctor en Odontología.

Que la citada tesis doctoral es original y cumple todos los requisitos éticos y formales, se ajusta con exactitud al método científico y es coherente con la trayectoria investigadora de su autora y con su proyecto de investigación.

Para que conste, a efectos académicos, firmo el presente certificado en Sevilla el 30 de Mayo de 2017.



Fdo. D. José Enrique Solano Reina



Fdo. D. Alejandro Iglesias Linares

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Evolución del concepto y clasificación de la maloclusión de Clase III.

1.2. Epidemiología de la maloclusión de Clase III.

1.3. Etiopatogenia y características morfológicas de la maloclusión de Clase III.

1.3.1. Factores que intervienen en la etiopatogenia y niveles de actuación.

1.3.2. Características morfológicas de la maloclusión de Clase III.

1.4. Diagnóstico

1.4.1. Diagnóstico ortodóncico general

1.4.2. Diagnóstico de la maloclusión de Clase III

1.4.3. Diagnóstico diferencial de la maloclusión de Clase III

1.5. Investigación genética y su relación con Ortodoncia

1.5.1. Conceptos generales en genética

1.5.2. Metodología de los estudios genéticos

1.5.2.1. Estudios de *linkage analysis*

1.5.2.2. Estudios de asociación genética

1.5.2.3. Estudios *Genome-wide association (GWA)*

1.5.3. Variaciones genéticas y marcadores moleculares en el ADN.

1.5.3.1. Variaciones genéticas puntuales.

1.5.3.2. Análisis de las variaciones genéticas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.5.4. Genética y maloclusión Clase III esquelética

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos generales

3.2. Objetivo específicos

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Revisión bibliográfica sistemática

4.1.1. Fuentes de información y estrategia de la búsqueda

4.1.2. Criterios de selección

4.1.3. Selección de artículos

4.1.4. Recolección y análisis cualitativo de datos bibliográficos

4.2. Diseño del estudio de asociación genética.

4.2.1. Ámbito y población de estudio

4.2.2. Cálculo del tamaño muestral y distribución

4.2.3. Criterios de elegibilidad

4.2.4. Variables radiográficas cuantitativas

4.3. Procesado, extracción de ADN y genotipado poblacional

4.3.1. Recolección de la muestra y extracción de ADN

4.3.2. Procedimiento de obtención del ADN

4.3.3. Genotipado y estudio de polimorfismos (SNPs)

4.4. Análisis estadístico

4.4.1. Cálculo del error intra-observador, concordancia y precisión del método

4.4.2. Análisis univariante y de contraste de hipótesis

5. RESULTADOS

5.1. Resultados de la revisión bibliográfica sistemática.

5.2. Resultados del estudio de asociación genética.

5.2.1. Tamaño muestral y distribución

5.2.2. Variables radiográficas cuantitativas

5.2.3. Genotipado y estudio de polimorfismos (SNPs)

6. DISCUSIÓN

7. CONCLUSIONES

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. ANEXOS

9.1. Informe del Comité de Ética de la Investigación (CEI).

9.2. Abreviaturas

9.3. Publicaciones

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Evolución del concepto y clasificación de la maloclusión de Clase III

La preocupación por el apiñamiento e irregularidades dentales se remonta a la época a.C, donde ya se realizaban aparatos ortodóncicos primitivos.

En 1838, surge la primera escuela dental del mundo en Baltimore, creada por Harris. Pronto surge la especialidad de la Ortodoncia, del griego orto (recto) y odóntos (diente), con el propósito del alineamiento dentario.

A partir de 1850, aparecieron los primeros documentos relacionados con ortodoncia, siendo el más importante *Oral Deformities de Norman Kingsley*¹. Kingsley fue pionero en el empleo de fuerzas extraorales para el tratamiento ortodóncico.

El objetivo primitivo de la Ortodoncia era simplemente estético, es decir, se centraba en la alineación dentaria sin tener en cuenta la oclusión.

A lo largo de la historia, la maloclusión de Clase III recibió diferente nomenclatura. La palabra prognatismo deriva del griego pro (hacia delante) y gnathos (mandíbula). Es generalmente muy visible en antecesores de la especie humana, o en otras especies del género *homo*, como los neandertales.

El prognatismo fue distintivo de la dinastía de los Hasburgo, de ahí que se conociese con el nombre de *Hasburg jaw*². Dicho prognatismo se repitió en los sucesivos reyes españoles y sus descendientes; incluso a veces en sus esposas, que eran parientes más o menos lejanas. Varios reyes con este defecto se dejaban crecer la barba para intentar disimularlo ya que se relacionaba este aspecto con un nivel más bajo de inteligencia.

En 1890, Edward H. Angle³ publicó la clasificación de las maloclusiones,

aportando una nueva dimensión a la Ortodoncia. Así, definió el concepto de oclusión como “las relaciones normales de los planos inclinados oclusales de los dientes cuando los maxilares están cerrados”. Para Angle, la llave de la oclusión era el primer molar superior, estableciendo como referencia para una oclusión estable que la cúspide mesiobucal del molar superior debía ocluir con el surco bucal del molar inferior. Así, los tres tipos de maloclusión que describió fueron: Clase I, Clase II y Clase III. La maloclusión de Clase III se caracteriza por una posición hacia mesial del molar inferior con respecto al superior.

Con el fin de completar la primera clasificación de las maloclusiones, Martin Dewey propuso una serie de subdivisiones de la Clase I. En 1912, Lisher introdujo una nueva clasificación con la misma referencia de Angle pero con distinta nomenclatura: neutroclusión, distoclusión y mesioclusión.

Moyers⁴ introdujo el concepto de “Síndrome de Clase III” pues consideraba incompleta la clasificación de Angle. Así consideró el problema como un conjunto de elementos coincidentes que forman un patrón identificable. Añadió aspectos como el análisis de la discrepancia oseodentaria, el estudio de las disfunciones musculares y el perfil facial del paciente.

Ackerman y Proffit⁵ identificaron cinco características fundamentales de la maloclusión que deberían considerarse sistemáticamente en cualquier clasificación, completándose formalmente el esquema de Angle. Incorporaron una valoración del apiñamiento y la asimetría en los arcos dentales y una valoración de la protrusión de los incisivos, reconocieron la relación existente entre protrusión y apiñamiento, incluyeron los planos transversal y vertical además del anteroposterior e incorporaron información sobre las proporciones maxilares esqueléticas en cada uno de los planos del espacio. Así, el diagnóstico de la maloclusión de Clase III se realiza en los tres planos del espacio, transversal, vertical y sagital⁶. La Ortodoncia ha evolucionado desde el simple enderezamiento dental a la evaluación del aspecto facial, donde se pretende establecer una correcta relación entre el componente

dental, esquelético y tejidos blandos.

Por tanto, la maloclusión de Clase III se caracteriza por una posición mesializada de la arcada dentaria inferior con respecto a la superior. Debido a esa relación anómala, los incisivos pueden presentar: mordida cruzada anterior, contacto borde a borde, o, en caso de compensación dentoalveolar, retroinclinación de los inferiores y proinclinación de los superiores. Dentro de las maloclusiones de Clase III se pueden diferenciar entre problemas dentarios, funcionales o pseudoclase III, y problemas esqueléticos o verdaderas^{7,8}.

Actualmente se considera que en la mayoría de los casos las maloclusiones resultan de una discrepancia óseo-dentaria y una disarmonía en el desarrollo de las bases óseas maxilares. Aun así, es un error determinar que existe un origen único del problema maloclusivo, pues se trata de una etiopatogenia multifactorial⁹.

Aunque es difícil determinar la causa exacta de una maloclusión, podemos examinar los factores que pueden actuar. La causa de la maloclusión de Clase III puede centrarse a nivel esquelético, dentoalveolar o mixto¹⁰.

Los factores destacados que intervienen en la etiopatogenia de la maloclusión de Clase III son factores genéticos, congénitos y adquiridos, los cuales actúan a tres niveles, general, proximal y local. La maloclusión de Clase III esquelética tiene claramente un fuerte componente genético. Se ha observado a lo largo de los años que el prognatismo mandibular y quizás, pero en menor medida, la deficiencia maxilar se transmite hereditariamente entre los individuos de una misma familia¹¹. Otros rasgos característicos y heredables de esta maloclusión son las compensaciones dentales. En cuanto a los factores congénitos que intervienen en el desarrollo de la maloclusión de Clase III, existen síndromes congénitos que cursan con esta maloclusión. Entre los más destacados se encuentran la fisura labiopalatina¹², el síndrome de Crouzon, síndrome de Apert y el síndrome de Marfan.

Con respecto a los factores adquiridos que intervienen en el desarrollo de la maloclusión de Clase III, estos actúan a tres niveles: general, proximal y local. A nivel general cabe citar la acromegalia, que se debe a la existencia de un tumor adenohipofisario que secreta excesivas cantidades de hormonas el crecimiento y puede provocar a lo largo del tiempo un mayor crecimiento mandibular generándose una maloclusión de Clase III esquelética. A nivel proximal, la lengua es la principal protagonista. En los casos en los que se produce una posición baja de la lengua, se reduce la anchura de arcada superior, aumenta la anchura de arcada inferior, produce una proinclinación incisivos inferiores y ocasiona trastornos verticales en el crecimiento¹³.

1.2. Epidemiología de la maloclusión de Clase III

La incidencia de maloclusión de Clase III varía en función del origen étnico de la población. A lo largo de la literatura, diversos estudios epidemiológicos han obtenido que la incidencia en la población caucásica oscila en torno al 1-5%¹⁴⁻¹⁸ y en la población latina se ha registrado que un 5% presentaban maloclusión de Clase III¹⁹. En la población asiática, sin embargo, este tipo de maloclusión se presenta con más frecuencia. Según algunos autores se trata de un 14% de la población²⁰⁻²³ o en un rango entre 9-19%^{24,25}. Otros estudios llevados a cabo en población europea obtuvieron una prevalencia entre un 3-8%^{16,17,26}.

1.3. Etiopatogenia y características morfológicas de la maloclusión de Clase III

Actualmente se considera que en la mayoría de los casos las maloclusiones resultan de una discrepancia óseo-dentaria y una disarmonía en el desarrollo de las bases óseas maxilares. Aun así, es un error determinar que existe un origen único del problema maloclusivo, pues se trata de una etiopatogenia multifactorial.

La denominada ecuación de Dockrell es ampliamente reconocida como esquema inicial para la consideración etiopatogénica. Así según esta, unas determinadas causas actúan durante un tiempo sobre un tejido provocando una alteración.

El problema de las maloclusiones se ha visto incrementado a lo largo los últimos años, incluso existen estudios que afirman una menor prevalencia de estas alteraciones en el medio rural²⁷.

1.3.1. Factores que intervienen en la etiopatogenia y niveles de actuación.

Aunque es difícil determinar la causa exacta de una maloclusión, podemos examinar los factores que pueden actuar. La causa de la maloclusión de Clase III puede centrarse a nivel esquelético, dentoalveolar o mixto²⁸.

Los factores destacados que intervienen en la etiopatogenia de la maloclusión de Clase III son factores genéticos, congénitos y adquiridos, los cuales actúan a tres niveles, general, proximal y local.

La maloclusión de Clase III esquelética tiene claramente un fuerte componente genético. Se ha observado a lo largo de los años que el prognatismo mandibular y quizás, pero en menor medida, la deficiencia maxilar se transmite hereditariamente entre los individuos de una misma familia. Otros rasgos característicos y heredables de esta maloclusión son las compensaciones dentales.

A lo largo de la literatura, surgen numerosos estudios para clasificar los diferentes fenotipos de la maloclusión de Clase III esquelética²⁹⁻³⁴ (figura 1).

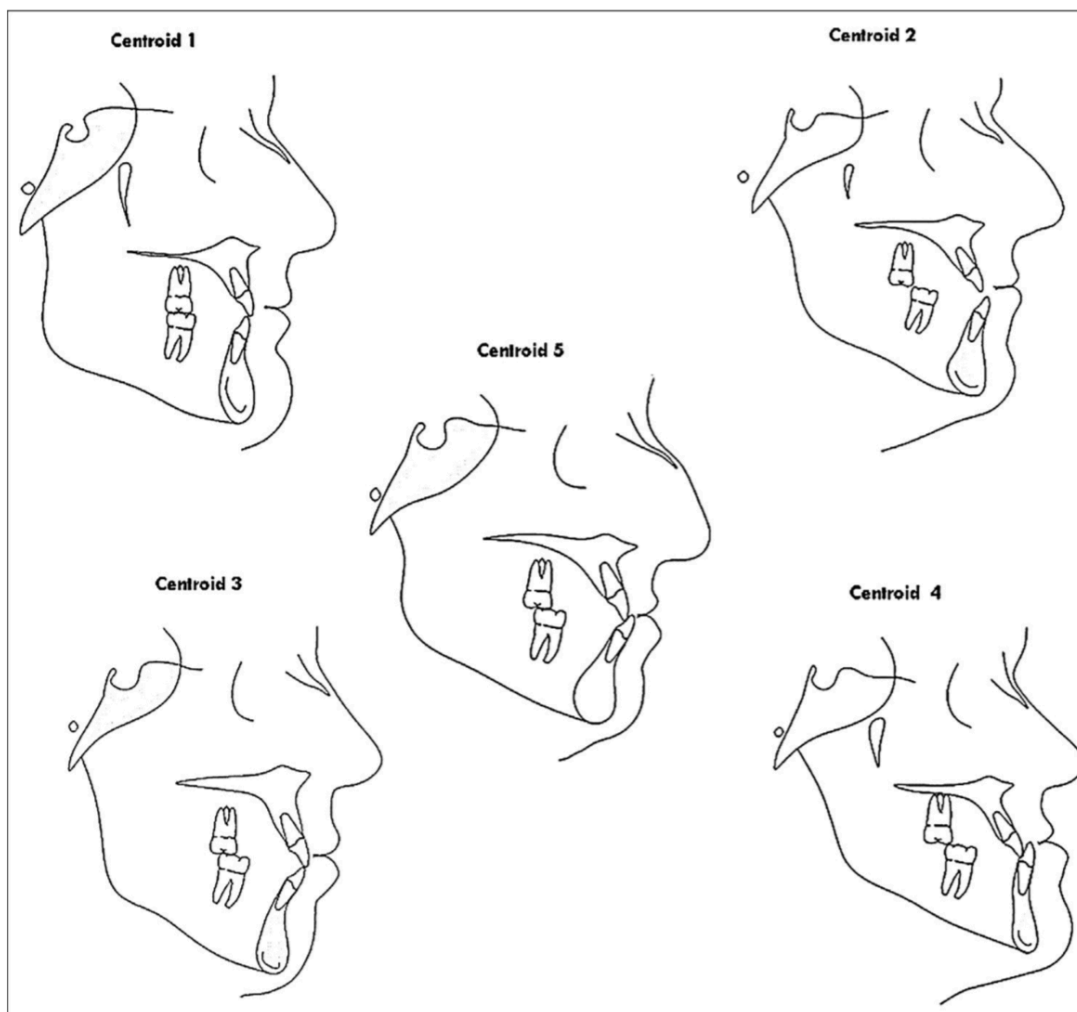


Figura 1: fenotipos de Clase III. Tomado de: Moreno Uribe LM y col., 2013³⁴.

Establecer estos marcadores fenotípicos, es decir, distinguir las características clínicas de la maloclusión de Clase III, aporta la posibilidad de establecer las correlaciones con los modos hereditarios y es necesario para los estudios de los eslabones que clarifique las bases genéticas de esta disarmonía esquelética. Es previsible que, en el futuro, el análisis genético se usará para identificar a los pacientes con problemas ortodóncicos que responderán bien o insuficientemente a diferentes modalidades de tratamiento.

La evidencia de estudios genéticos poblacionales ha demostrado que la maloclusión de Clase III es fuertemente influenciada por factores genéticos y por

múltiples factores ambientales, los cuales se han demostrado que afectan al crecimiento mandibular^{35,36}. Normalmente, la maloclusión de Clase III sigue un modelo hereditario poligénico³⁷, aunque diversos estudios han encontrado un modelo monogénico³⁸. Los avances en la biología molecular han permitido el reconocimiento de varios genes implicados en el crecimiento mandibular^{39,40}.

El análisis del enlace genético “*Genetic linkage analysis*” se realiza para determinar los *loci* cromosómicos que podrían albergar genes asociados con una determinada enfermedad o fenotipo. Así, constituye una nueva herramienta que se podrá utilizar en un futuro para identificar cuáles son los genes que contribuyen en el fenotipo de Clase III.

Aunque la determinación de la base genética de la maloclusión de Clase III esquelética tenga una aplicación clínica directa en el futuro inmediato, la detección del gen o los genes que participan en el desarrollo de esta maloclusión promete grandes mejoras en cuanto al manejo clínico de los pacientes. Dicho conocimiento puede ser empleado para predecir con precisión los cambios de crecimiento a largo plazo y por lo tanto las modalidades de tratamiento. A su vez, los descubrimientos genéticos y moleculares pueden dirigir las intervenciones farmacológicas. En cualquier caso, el desarrollo tanto tecnológico como fisiológico que está sufriendo el campo de la ortodoncia aporta numerosos avances en cuanto al diagnóstico y planificación terapéutica.

En cuanto a los factores congénitos que intervienen en el desarrollo de la maloclusión de Clase III, existen síndromes congénitos que cursan con esta maloclusión. Por definición, un síndrome es un conjunto de características que representan un patrón identificable. El reconocimiento de estos síndromes es muy importante en los estudios clínicos ya que los pacientes que pueden agruparse por patrones identificables son más predictibles que los no clasificables.

Entre los síndromes de anomalías del desarrollo que cursan con una maloclusión de Clase III destacan la fisura labiopalatina, el síndrome de Crouzon, síndrome de Apert, síndrome de Marfan.

La fisura labiopalatina es una deformidad congénita craneofacial causada por un fallo en la fusión entre los procesos nasales medios y el proceso maxilar o entre procesos palatinos, donde influyen tanto factores genéticos como medioambientales⁴¹. En estos pacientes, ocurren con frecuencia anomalías dentales tales como hipodoncia, malformaciones y alteraciones del patrón de erupción^{42,43}. Los pacientes fisura labiopalatina se caracterizan frecuentemente por una retrusión maxilar siendo menos afectada la mandíbula. Actualmente, la participación ortopédica/ortodóncica en este tipo de deformidad adquiere una gran importancia, siendo necesaria la relación entre el cirujano y ortodoncista para conseguir los mayores beneficios posibles en el paciente⁴⁴.

El Síndrome de Crouzon y el Síndrome de Apert. constituyen una malformación craneofacial, desarrollada en etapas más posteriores que la fisura labiopalatina, agrupado dentro de los síndromes de craneosinostosis. Se produce por un cierre precoz de las suturas que existen entre los huesos craneales y faciales. El Síndrome de Crouzon se caracteriza por un desarrollo insuficiente de la región mesofacial y ojos que parecen salirse de las órbitas. Se produce por una fusión prenatal de las suturas superior y posterior del maxilar a lo largo de la pared orbital. Ambos síndromes cursan con un déficit de desarrollo anteroinferior del maxilar y por tanto una alteración del desarrollo del tercio medio facial.

El Síndrome de Marfan es una alteración genética hereditaria que afecta al tejido conectivo, por lo que aparecen alteraciones en varias partes del organismo. Entre algunas características fenotípicas del síndrome se pueden mencionar estatura alta y delgada, el aumento de la extensión del brazo en comparación con la altura, aracnodactilia, paladar ojival y maloclusión esquelética de Clase III⁴⁵.

Con respecto a los factores adquiridos que intervienen en el desarrollo de la maloclusión de Clase III, estos actúan a tres niveles: general, proximal y local. A nivel general cabe citar la acromegalia, que se debe a la existencia de un tumor adenohipofisario que secreta excesivas cantidades de hormona del crecimiento y puede provocar a lo largo del tiempo un mayor crecimiento mandibular generándose una maloclusión de Clase III esquelética. En el síndrome de Down, la macroglosia característica ocasionan el desarrollo de una maloclusión de Clase III.

A nivel proximal, la lengua es la principal protagonista. En los casos en los que se produce una posición baja de la lengua, se reduce la anchura de arcada superior, aumenta la anchura de arcada inferior, produce una proinclinación incisivos inferiores y ocasiona trastornos verticales en el crecimiento. Para estos casos, también pueden usarse retenedores acrílicos similares a una placa de Hawley, pero con más acrílico lingual para elevar la posición de la lengua⁴⁶. Esta posición baja de la lengua puede verse influenciada por una hipertrofia amigdalar así como por trastornos de las vías aéreas. A nivel local, tanto la agenesia, como contactos prematuros y desviaciones del patrón eruptivo, pueden ser la causa de una mordida cruzada anterior.

1.3.2. Características morfológicas de la maloclusión de Clase III

Las Clases III presentan una gran variedad de tipología facial donde la morfología general de la cara se puede ver afectada tanto por la posición de los dientes como por la de las estructuras esqueléticas, siendo un conjunto de estas alteraciones lo que caracteriza a las maloclusiones de Clase III.

Las manifestaciones esqueléticas pueden ser de origen maxilar, mandibular o mixto y esto nos lo aporta el análisis cefalométrico⁴⁷. Si la maloclusión es de origen maxilar, se puede producir por una posición retrasada del maxilar (retrognatismo) o déficit del crecimiento (hipoplasia) y si es mandibular la causa puede ser una

posición adelantada de la mandíbula (prognatismo) o exceso de crecimiento (hiperplasia)^{48,49} (figura 2).

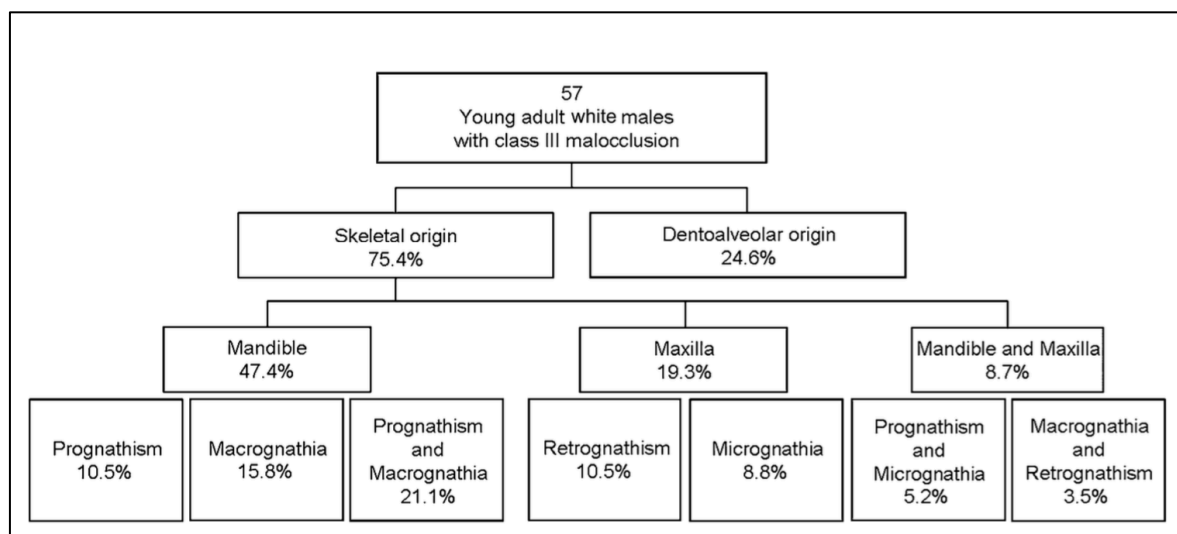


Figura 2. Origen esquelético y dentoalveolar de la maloclusión Clase III esquelética en una muestra al azar de hombres jóvenes caucásicos. Tomado de Staudt CB y col., 2009⁴⁸

Anteriormente, la observación clínica del problema sagital de Clase III ; ha llevado a la afirmación de que la causa principal fue el desarrollo mandibular excesivo. Por ello, en la literatura germana, se usa el término progenie para referirse a este tipo de maloclusiones, pues etimológicamente significa un desarrollo excesivo del mentón. Estudios más recientes han concluido que el componente más frecuente de este tipo de maloclusión es el maxilar⁴⁹.

Varios estudios⁵⁰⁻⁵² mostraron una mayor frecuencia de retrognatismo maxilar en los pacientes de Clase III, oscilando entre el 57-67% de los sujetos evaluados. Según Kapust A.⁵³, el 42-63% presentan una retrusión maxilar con o sin prognatismo a nivel mandibular. Entre los individuos de procedencia japonesa, la retrusión maxilar se encuentra con mayor frecuencia que una mandíbula grande para la configuración de una maloclusión Clase III esquelética⁵⁴.

Si el problema de Clase III se debe a una deficiencia maxilar, ésta puede ser tanto vertical como anteroposterior. Si el déficit es anteroposterior (retrusión o

hipoplasia) el efecto es directo, pero si es vertical se produce una anterorrotación mandibular que da lugar a una posición avanzada de la mandíbula (prognatismo).

Entre las características fundamentales de la maloclusión de Clase III esqueléticas de origen maxilar se encuentran una base craneal anterior corta, una posición retrasada del maxilar superior, una hipoplasia maxilar y una longitud mandibular ligeramente aumentada⁵⁵.

Otro aspecto importante en el establecimiento de los diferentes patrones craneofaciales, además de las relaciones de las bases maxilares, es la posición de la fosa glenoidea. A pesar de la repercusión reconocida de la fosa glenoidea en la etiología de las maloclusiones y durante la terapia ortodóncica, no existen suficientes estudios que reflejen la importancia de la posición de la articulación temporomandibular para el diagnóstico ortodóncico. Recientemente, Innocenti y col.⁵⁶ han documentado que una de las características anatómicas de paciente de Clase III con protrusión mandibular es la posición anterior de la fosa glenoidea, a diferencia de una posición posterior característica de la maloclusión de Clase II con retrusión mandibular⁵⁷. Como medición más efectiva para evaluar dicha posición, los autores consideraron la distancia existente entre la fosa glenoidea y la sutura frontonasomaxilar.

Por normal general, todos los componentes anteriormente descritos se encuentran presentes en la mayoría de los pacientes de Clase III, independientemente de su origen étnico, aparecen temprano en el desarrollo y tienden a empeorar con la edad.

1.4. Diagnóstico

1.4.1. Diagnóstico ortodóncico general

La realización de un buen diagnóstico es fundamental para determinar un adecuado enfoque terapéutico y un correcto momento de actuación.

El diagnóstico, la planificación del tratamiento, y la ejecución del tratamiento son los pasos involucrados en la atención de las maloclusiones. El diagnóstico es la definición del problema, la planificación del tratamiento se basa en el diagnóstico y es el proceso de planificación de los cambios necesarios para eliminar los problemas y el tratamiento es la ejecución del plan⁵⁸.

En el diagnóstico ortodóncico existen dos aspectos importantes, el estudio clínico y el estudio cefalométrico. El estudio clínico del paciente comprende un análisis extraoral y un análisis intraoral, tanto a nivel estético como funcional. Dentro del análisis estético extraoral, se realiza un estudio tanto de perfil como frontal del paciente en base a los registros fotográficos previamente obtenidos. En el análisis frontal⁵⁹, se evaluarán del mismo modo los tercios faciales y se estudia además la asimetría mandibular, la cual requiere normalmente la valoración de las líneas medias dentarias. En el análisis de perfil se valora la proporcionalidad de los tercios faciales, así como la posición sagital de determinados puntos en los tejidos blandos. El análisis estético de Powell⁶⁰ consiste en la medición de ángulos formados por líneas que se trazan sobre los tejidos blandos de perfil y es realizado con los labios en reposo. El triángulo estético de Powell analiza las principales masas estéticas de la cara: frente, nariz, labios, mentón y cuello utilizando ángulos interrelacionados entre sí. El análisis bucodental comprende un examen clínico y pruebas complementarias. El examen clínico comprende la valoración de los tejidos blandos, periodonto y la dentición. Entre las pruebas complementarias, la ortopantomografía se realiza para evaluar la zona nasomaxilar, articulación temporomandibular y la dentición. El estudio de modelos permite realizar un análisis estático y dinámico de ambas arcadas en los tres planos del espacio: transversal, vertical y sagital. Clásicamente, no se realizaba un correcto análisis clínico funcional, por lo que aparecían recidivas debido a un diagnóstico incompleto. El estudio funcional de la oclusión y las articulaciones

temporomandibulares incluyen un estudio gnatológico, de la fonación, deglución, respiración y hábitos del paciente. De todos aspectos que componen el diagnóstico ortodóncico, uno de los más importantes es la determinación de la posición mandibular. La posición de referencia del sistema masticatorio es la relación céntrica, que ha sido definida entre otras como una aquella situación en la que los cóndilos se encuentran en la posición más posterior, más superior y más medial en la cavidad glenoidea⁶¹. Con el objetivo de lograr una oclusión funcional, salud periodontal, salud articular, así como una estética dentaria óptima, un balance facial equilibrado y una estabilidad de los resultados, la obtención de una oclusión en relación céntrica es importante.

El análisis cefalométrico aportó un conocimiento más profundo de las estructuras involucradas. Sus mediciones y el estudio de sus relaciones entre sí permitieron alcanzar un diagnóstico correcto de cada caso. Así, el estudio cefalométrico probablemente sigue siendo la mejor manera de acercarse a la descripción de las características en la población de Clase III. Recientemente, la incorporación de la tomografía computerizada de haz cónico ha aportado numerosas ventajas, entre ellas una localización más exacta de las estructuras anatómicas implicadas en el estudio cefalométrico⁶². Sin duda, el análisis en tres dimensiones, desempeñará un papel preponderante en el futuro.

1.4.2. Diagnóstico de la maloclusión de Clase III

Los individuos con maloclusión de Clase III pueden tener una combinación de componentes esqueléticos y dentoalveolares. Las características esqueléticas de la maloclusión de Clase III han sido bien documentadas y comparadas tanto con la oclusión normal como con la maloclusión Clase I a lo largo de la literatura^{51,63-65}.

En el análisis extraoral, los rasgos generales la maloclusión de Clase III son el perfil cóncavo, el labio inferior y mentón prominente y el labio superior recto. En

la exploración intrabucal, las características dentofaciales han de ser evaluadas en los tres planos del espacio.

A nivel transversal, un déficit transversal maxilar frecuentemente acompaña al problema sagital, produciendo una mordida cruzada a en los segmentos bucales y falta de espacio en la arcada superior. Esta circunstancia puede originarse por una posición descendida de la lengua ya mencionada anteriormente y a la mesialización de la arcada inferior, la cual resulta transversalmente más ancha.

A nivel vertical, varía según los casos y según el patrón de crecimiento del paciente. La maloclusión de Clase III puede acompañarse de distintos tipos de patrones de crecimiento facial. Los patrones dolicofaciales compensarían el crecimiento y avance mandibular mientras que los patrones braquifaciales agravarían la maloclusión por un mayor crecimiento horizontal mandibular.

A nivel sagital, se pueden detectar compensaciones dentoalveolares tales como incisivos superiores vestibulizados e incisivos inferiores lingualizados.

En cuanto al análisis oclusal, debe realizarse en posición de relación céntrica, lo cual permite el diagnóstico diferencial con la pseudoprogenie.

La maloclusión de Clase III esquelética se puede determinar cefalométricamente mediante diferentes estudios cefalométricos. Los parámetros según el análisis cefalométrico de Steiner que pueden considerar una maloclusión de Clase III serían la disminución del ángulo SNA, aumento del SNB y por tanto disminución del ANB. Según el análisis cefalométrico de Ricketts, una disminución de la convexidad facial, así como un aumento de la profundidad facial, son indicativos de una Clase III esquelética y un prognatismo mandibular respectivamente.

Valorando los parámetros de McNamara, son indicativos de una

maloclusión de Clase III esquelética, una longitud mandibular aumentada, una longitud mandibular disminuida y una posición retrasada del punto A con respecto a la perpendicular del Nasion.

En la cefalometría MSE⁶⁶, un ángulo de la base del cráneo disminuido, una longitud de la base craneal disminuida, un ángulo del plano oclusal funcional disminuido y un valor negativo de la estimación de Wits son indicadores de una Clase III esquelética.

La posibilidad de predecir en una etapa temprana la evolución a largo plazo de una intervención ortopédica en la desarmonía de Clase III esquelética podría desempeñar un papel importante en la mejora de las capacidades de diagnóstico y pronóstico de la ortodoncista contemporáneo. Baccetti y col.⁶⁷ realizaron un estudio para identificar una serie de variables cefalométricas con poder significativo para la clasificación, antes del tratamiento, de los pacientes de Clase III con respecto a la eficacia de un protocolo de tratamiento ortopédico y la estabilidad a largo plazo de los resultados del tratamiento. En concreto pretendían valorar la previsibilidad del tratamiento con expansión rápida del maxilar y máscara facial. Identificaron tres mediciones predictivas para los resultados del tratamiento. La primera fue la longitud de la rama mandibular o altura facial posterior, la segunda fue la angulación de la base del cráneo y la tercera la inclinación del plano mandibular con respecto a la base craneal. Los autores concluyen el tratamiento a largo plazo será más favorable cuando los registros cefalométricos previos al tratamiento muestren una rama de la mandíbula corta, con un ángulo de la base craneal obtuso y un ángulo del plano mandibular abierto. Por el contrario, la excesiva longitud de la rama mandibular (es decir, el aumento de la altura facial posterior), con un ángulo de la base craneal agudo y un ángulo plano mandibular pronunciado debe ser considerado como signos desfavorables en el pronóstico de la maloclusión de Clase III.

Otro estudio más reciente concluye que una discrepancia maxilo-

mandibular severa, un aumento de la dimensión vertical y una mandíbula prognática constituyen factores craneofaciales desfavorables para la estabilidad a largo plazo del tratamiento precoz de la maloclusión esquelética de Clase III mediante máscara facial⁶⁸.

1.4.3. Diagnóstico diferencial de la maloclusión de Clase III

El diagnóstico diferencial entre los distintos tipos de maloclusión de Clase III es enorme importancia a la hora de realizar la planificación terapéutica. Así, es preciso distinguir entre una maloclusión localizada y de buen pronóstico de aquella que afecta a toda la oclusión.

La mordida cruzada simple es de origen dentario, generalmente localizada y con una simple corrección. Requiere una intervención precoz para aliviar el posible traumatismo constante que pueden sufrir los dientes involucrados.

La pseudoclase III es un grado más avanzado, constituye una maloclusión funcional donde toda la mandíbula se encuentra mesializada en el momento de la oclusión habitual. Cefalométricamente, tanto la longitud maxilar como la mandibular se encuentran dentro de la norma. Presenta un pronóstico favorable siempre y cuando se realice su intercepción lo antes posible para evitar una evolución a una maloclusión de Clase III esquelética.

La maloclusión de Clase III esquelética presenta su origen etiológico en las bases óseas pudiendo manifestarse a nivel dentoalveolar desde un contacto borde a borde a nivel anterior hasta una gran alteración sagital con un resalte negativo. Cefalométricamente se traduce en un ángulo ANB negativo, una base craneal corta así como una alteración de la longitud maxilar, mandibular o ambas. El tercio medio deprimido hace referencia al poco desarrollo de los huesos malar y maxilar. El enfoque terapéutico irá orientado al tratamiento temprano con ortopedia dentofacial y en los casos más graves al tratamiento con cirugía maxilofacial.

La maloclusión de pseudoclase III ha sido identificada con una mordida cruzada anterior como resultado de un desplazamiento mandibular. Un contacto prematuro entre los incisivos maxilares y mandibulares producen un desplazamiento anterior de la mandíbula, con el fin de saltar la posición inestable del borde a borde incisal y conseguir una oclusión de los dientes posteriores^{69,70}.

Algunos estudios muestran que la relación borde a borde de los incisivos maxilares y mandibulares son debidas a una retroinclinación del incisivo superior y una proinclinación del incisivo inferior^{71,72}. Sin embargo, otros autores afirman la existencia de alguna tendencia hereditaria para este tipo de maloclusión⁷³.

En el análisis extraoral de perfil, la pseudomaloclusión de Clase III muestra un perfil normal en relación céntrica, haciéndose cóncavo en máxima intercuspidadación.

La importancia del diagnóstico diferencial entre la maloclusión esquelética del Clase III y la pseudoclase III radica en la formulación de un adecuado plan de tratamiento para esos pacientes.

Rabie y col.⁷⁴ en un estudio realizado en población china compararon sujetos con maloclusión de pseudoclase III y sujetos con maloclusión de Clase I. Estos autores encontraron que la mayoría de los sujetos no tenían antecedentes familiares de este tipo de maloclusión. Obtuvieron relación de Clase I molar y canina en oclusión habitual y relación de Clase II o borde a borde en relación céntrica, una posición adelantada de la mandíbula, pero con longitud normal y una retroinclinación de incisivos maxilares.

Sin embargo, Lee en otro estudio⁶⁹ mostró una relación molar de Clase III en máxima intercuspidadación y Clase I en relación céntrica.

Como conclusión, el diagnóstico diferencial entre maloclusión de Clase III esquelética y funcional debe realizarse en relación céntrica.

Recientemente, se han publicado numerosos estudios con el fin de desarrollar diferentes modalidades de tratamiento para la Clase III, tal y como nos encontramos en nuestra revisión sistemática que publicamos en 2013 en la revista de Angle Orthodontics^{75,76}. Sin embargo, los tratamientos son aún limitados y las opciones terapéuticas no del todo satisfactorios. A día de hoy sigue pensando que la clase III constituye un problema complejo en ortodoncia y de origen aún desconocido.

1.5. Investigación genética y su relación con Ortodoncia

En la actualidad, los avances en la investigación genética están permitiendo el análisis de aspectos complejos en la biología humana: el crecimiento, el desarrollo y la respuesta ante estímulos externos, como por ejemplo un tratamiento de ortodoncia. Se están desarrollando diversas líneas de investigación genética en el ámbito de la ortodoncia con el fin de profundizar en el conocimiento de distintas patologías y poder establecer una aplicación clínica a través de medidas preventivas o terapéuticas.

La maloclusión es una manifestación de la interacción de factores genéticos y ambientales durante el desarrollo de la región orofacial³⁹. En el ámbito ortodóncico resulta de gran interés la genética para comprender por qué un paciente presenta una oclusión concreta (figura 3). La consideración de los factores genéticos de un paciente es un elemento esencial para el diagnóstico, que subyace teóricamente bajo todas las anomalías dentofaciales. Es fundamental esta parte del diagnóstico para comprender la etiología de la maloclusión antes de iniciar un plan de tratamiento.

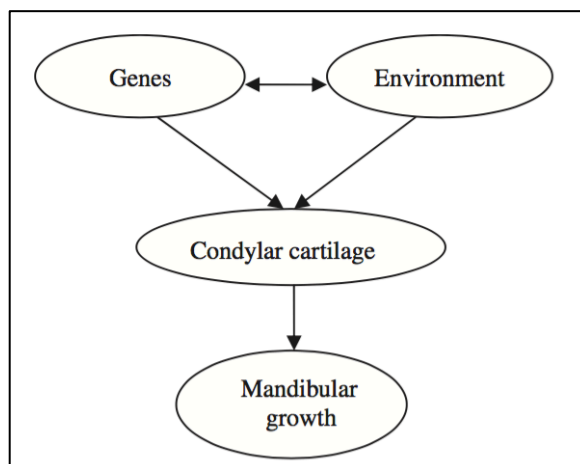


Figura 3. Efectos de la interacción de genes y el medio ambiente en el crecimiento mandibular.

Tomado de Xue F y col., 2010³⁹.

1.5.1. Conceptos generales en genética

Antes de continuar, es necesario definir algunos conceptos básicos sobre genética que serán mencionados a lo largo de la redacción de este proyecto:

Los seres vivos están formados por mínimas unidades llamadas células. Todas las funciones químicas y fisiológicas básicas, por ejemplo, la reparación, el crecimiento, el movimiento, la inmunidad, la comunicación, y la digestión, ocurren al interior de la célula. La teoría celular, establece que todos los seres vivos están constituidos por células y que toda célula proviene de una preexistente. Sin embargo, la estructura de las mismas puede ser muy diferente, existiendo dos modelos de organización celular: células procariontas (son más simples y forman organismos como las bacterias) y células eucariotas. Estas células eucariotas pueden ser de dos tipos: animales o vegetales. La célula animal típica contiene una serie de estructuras u orgánulos que la definen y diferencian y que hacen de ella una estructura eucariota y heterótrofa. Contiene estructuras membranosas y no membranosas, todas ellas flotando y dispersas por el citoplasma celular. Entre las membranosas están los retículos endoplasmáticos rugosos y lisos, el aparato de

Golgi, los lisosomas, mitocondrias y núcleo. Entre las no membranosas están el centrosoma y el citoesqueleto. Todo ello envuelto en una membrana plasmática o celular de estructura constante y unitaria. En las células eucariotas, a diferencia de las procariotas, el material genético se encuentra protegido dentro de una estructura denominada núcleo.

Los cromosomas son estructuras que se encuentran en el interior del núcleo celular. Estas estructuras transportan fragmentos largos de ADN y de proteínas, conteniendo la información genética del organismo. Los cromosomas vienen en pares. Normalmente, cada célula en el cuerpo humano tiene 23 pares de cromosomas (46 cromosomas en total), de los cuales la mitad proviene de la madre y la otra mitad del padre. Dos de los cromosomas, el X y el Y, determinan si usted nace como niño o como niña (sexo) y se denominan cromosomas sexuales. La madre le aporta un cromosoma X al hijo, mientras que el padre puede contribuir ya sea con un cromosoma X o con un cromosoma Y. Es el cromosoma del padre el que determina si el bebé es un niño o una niña. Todos los seres humanos tienen 22 pares de cromosomas homólogos denominados autosomas, que se numeran según el tamaño y otras características.

Los cromosomas homólogos son cromosomas del mismo tamaño, de la misma forma y con la misma disposición de los genes. Los cromosomas homólogos forman pares de cromosomas. En cada ser humano, al menos 22 pares de cromosomas corresponden así a parejas de cromosomas homólogos, denominados autosomas. El par 23, el de los cromosomas sexuales, se compone de cromosomas homólogos en las mujeres (cromosomas X y X) pero de dos cromosomas diferentes en los hombres (cromosomas X e Y)⁷⁷.

Como se ha descrito, los cromosomas son estructuras que transportan ADN y proteínas. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una macromolécula que contiene toda la información genética del individuo. El conjunto de esta información presente en las células se denomina genoma y, según su localización, podemos identificar un

genoma complejo nuclear y un genoma mitocondrial simple. En cuanto a la estructura molecular del ADN, éste está formado por una larga secuencia de nucleótidos. Cada nucleótido contiene un glúcido (desoxirribosa), fosfato y cuatro bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina. En los seres vivos el ADN forma una cadena de dos hebras enlazadas en doble hélice. Las dos hebras están unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno que aparean las bases nitrogenadas: Adenina-Timina, Citosina-Guanina, siendo por tanto dos cadenas complementarias entre sí. En función de la actividad biológica que desempeñe, podemos clasificar el ADN en dos tipos:

ADN codificante: tiene como función la expresión genes y producción de proteínas, las cuales son necesarias para el desarrollo y funcionamiento del organismo. Sólo una pequeña parte del genoma humano consiste en exones, que codifican proteínas.

ADN no codificante: comprende secuencias de ADN inactivas de funciones diversas y, en muchos casos, de función desconocida o sin función aparente. Este tipo de ADN es altamente polimórfico y a su vez podemos dividirlo en: ADN de copia única (secuencias que se encuentran representadas una o muy pocas veces en el genoma y que puede actuar como espaciador entre regiones codificantes de ADN) y ADN de copia múltiple (o ADN repetitivo). El ADN repetitivo se trata de una secuencia de ADN que se repite en el genoma cientos o miles de veces. Estas repeticiones pueden encontrarse en tándem (es decir, seguidas una detrás de otra) o dispersas. El ADN repetitivo en tándem, a su vez, se divide en varios grupos según el tamaño total que origina la repetición: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite. El ADN de microsatélite está formado por secuencias de 2, 3, 4 nucleótidos que se repiten hasta dar bloques con un tamaño total habitualmente no superior a 150 nucleótidos. Hay repeticiones de este tipo por todo el genoma humano, y muchas de ellas son muy útiles como marcadores genéticos porque el número de repeticiones varía entre individuos, como veremos a continuación. Por el contrario, en el ADN disperso, las unidades de repetición no se agrupan, sino que aparecen dispersas a lo largo del genoma.

La molécula encargada de transferir la información genética del ADN es el ARN. El ARN o ácido ribonucleico es una molécula lineal de hebra sencilla cuyas funciones son intermediar en la expresión génica y actuar de catalizador en la síntesis proteica. El ARN está formado por una secuencia de nucleótidos. Cada nucleótido contiene una de las 4 bases nitrogenadas propias del ARN: adenina, uracilo, citosina y guanina. En los seres vivos el ARN forma una hebra sencilla, pero que se puede plegar y formar cortos apareamientos intramoleculares⁷⁷.

En base a la estructura molecular del ADN, las bases nitrogenadas descritas (adenina, timina, citosina y guanina) se combinan entre ellas siguiendo un código para originar lo que se denomina genes. Un gen define como un fragmento de ADN celular necesario para la síntesis de una molécula de polipéptido funcional (producción de una proteína a través de un ARNm o mensajero intermedio) o de ARN (transferente o ARNt y ribosómico o ARNr). El gen es también la unidad de almacenamiento de información del organismo, que se transmite a la descendencia mediante los cromosomas. Prácticamente la mitad del ADN eucariota corresponde a secuencia nucleotídicas repetidas. Las secuencias que codifican proteínas están interrumpidas por regiones que no codifican. Las secuencias no codificantes se denominan intrones y los codificantes exones.

A su vez, los genes pueden adoptar distintas formas, cada uno con sus propias secuencias, dando lugar al concepto de alelo⁷⁸. Un alelo puede definirse como cada uno del par de genes que ocupan el mismo lugar en los cromosomas homólogos que los contienen. Su expresión determina las diversas variantes de una misma característica. Al manifestarse, determinan ciertas características de acuerdo a sus propiedades. El grupo de la sangre y el color de los ojos, por ejemplo, se expresan a través de los alelos. La interacción entre alelos da lugar a que un rasgo hereditario sea dominante o recesivo. Un alelo es autosómico dominante (figura 4) cuando es suficiente tener solo un alelo para conducir a la expresión de un carácter determinado. Si esta expresión del carácter no se produce sólo con un alelo concreto de los dos de un autosoma, sino que aparece cuando ambos alelos

coinciden, entonces el efecto es autosómico recesivo (figura 4)⁷⁹.

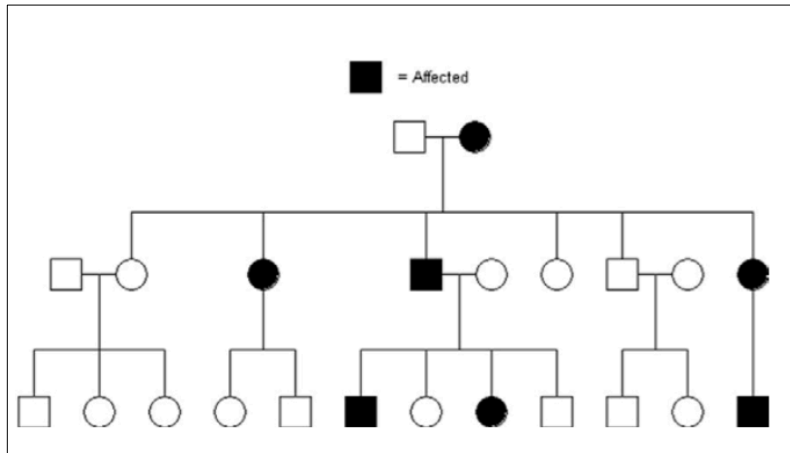


Figura X. Linaje de tres generaciones de una familia con un carácter autosómico dominante, con las generaciones más jóvenes por debajo de las más antiguas. Los símbolos cuadrados representan los varones y los círculos las mujeres. Los miembros afectados se señalan mediante el relleno de su correspondiente símbolo. Tomado de Lidral AC y col. 2008⁷⁹.

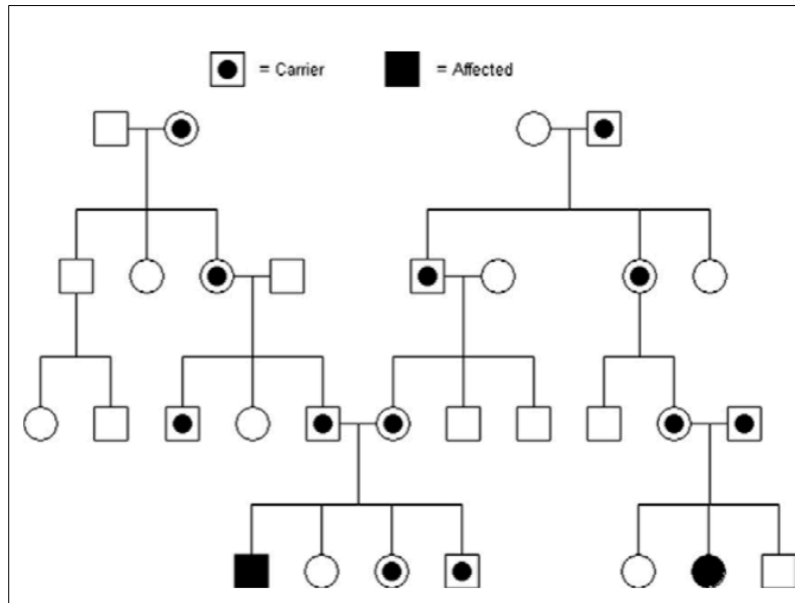


Figura X. Linaje de cuatro generaciones de una familia con un carácter autosómico recesivo, con las generaciones más jóvenes por debajo de las más antiguas. Los símbolos cuadrados representan los varones y los círculos las mujeres. Los miembros afectados se señalan mediante el relleno de su correspondiente símbolo. Tomado de Lidral AC y col. 2008⁷⁹.

Un gen o un marcador genético son localizados en el cromosoma a través de lo que se denomina *Locus/loci* cromosómico. Así, se define *locus* (en singular) o *loci* (en plural) a la zona específica dentro del genoma donde reside un gen específico. Es decir, es la posición exacta donde se ubica de un gen o marcador genético dentro de un cromosoma. Esta posición viene determinada mediante las siguientes coordenadas: número del cromosoma, posición en el cromosoma (brazo corto o pequeño “p” y brazo largo “q”), posición en el brazo (región, banda, subbanda). Por ejemplo: *Locus 7q31.2* se refiere a cromosoma 7, brazo largo, región 3, banda 1, sub-banda 2.

Los conceptos heterocigosidad y homocigosidad van ligado a los alelos. Cuando ambos miembros de un par de alelos son idénticos, el individuo es homocigótico para dicho *locus*. Cuando los dos alelos de un *locus* son distintos, el

sujeto es heterocigótico para ese *locus*.

La molécula de ADN puede sufrir alteraciones a lo largo de su secuencia dando lugar a una modificación de la información contenida y a una alteración en la síntesis de proteína. Se define polimorfismo como una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población. Un polimorfismo simple (en inglés SNPs) consiste en la sustitución de una simple base nitrogenada (por ejemplo, la sustitución de una A (adenina) por una C (citosina)). Los cambios poco frecuentes en la secuencia de bases en el ADN no se llaman polimorfismos, sino más bien mutaciones. Para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo, la variación debe aparecer en al menos el 1% de la población. Cuando un conjunto de variaciones del ADN, o polimorfismos, que tienden a ser heredados juntos, se denomina haplotipo. Así, haplotipo se puede referir a una combinación de alelos o a un conjunto de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs) que se encuentran en el mismo cromosoma.

A continuación, resulta importante diferenciar el concepto de genotipo y fenotipo ya que van a aparecer a lo largo de todos estudios genéticos. El genotipo hace referencia a la carga genética que lleva un individuo. Está determinado por la interacción, combinación y localización de los genes en los cromosomas. Por tanto, cuando se realiza el genotipado de un individuo, se determina el alelo que corresponde a cada variante genética. Por otro lado, el fenotipo se refiere a cualquier característica observable de un individuo. Pueden ser características anatómicas, bioquímicas, fisiológicas y conductuales. El fenotipo está determinado por el genotipo del sujeto y los factores ambientales en los que se desarrolla⁸⁰.

El fenotipo de un individuo presenta una serie de caracteres que van a seguir un modo de herencia determinado, el cual puede ser monogénico, poligénico o multifactorial. Los caracteres monogénicos son aquellos que se desarrollan debido a la influencia de un solo *locus* génico mientras que en los caracteres complejos (poligénicos/ multifactoriales) existe una interacción etiológica entre genes de más

de un *locus* y los factores ambientales (figura 5 y 6).

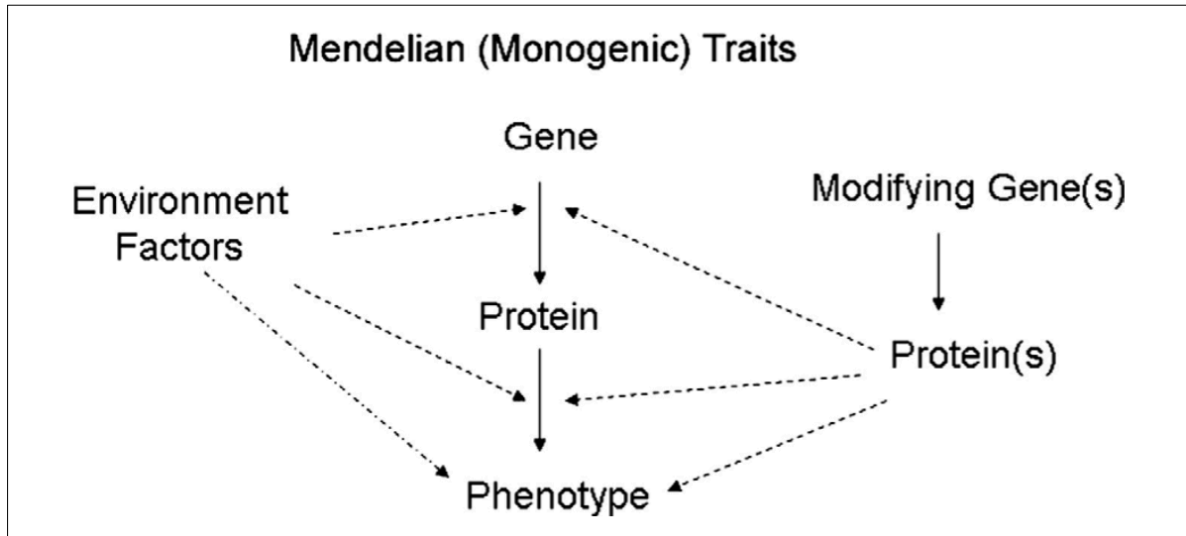


Figura 5: Los rasgos o enfermedades mendelianas (monogénicas) resultan porque un único polimorfismo o mutación génica generalmente da como resultado un fenotipo reconocible. Los factores ambientales y otros genes pueden modificar la expresión clínica de la enfermedad u otro tipo de rasgo, pero no son de importancia crucial para su desarrollo. Tomado de Shaza y col., 2008⁸¹.

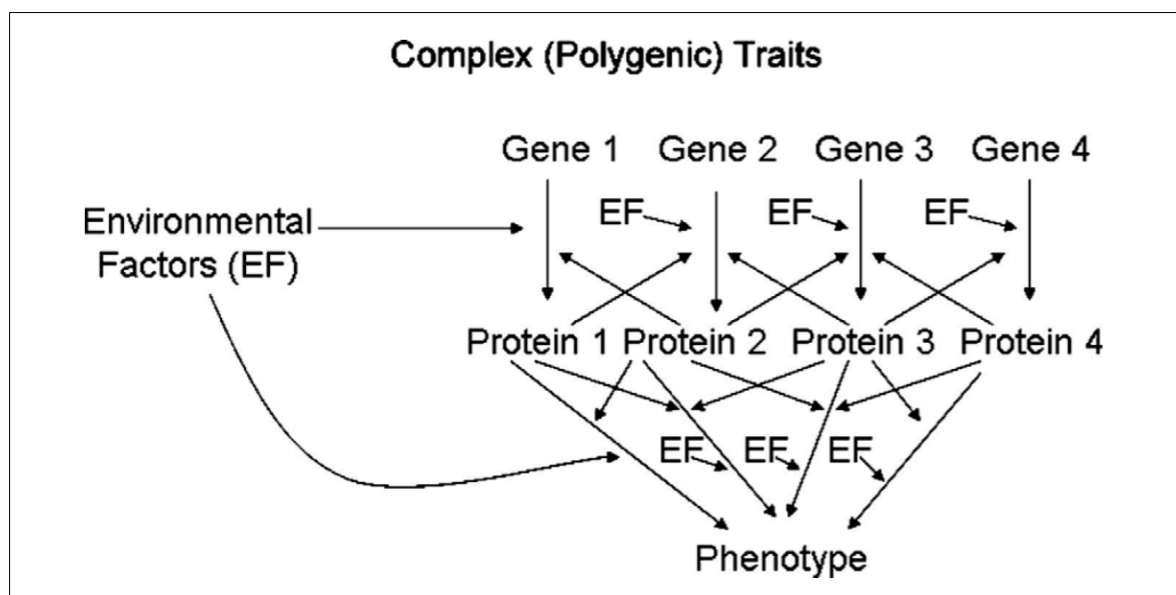


Figura 6: A diferencia de los rasgos mendelianos, factores ambientales y múltiples genes son críticos para el desarrollo de rasgos complejos (poligénicos). Estos tipos de rasgos físicos son continuos en lugar de discretos (aunque las enfermedades de este tipo pueden estar presentes o no). Estos rasgos se denominan rasgos cuantitativos o multifactoriales, ya que son causados por cierto número de genes en combinación con factores ambientales. Tomado de Shaza y col., 2008⁸¹.

Finalmente, resulta también fundamental mencionar los conceptos de penetrancia y expresividad, los cuales combinan ambos aspectos genéticos y ambientales descritos, afectando al fenotipo. La penetrancia es el porcentaje de individuos con un genotipo específico que expresan el fenotipo esperado. Existen dos tipos: penetrancia completa e incompleta. Decimos que existe penetrancia completa cuando el 100% de los individuos presentan el fenotipo esperado según su genotipo y penetrancia incompleta cuando menos del 100% de los individuos presentan el fenotipo esperado según su genotipo. La expresividad puede ser variable y se define como la variación de las manifestaciones clínicas (tipo y severidad) de trastornos genéticos entre individuos afectados, incluso dentro de la misma familia. La penetrancia incompleta y la expresividad variable son el resultado de la influencia de otros genes y de factores ambientales sobre el fenotipo.

1.5.2. Metodología de los estudios genéticos

1.5.2.1. Estudios de *linkage analysis*

Los estudios de *linkage analysis* se realizan para determinar los loci cromosómicos que podrían albergar genes asociados con una enfermedad o fenotipo particular. El objetivo es identificar un marcador genético que es heredado por todos los miembros de la familia que son afectados por el trastorno o rasgo, pero no es heredado por ninguno de los miembros de la familia no afectados. En este tipo de estudio se genotipifican cientos o miles de marcadores espaciados en millones de bases, en familias con varios sujetos afectados^{83,84}. Los marcadores que se segregan en los individuos que presentan la enfermedad son utilizados para localizar el gen causante. Esta técnica ha sido exitosa en encontrar alelos relacionados en todo el genoma, particularmente en los desórdenes monogénicos o de transmisión mendeliana⁸¹. Sin embargo, los estudios de *linkage analysis* han sido menos exitosos en encontrar genes asociados a enfermedades poligénicas y rasgos complejos. Esto puede ser debido al poder limitado de la técnica para detectar el efecto de alelos comunes con modesta influencia en la enfermedad. Por tanto, estos estudios serán más poderosos en la detección de alelos raros de alto riesgo con mecanismos de transmisión mendeliano. Durante el proceso de los estudios de *linkage analysis*, la segregación de regiones cromosómicas que están marcadas por variantes genéticas son seguidas en las familias afectadas para identificar regiones que se relacionan con el trastorno o rasgo⁸⁵. Sin embargo, este enfoque sólo puede proporcionar una localización aproximada del gen de interés relativo a un marcador genético, necesitándose estudios de asociación adicionales para identificar los genes de susceptibilidad.

1.5.2.2. Estudios de asociación genética

Los estudios de asociación genética buscan relacionar un marcador en particular con una determinada enfermedad (o un rasgo complejo) a través de una población, más que dentro de familias⁸⁶⁻⁹¹. Estos estudios tienen mucho más poder para detectar los efectos de las variantes comunes con respecto a los estudios de *linkage analysis*. Por tanto, el objetivo del estudio de asociación es identificar diferencias en las frecuencias de variantes genéticas entre los casos, étnicamente agrupados, y los controles para encontrar variantes que se asocian fuertemente con una enfermedad o característica determinada⁹². Si una variante es más común en los casos que en los controles, se puede inferir una asociación. Tales estudios requieren tamaños de muestra relativamente grandes y fenotipos que se definan con precisión. El estudio de la asociación puede basarse en genes candidatos o puede ser de todo el genoma y libre de hipótesis⁹³.

La realización de un estudio de asociación genética conlleva la consideración de cuatro componentes. En primer lugar, el componente de "enfermedad o fenotipo estudiado". Existen dos tipos principales de rasgos, dicotómicos o cualitativos (salud vs enfermedad) y continuos o cuantitativos (ej.: niveles sanguíneos de glucosa). Los rasgos de mayor impacto clínico directo suelen ser los de carácter dicotómico, y el análisis genético puede proveer una vía para comprender directamente la asociación entre la variable genética y la susceptibilidad de presentar la enfermedad. El segundo componente hace referencia a la muestra en el cual la enfermedad va a ser medida: Los sujetos pueden ser seleccionados en base a su fenotipo o como miembros de una cohorte, dentro de la cual son seguidos a lo largo de un tiempo para evaluar el desarrollo de la enfermedad, al mismo tiempo que otros fenotipos son también medidos. El tipo de fenotipo a estudiar va a influir en el método por el cual se selecciona la muestra del estudio. El tercer componente lo determinan los marcadores genéticos que van a ser genotipados. Una vez que la muestra y la información fenotípica han sido seleccionada, deben elegirse los marcadores genéticos para genotipificar. Pueden ser marcadores individuales, que abarquen

genes, regiones de cromosomas o, en última instancia, el genoma entero. Por último, el cuarto componente sería el método estadístico para buscar asociación entre el genotipo y el fenotipo estudiado. Los *tests* de asociación pueden ser aplicados a individuos relacionados o no relacionados. En el caso de los rasgos dicotómicos en individuos no relacionados, pueden utilizarse pruebas de *chi cuadrado* para diferentes frecuencias de genotipo entre los sujetos afectados y los no afectados. Los métodos de regresión lineal se utilizan comúnmente para analizar la asociación con rasgos cuantitativos en individuos no relacionados. Por el contrario, las pruebas para individuos relacionados comparan la distribución observada de genotipos en los familiares con respecto a la frecuencia esperada dada la relación parentesco bajo la presuposición de no asociación.

1.5.2.3. Estudios de *Genome-wide association* (GWA)

La técnica de asociación genómica amplia (*Genome-wide association*) está siendo utilizada para la realización de un *screening* del genoma completo con el fin de establecer posibles sitios de asociación⁹⁴. Este tipo de análisis utiliza herramientas estadísticas que son similares a los utilizados en los estudios de asociación basada en genes candidatos. Sin embargo, en lugar de confiar en los genes candidatos que se seleccionan sobre la base del conocimiento previo del trastorno o fenotipo, *GWAS* implica una exploración no sesgada de todo el genoma y, por tanto, es más probable que revelen las conexiones genéticas y fisiológicas. Se sabe que el genoma humano contiene millones de SNPs, que pueden causar cambios en el fenotipo directamente o pueden marcar las mutaciones cercanas que influyen en la variación entre individuos y la susceptibilidad a fenotipos específicos⁹⁴.

Los análisis de *GWA* utilizan miles de SNPs como marcadores y están revolucionando las posibilidades de identificar la influencia genética en las enfermedades comunes. En la actualidad, técnica se está imponiendo como una de las mejores formas de estudiar las bases genéticas de las enfermedades complejas, en diseños libres de hipótesis, aunque supone un alto coste su

realización. Las fases que incluye este tipo de estudio son: 1) el genotipado individual de miles de SNPs, 2) validación de los polimorfismos que demuestran ser más significativos por genotipificado en nuevas cohortes y 3) realización de un mapeo detallado de los SNPs adyacentes a los SNPs validados (normalmente solo unas regiones determinadas). Esta técnica permite un análisis extenso del genoma humano en busca de regiones de significativa asociación con un fenotipo determinado.

1.5.3. Variaciones genéticas y marcadores moleculares en el ADN.

1.5.3.1. Variaciones genéticas puntuales.

En este conjunto se engloban mayoritariamente los polimorfismos genéticos. El término polimorfismo en genética hace referencia a las variaciones en la secuencia de nucleótidos de ADN producidas un lugar concreto de (*locus*) de dicha macromolécula. Si analizamos esos lugares de las diversas cadenas de ADN en sujetos diferentes, nos vamos a encontrar diferencias entre unas y otras. Si existen más de 2 variantes (dimorfismo), hablamos de polimorfismo. Los polimorfismos pueden ser de dos tipos: polimorfismo de secuencia o polimorfismo de longitud.

Los polimorfismos de secuencia son aquellos donde el orden de los nucleótidos se ve alterado. Normalmente, al tratarse del mismo *locus*, su diferencia no es muy notable, pero no forman exactamente la misma secuencia. Una clase de estos polimorfismos son los SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) que afectan a un sólo nucleótido, es decir, el cambio de una base (A, T, C, G) dentro de la secuencia del ADN. A simple vista una sustitución de una base en la secuencia de ADN parece un cambio insignificante, pero, en ocasiones, la sustitución de un nucleótido por otro; por ejemplo, C por T, modifica en algunos casos la cadena de aminoácidos que se forma en el proceso de traducción, generando una proteína diferente con funciones totalmente distintas. Un ejemplo de polimorfismo de secuencia es el de los alelos del sistema sanguíneo ABO, que fue el primero descubierto en nuestra especie por Landsteneir en 1900. En el sistema sanguíneo

ABO, las secuencias que van a determinar el tipo de alelo A, B o 0 son muy parecidas pero distintas, y se encuentran en el mismo lugar del ADN del individuo que porta esa variante. Así cada uno tenemos una información diferente en la misma región de nuestro ADN que determinará si somos A, B o 0.

Los polimorfismos de longitud son variantes del mismo locus pero que se diferencian por la longitud, es decir el número de nucleótidos dentro del fragmento de ADN. Cada polimorfismo tiene en sus extremos una secuencia que delimita su posición y permite identificarlo. La mayoría de estos polimorfismos de longitud son secuencias repetitivas en tándem, por lo que también se denominan *Short Tandem Repeats (STR)*; es decir, una serie ordenada de nucleótidos más corta que se repite una y otra vez. Las veces que cada secuencia se repite varía, por lo que cuantas más repeticiones se den, más larga será la longitud del locus del ADN total. Se desconoce el significado biológico de esos locus “tartamudos” del ADN, pero en ellos se basa la elaboración de perfiles genéticos por los que se identifica el ADN de cada persona.

Como hemos definido anteriormente, existen varios tipos de polimorfismos genéticos, que difieren entre sí en su estructura, distribución, estabilidad y forma de transmisión. Como consecuencia de estas diferencias, se utilizan como marcadores genéticos de manera complementaria ya que aportan distintos tipos de información sobre el sujeto y su ascendencia que, de manera combinada, resulta mucho más amplia y útil.

Por tanto, se define marcador genético como un gen o posición en el genoma que existe en dos o más alelos distinguibles y cuya herencia puede ser seguida a través de un cruce genético, permitiendo mapear la posición de un gen a determinar. Son muy utilizados actualmente en el mejoramiento genético para la identificación de individuos o poblaciones por alguna característica de interés. Para estudiar las variaciones entre individuos se utilizan los llamados Polimorfismos Genéticos o Marcadores Genético-Moleculares. Son caracteres estables que se transmiten por

herencia mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma especie. Existen varios tipos de marcadores, destacando para este estudio los polimorfismos mononucleótidos (SNPs) o los microsatélites. Los SNPs son variaciones en la secuencia de ADN en la cual uno de los cuatro nucleótidos es reemplazado por otro (ej: A por C). Los SNPs son la forma más frecuente de polimorfismo en el genoma y, por tanto, constituyen la mayoría de los marcadores en un estudio de mapeo del genoma total. Los SNPs genotipados en un estudio de asociación se denominan *tag SNP* o “SNPs etiqueta”. Los microsatélites (SSR: *simple sequence repeat* o STR: *short tandem repeat*), descritos inicialmente por Weber y May⁹⁵ (1989), son fragmentos de ADN compuestos por dos o hasta seis pares de bases que se repiten un número variable de veces. Esta variación en el número de repeticiones, y no la secuencia repetida, da lugar a diferentes alelos. Su gran utilidad se puso rápidamente de manifiesto debido a su abundancia⁹⁶, distribución bastante regular por el genoma, naturaleza polimórfica⁹⁷ y su pequeño tamaño, que los hace idóneos para ser amplificados por PCR y puedan ser utilizados por tanto como marcadores moleculares.

1.5.3.2. Análisis de las variaciones genéticas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Recientemente, los avances tecnológicos y en biología molecular han permitido que los estudios genéticos se realicen mediante el análisis directo del ADN en lugar de analizar las proteínas codificadas.

El primer paso en el análisis de ADN, ARN y proteínas es su extracción y purificación a partir de las muestras biológicas. Existen varios protocolos y sistemas en el mercado que combinan la acción de agentes químicos, enzimáticos, solventes orgánicos (p. ej., alcohol o acetona) y medio físicos los cuales están al alcance de la mayoría de los laboratorios y tienen las ventajas de su gran sensibilidad y relativa sencillez. Una vez extraído el ADN, se puede proceder a la detección de los ácidos

nucleicos propiamente dicho.

En un principio, la manera de estudiar dichos marcadores se hizo por medio de la técnica llamada hibridación con sondas. La reacción de hibridación consiste en el apareamiento de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos que sean complementarias entre sí para formar un híbrido. En ella, se conoce la composición de una de las moléculas de ácido nucleico y se asocia o se marca con un sistema que posteriormente ponga de manifiesto su presencia (enzimas, antígenos, moléculas fluorescentes, etc). Este segmento de ADN con secuencia complementaria y marcado se denomina sonda. Existen varias técnicas de hibridación con sondas (p. ej., *Dot blot*, *Southern blot*, *Northern blot*) pero debido a su complejidad y la gran cantidad de muestra que se requiere, su uso está limitado⁹⁸.

Actualmente, debido a las limitaciones en el uso de las sondas, se recurre a otros métodos químicos o enzimáticos con el objetivo de aumentar específicamente la cantidad de una secuencia de ácido nucleico para poder detectarlo posteriormente. El método más extendido para ello es la amplificación (o aumento de la cantidad de una secuencia de ácido nucleico) del ADN *in vitro* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica, por la que su creador Cary Mullis obtuvo el Premio Nobel⁹⁹, se basa en la capacidad que presenta el ADN para desnaturalizarse y renaturalizarse, permitiendo la generación de múltiples copias de fragmentos de ADN a partir de una cadena única.

Existen seis componentes para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa. En primer lugar, el ADN diana o ADN que vamos a amplificar. En segundo lugar, los dinucleóticos trifosfatos (dNTP), que aportan las bases que componen el ADN. En tercer lugar, los Cebadores o *primers*, iniciadores de la reacción. Son oligonucleóticos, es decir, secuencias de ADN de 15-30 bases de longitud complementarias de los extremos 3' de cada una de las cadenas de ADN diana. En cuarto lugar, una polimerasa termoestable llamada *Taq* polimerasa (*Taq*-por *Thermus aquaticus*), que permite alargar la cadena de ADN hibridada con el

cebador mediante la incorporación de los dNTP. Por tanto, el componente clave de una reacción PCR es la ADN polimerasa aislada de *Thermus aquaticus*, un microorganismo adaptado a vivir y multiplicarse a muy alta temperatura. En quinto lugar, el cloruro de magnesio, el cual influye en la hibridación de los cebadores con el ADN diana y en la actividad de la *Taq* polimerasa. Por último, en sexto lugar, el tampón de hibridación, que asegura la fuerza iónica y el pH óptimo de la reacción enzimática. Todos estos componentes forman la mezcla de reacción, la cual se coloca en un aparato termociclador que permite variar las temperaturas de cada una de las etapas de la PCR.

Como se ha descrito a lo largo de la literatura, la reacción de PCR consta de tres etapas que se repiten cíclicamente, entre 25 y 40 veces dependiendo del protocolo. La primera etapa consiste en la desnaturalización del ADN a 90-95°C con el objetivo de romper los enlaces o puentes de hidrógeno para separar la doble hélice, quedando disponibles para hibridar con los cebadores. La segunda etapa es la hibridación, la cual se produce a una temperatura entre a 35-65°C y consiste en la unión de los cebadores con su secuencia complementaria. Finalmente, la tercera etapa o extensión se produce a 72° y consiste en la elongación del nuevo híbrido mediante la *Taq*-polimerasa, incorporando los dNTP complementarios del molde de ADN diana. Experimentalmente, alrededor de 30 ciclos proporcionan una cantidad de ADN más que suficiente para un análisis directo del segmento amplificado sin necesidad de utilizar sondas.

Una vez finalizada la PCR, es necesario detectar la presencia del producto amplificado y realizar un análisis de secuenciación con el objetivo de secuenciar y analizar el ADN copiado.

1.5.4. Genética y maloclusión Clase III esquelética

En la práctica ortodóncica conocemos como la maloclusión de Clase III esquelética afecta a individuos de una misma familia, se hereda entre padres e

hijos o se presentan en hermanos. Autores como Litton y col.¹⁰⁰ examinaron las familias de 51 sujetos afectados con maloclusión de Clase III según la clasificación de Angle encontrando que, aproximadamente el 13% de los hermanos de estos sujetos afectados, expresaban también este rasgo. Además, se ha descrito una alta prevalencia de maloclusión Clase III en familias de pacientes con maloclusión esquelética de Clase III que han sido tratadas mediante cirugía ortognática³⁷.

Son numerosos los artículos y publicaciones que establecen vínculo entre la clase III y los factores genéticos como etiología de esta maloclusión e incluso se afirma clínicamente que es la maloclusión con mayores componentes hereditarios de todas. Sin embargo, pocos estudios se han dedicado a profundizar en este aspecto intentando encontrar la causa^{101,102}.

Actualmente, los avances en biología molecular han permitido reconocer diversas regiones cromosómicas y genes particularmente involucrados en el proceso, magnitud y dirección del crecimiento mandibular. De esta forma en la literatura, recientemente se han publicado resultados preliminares donde relacionan algunas localizaciones cromosómicas con el prognatismo mandibular y también se empiezan a asociar genes con diversos aspectos específicos de este tipo maloclusivo. Estos estudios se están realizando sobre diferentes tipos de población (japonesa, china e hispánica)^{39,103}.

Sin embargo, la determinación de aquellos genes en relación con la maloclusión de Clase III esquelética se encuentra en etapas iniciales y solo algunas variaciones genéticas han sido sugeridas en estudios recientes con diversas limitaciones en la literatura especializada.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

La inquietud por parte del ortodoncista en la búsqueda de la etiología de la maloclusión es lo que impulsa a despertar gran interés por la genética, ya que el fenotipo dentofacial está en su origen y desarrollo causado en gran medida por factores genéticos modulados parcialmente por factores ambientales en su desarrollo, en cuanto a magnitud, dirección y en definitiva severidad de su manifestación¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

En la etiología de la maloclusión Clase III esquelética intervienen varios factores que interactúan durante el periodo morfogenético mandibular, siendo posible regular algunos de esos factores durante la infancia. Por esta razón, se ha sugerido que un mayor conocimiento de las variables genéticas que contribuyen al fenotipo de Clase III es esencial para desarrollar futuras estrategias terapéuticas.

Definidos los factores etiopatogénicos descritos recientemente, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo a contrastar en el presente trabajo de investigación:

El fenotipo de Clase III se relaciona genéticamente con la existencia de variaciones específicas en loci cromosómicas que regulan o modulan parcial/totalmente el crecimiento a nivel maxilo-mandibular. Estas variaciones genéticas estarían relacionadas con una diferente expresión de determinados genes durante la etapa de crecimiento lo que resultaría en un aumento del riesgo de desarrollar maloclusión Clase III esquelética en comparación con un grupo de control poblacional en Clase I esquelética.

3. OBJETIVOS

En base a la hipótesis de trabajo planteada y para la corroboración de la misma, centramos los siguientes objetivos.

3.1. Objetivos generales:

- Dar sustento bibliográfico y realizar un análisis crítico cualitativo actual en relación a la influencia de los factores genéticos en la etiología de la maloclusión Clase III esquelética.
- Profundizar en el conocimiento de las bases etiológicas de la maloclusión de Clase III esquelética.

3.2. Objetivos específicos:

- Describir la distribución de genotipos y fenotipos maloclusivos de clase III en una población caucásica de origen español.
- Determinar el perfil genético de la población española en sujetos con maloclusión Clase III esquelética en comparación con sujetos con Clase I esquelética.
- Determinar la existencia de asociación de la maloclusión Clase III esquelética con regiones cromosómicas específicas y patrones de secuencia establecidos en población española en comparación con una muestra de Clase I como grupo control.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Revisión bibliográfica sistemática

4.1.1. Fuentes de información y estrategia de la búsqueda

La estructura del protocolo de revisión se desarrolló antes del inicio del estudio y la notificación de hallazgos siguió las pautas PRISMA ([www. Prisma-statement.org](http://www.Prisma-statement.org)). La estrategia de búsqueda completa incluye filtros de búsqueda en humanos e idioma en inglés.

Para la revisión bibliográfica sistemática se realizó una búsqueda estratégica en la base de datos MedLine (a través de PubMed, www.ncbi.nlm.nih.gov) y Scopus, incluyendo publicaciones sin límite anterior de tiempo y actualizada hasta mayo de 2017. Además, las principales revistas de Ortodoncia indexadas en el JCR (*Journal Citation Report*) se revisaron a mano para identificar estudios potenciales no incluidos en los criterios de selección designados para esta búsqueda.

Los términos MESH (Medical Subject Heading) utilizados para dicha búsqueda fueron los siguientes: *“Malocclusion, Angle Class III AND genetics”, “Mandibular prognathism AND genetics”, “Mandibular prognathism AND SNP”, “Mandibular prognathism AND locus”, “Malocclusion AND (class III phenotype AND linkage analysis)”*.

4.1.2. Criterios de selección

Los artículos seleccionados para el presente estudio debieron cumplir los siguientes criterios de selección, estructurados según el formato PICOS:

Población: cualquier estudio experimental, investigaciones en humanos clínicas o *in vitro* que incluyan al menos un grupo experimental con maloclusión Clase III esquelética y uno control, y que contemplen un mínimo de 5 sujetos o muestras por grupo experimental.

Intervención: Genotipado de variaciones genéticas a nivel cromosómico en presencia y ausencia de maloclusión Clase III esquelética

Comparación: existencia de un grupo de referencia o control comparativo en situación de normo o maloclusión de Clase I esquelética.

Objetivo: Cuantificación de la asociación de variaciones específicas con el grado o tipo de divergencia esquelética sagital en un sentido de maloclusión de Clase III esquelética.

Diseño de estudio: Debido a la tipología de trabajos específicos requeridos solamente se tomaron estudios de asociación genética con diseño de casos y controles, así como estudios de *linkage analysis*. Se excluyeron series de casos, informes a propósito de un caso, estudios descriptivos, artículos de revisión, artículos de opinión, cartas y todos aquellos que no se ajustaron al objetivo de esta revisión.

4.1.3. Selección de artículos

La selección de los artículos fue llevada a cabo por un único observador experimentado (M.M.F.) dirimiendo las diferencias con un segundo examinador experimentado (A.I.L). Inicialmente los artículos se seleccionaron en base al título y resumen, siendo revisado posteriormente el artículo completo en caso de que existiera duda acerca de su inclusión o exclusión, recurriendo a un tercer observador experimentado (E.S.R) en caso de desacuerdo.

4.1.4. Recolección y análisis cualitativo de datos bibliográficos

Se siguió un protocolo de recolección de datos pre-establecido elaborando una hoja de datos en la que se recopiló secuencialmente la siguiente información de cada artículo incorporado: autor y año, diseño del estudio, muestra (tamaño, tipo de maloclusión, origen étnico, sexo y edad) metodología empleada para el análisis genético, tipo de muestra recogida y sistema empleado para ello, región cromosómica, *loci* y genes candidatos encontrados en el estudio y tipo de patrón

hereditario de la maloclusión Clase III esquelética.

La calidad metodológica de los artículos seleccionados fue evaluada utilizando el Índice Metodológico de Estudios No Aleatorios (MINORS)¹⁰⁷. Las 12 variables analizadas fueron claramente establecidas: objetivo, inclusión de pacientes consecutivos, recolección prospectiva de datos, objetivo del estudio, valoración no sesgada del punto final del estudio, período de seguimiento adecuado al objetivo del estudio, pérdida de seguimiento inferior al 5%, cálculo prospectivo del tamaño del estudio, grupo control adecuado, grupos contemporáneos, la equivalencia de línea de base de los grupos y un análisis estadístico adecuado. Después de este análisis, cada artículo puntuó 0 cuando no se informó, 1 cuando se informó, pero era inadecuado, y 2 cuando se informó y fue adecuado. Los artículos obtenidos entre 0 y 7 puntos fueron evaluados como de baja calidad y por lo tanto tenían un alto riesgo de sesgo, los estudios con 8 a 15 puntos se consideraron de calidad media y con un riesgo medio de sesgo, y los artículos obtenidos entre 16 y 24 puntos se clasificaron como de alta calidad y con un bajo riesgo de sesgo.

4.2. Diseño del estudio de asociación genética.

4.2.1. Ámbito y población de estudio

Para la puesta en prueba y demostración de la hipótesis planteada, se ha diseñado un protocolo de experimentación humana mediante un estudio clínico *in vivo* observacional de casos y controles. Toda actuación durante el proyecto de investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Investigación (CEI) de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío, el cual fue creado en el año 2011 para dar cumplimiento a lo establecido en la Disposición Adicional del Decreto 439/2010, de 14 de diciembre, por el que se regulan los órganos de Ética Asistencial y de la Investigación Biomédica en Andalucía. Dicho Comité se rige de acuerdo con lo establecido en el artículo 12 de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de

Investigación Biomédica (Anexo 1).

Los pacientes seleccionados para el estudio pertenecen al Máster de Ortodoncia y Ortopedia Dentofacial de la Facultad de Odontología en la Universidad de Sevilla. Todos los sujetos obtuvieron una hoja informativa sobre el proyecto y firmaron un consentimiento informado previamente diseñado para este trabajo, de acuerdo con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos descritos en la Declaración de Helsinki¹⁰⁸. Los registros necesarios de cada paciente para llevar a cabo el estudio comprenden una muestra salival y una telerradiografía lateral de cráneo, la cual fue seleccionada del estudio de ortodoncia inicial que se realizó cada paciente previo a comenzar su tratamiento en Master de Ortodoncia y Ortopedia Dentofacial. Toda la información recogida fue procesada y analizada con el fin de obtener resultados a nivel radiológicos y genéticos.

A continuación, las muestras tomadas fueron clasificadas mediante una codificación numérica y todos los datos clínicos fueron tratados bajo anonimato y absoluto secreto profesional, en cumplimiento con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre Protección de Datos de Carácter Personal. Dichas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Los estudios moleculares son financiados por el Master de Ortodoncia y Ortopedia Dentofacial de la Facultad de Odontología en la Universidad de Sevilla, no suponiendo un coste adicional para el paciente durante su tratamiento. Su carácter retrospectivo aseguró que el coste del tratamiento de ortodoncia de los pacientes del estudio fue el mismo que el resto de pacientes que no han sido incluidos en este proyecto.

4.2.2. Cálculo del tamaño muestral y distribución

El tamaño muestral estimado para desarrollar el proyecto planteado en la hipótesis de trabajo está compuesto por 214 pacientes (107 casos y 107 controles). Para el diseño de este estudio de casos y controles de asociación genética se tomó un valor de potencia estadística del 80% un error alfa del 0,05 y un 95% de intervalos de confianza. Se establecieron siguiendo resultados de estudio piloto previo observados en nuestra población una proporción de 15,4 y 4,1 respectivamente para casos y controles en relación al alelo menos frecuente del gen con menor presencia en la población de estudio.

Inicialmente, la muestra seleccionada comprendía un total de 220 pacientes. En base al tipo maloclusión esquelética, la muestra fue dividida en dos grupos, Grupo1 (G1) y grupo2 (G2), según el siguiente protocolo:

*Grupo 1 (grupo control): 111 pacientes con maloclusión Clase I esquelética. Se estimó el número de hombres y mujeres, así como la edad media.

*Grupo 2: 109 pacientes con maloclusión Clase III esquelética. Se estimó el número de hombres y mujeres, así como la edad media.

4.2.3. Criterios de elegibilidad

Los pacientes seleccionados para este estudio pertenecen al Master de Ortodoncia y Ortopedia Dentofacial de la Facultad de Odontología en la Universidad de Sevilla. Estos sujetos fueron seleccionados en base a unos criterios de inclusión y exclusión establecidos (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Población caucásica	Síndrome congénito
Origen español	Tratamiento ortodóncico previo
Maloclusión Clase III esquelética Wits appraisal: 0 ± 2 ANB: 2 ± 2 Diferencia maxilo mandibular: 17 ± 4	Registros radiográficos incompletos o no aptos para su cuantificación
Grado moderado de componente vertical (ángulo goníaco: $132^\circ \pm 10$)	Fallo en el análisis del ADN
80% crecimiento remanente (estadio 5 de maduración vertebral según Baccetti y col., 2005) ^{109,110} .	
Análisis por sub-grupos (sub-clustering) 1: SNA: $82^\circ \pm 2^\circ$ A-Nperp: 0 ± 2	

4.2.4. Variables radiográficas cuantitativas

Para llevar a cabo un análisis cefalométrico, con el objetivo de determinar la severidad de la maloclusión Clase III esquelética de cada sujeto, se obtuvo la telerradiografía lateral de cráneo digital que se realizó en el estudio inicial de Ortodoncia en el Máster de Ortodoncia y Ortopedia Dentofacial. En el grupo control, la cefalometría verificará la existencia de una maloclusión de Clase I esquelética. Dicho análisis cefalométrico ha sido diseñado en base a la recopilación de una serie de medidas cefalométricas publicadas a lo largo de la literatura³⁴⁻⁴⁰ como se observa en la Tabla 2. Todas las radiografías fueron calibradas previamente para corregir el factor de magnificación y analizadas mediante el programa de diagnóstico *Nemoceph Dental Studio*, el cual presenta una serie de filtros de imágenes que nos permite con mayor precisión la localización de los puntos cefalométricos

establecidos.

Tabla 2. Medidas para el análisis cefalométrico

ANÁLISIS CEFALOMÉTRICO	
BASE CRANEAL	Â Silla Base craneal anterior (SN) Base craneal posterior (S-Ar)
MAXILAR	SNA; longitud maxilar (CoA); A _ _Na-FR; Convexidad (NA-APg); PP^SN
MANDÍBULA	Â facial; Pg to N perp (FH); Â articular (S-Ar-Go); SNB; Go-Pg; Â goníaco (Ar^Go-Me); Plano mandibular (SN^GoGn); FH^ArGn; Altura de rama (Ar-Go); Longitud mandibular (Co-Gn); Altura facial posterior (Co-Go); Altura facial anterior (N-Me)
RELACIÓN INTERMAXILAR	Wits appraisal; ANB; PP^Go-Gn; Diferencia maxilo mandibular; Altura facial anterior (ANS-Me);
DENTAL	IS^S-N; FMIA; Plano oclusal(OP); Overjet; Â interincisal; IMPA; Sobremordida; S-N^PO; IS:N-A; Posición incisivo inferior
TEJIDOS BLANDOS	Distancia labio superior a vertical verdadera (UL- Vv) Distancia labio inferior a vertical verdadera (LL – Vv) Distancia pogonion blando a vertical verdadera (Pg' – Vv) Ángulo nasolabial (NLA)

4.3. Procesado, extracción de ADN y genotipado poblacional

4.3.1. Recolección de la muestra y extracción de ADN

La recogida de muestra y la posterior extracción de ADN total en cada sujeto se realizó a través de una muestra salival. de ADN en cada sujeto se realizó a través de una muestra salival. Para ello se le pidió a cada paciente que depositara 2 ml de saliva en un kit de recolección de ADN humano (*sistema Oragene® DNA OG-510, DNA Genotek, Canadá*). El procedimiento para la recolección de saliva conlleva los siguientes pasos:

1. Llenar de saliva líquida (no espuma) el tubo del *kit Oragene® DNA* (figura 7) hasta que se alcance la línea de llenado que presenta el tubo dibujada.
2. Se sostiene el tubo en posición vertical con una mano y con la otra se cierra con firmeza hasta escuchar un chasquido. El líquido que presenta el embudo, o solución de estabilización, se mezcla con la saliva.
3. El tubo se sostiene en posición vertical y se desenrosca el embudo del tubo. A continuación se cierra herméticamente con un pequeño tapón que presenta el kit y se agita durante 5 segundos.

Es importante que el paciente no ingiera alimentos ni bebidas, no mastique goma de mascar ni fume 30 minutos antes de obtener su muestra salival. Dicha muestra fue purificada y procesada en el laboratorio para la extracción del ADN de cada paciente.

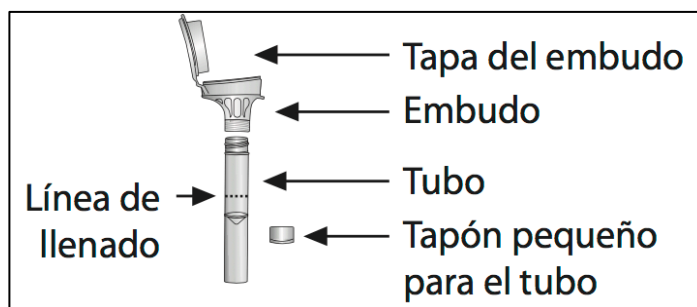


Figura 7. Descripción del tubo para la recogida de muestra de saliva

4.3.2. Procedimiento de obtención del ADN

Una vez tomada la muestra de saliva, los tubos se guardaron a temperatura ambiente, entre 15-30°C (59-86°F).

De cada muestra de saliva se obtuvo 0,5 mL (500 µl) mediante una pipeta de laboratorio y se estableció un protocolo de purificación manual del ADN en el laboratorio descrito para el kit de recolección *Oragene*®.

El material utilizado para el protocolo de purificación de ADN comprende una microcentrifugadora capaz de funcionar a 15.000 × g, microtubos de 1,5 ml (por ejemplo, Axygen # MCT-150-C), incubadora de aire o agua a 50 ° C, etanol (95% a 100%) a temperatura ambiente, etanol (70%) a temperatura ambiente y un proveedor de almacenamiento de ADN: TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o solución similar.

El protocolo de laboratorio empleado para la purificación del ADN fue el siguiente:

1. Mezclar la muestra en el kit de ADN *Genotek* mediante agitación suave durante unos segundos para asegurar que las muestras viscosas estén bien mezcladas.
2. Incubar la muestra a 50 ° C en una incubadora de agua durante un mínimo de 1 hora o en una incubadora de aire durante un mínimo de 2 horas.

3. Transferir 500 μ L de la muestra mezclada a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El resto de la muestra se puede almacenar a temperatura ambiente o congelarse (-15 ° C a -20 ° C).
4. Para 500 μ L de muestra, añadir 20 μ L (1/25 de volumen) de PT-L2P al tubo de microcentrífuga y mezclar con un agitador tipo *vortex* durante unos segundos.
5. Incubación en hielo durante 10 minutos
6. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 min a 15,000 x g
7. Transferir cuidadosamente el líquido flotante (líquido transparente que queda por encima del residuo tras la centrifugación) con una punta de pipeta en un tubo de microcentrífuga fresco. Desechar el gránulo que contiene impurezas.
8. A los 500 μ L de líquido centrifugado añadir 600 μ L de etanol del 95% al 100% y mezclarlo por inmersión 10 veces.
9. Dejar reposar 10 min la mezcla a temperatura ambiente y volver a centrifugar durante 2 minutos a 15,000 x g.
10. Realizar este mismo procedimiento de purificación con con etanol al 70 %.
11. Añadir 100 μ l de solución TE y mezclar con *vortex* 5 segundos. Para completar la rehidratación del ADN, incubar a temperatura ambiente toda la noche y seguidamente agitar con *vortex* a 50 °C durante 1 hora.

Finalmente se realizó un almacenado a -80° para el almacenaje del ADN y su posterior secuenciación.

4.3.3. Genotipado y estudio de las variables genéticas analizadas

En función de la influencia de ciertos genes sobre el proceso de desarrollo y crecimiento craneofacial, se han seleccionado 42 genes dianas con 3 variaciones (n:126 rasgos genéticos) de la base de datos *NIH GeneCard* (figura 8). Dichos genes han sido analizados en cada paciente. Para ello se realizó la desnaturalización del ADN salival de cada individuo y la purificación de ácidos nucleicos de toda la muestra para posteriormente iniciar el genotipado y estudio de polimorfismos (SNPs) seleccionados de los genes diana a través del sistema *Gold Massaray*.

El proceso de identificación de las variaciones en la secuencia se realizó mediante combinaciones de cebadores y sondas destinadas a la detección de las secuencias genéticas especificadas, con el programa ABI Taqman (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EEUU*). Se realizó la amplificación genómica mediante la PCR, ABI 7900HT. Previamente se extrajo el ADN, y se amplificaron las secuencias de los genes diana seleccionados por la reacción en cadena de la polimerasa, usando HotStar Taq polimerasa (*Qiagen®, Hilden, Alemania*) a una concentración final de 2.5mM de MgCl₂. Seguidamente se utilizó la hibridación reversa con sondas específicas para determinar los genotipos de cada paciente para los marcadores prefijados en el estudio, a partir de los amplicones generados, siguiendo las instrucciones del fabricante¹¹¹.

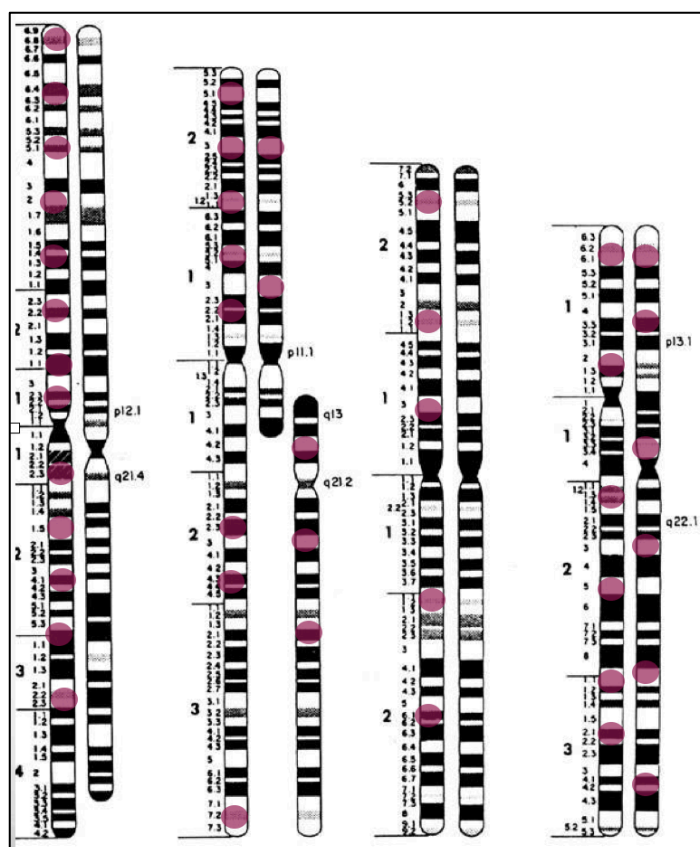


Figura 8. Genes diana seleccionados para el estudio de asociación genética en cada sujeto.

4.4. Análisis estadístico

4.4.1. Cálculo del error intra-observador, concordancia y precisión del método

Para prevenir el error interobservacional, todos los procedimientos descritos anteriormente fueron llevados a cabo por el mismo operador (M.M.F). Adicionalmente, las estimaciones de error sobre las mediciones de la telerradiografía lateral de cráneo fueron evaluadas estadísticamente comparando un doble análisis en 20 pacientes seleccionados aleatoriamente separados por un periodo de tres semanas. El cálculo estadístico fue realizado mediante el test *t* de *Student* para muestras pareadas, donde la ausencia de significación es indicativa de la concordancia entre los valores medio.

El cálculo de la precisión del método de cuantificación se realizó mediante la ecuación: $SE = \sqrt{(\sum d^2/2n)}$, donde *d* es la diferencia entre las mediciones repetidas y *n* el número de mediciones pareadas^{41,42}. Asimismo se determinó el índice de correlación intraclass (ICC) y finalmente, el índice de concordancia tipo *k* fue calculado para determinar la concordancia intra-examinador para la clasificación radiológica de pacientes con maloclusión Clase III esquelética y pacientes con maloclusión Clase I esquelética.

4.4.2. Análisis univariante y de contraste de hipótesis

Todos los datos han sido compilados en formato Excel para su procesado inicial y posteriormente serán importados al programa SPSS para Windows versión 17.0 (Illinois, CH, USA).

Se realizó estadística univariante de carácter descriptivo para determinar las frecuencias, medias, rangos y desviaciones estándar de las variables recogidas. La normalidad de la muestra fue determinada mediante el test Kolmogorov-Smirnov.

La influencia de los alelos o genotipos para los diferentes locus o lugares cromosómicos en presencia o ausencia de maloclusión Clase III esquelética ha sido

analizada mediante un análisis de regresión logística binaria, asimismo se emplearon tablas de contingencia para determinar la distribución del genotipado poblacional realizado. Se utilizaron las odds ratio e intervalo de confianza 95% para estimar el nivel de asociación y la cuantificación del riesgo asociado. Se tomó un valor de $p < .05$ como estadísticamente significativo (SPSS, Illinois, Ch, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Resultados de la revisión bibliográfica sistemática

La búsqueda electrónica identificó 1374 títulos, como refleja el diagrama de flujo (figura 9). Tras la selección a través del título y resumen, 24 estudios completos se revisaron finalmente, de los cuales 12 cumplían los criterios de inclusión. Uno de los artículos incluidos fue publicado durante esta revisión e incluido durante las actualizaciones realizadas¹⁰⁵.

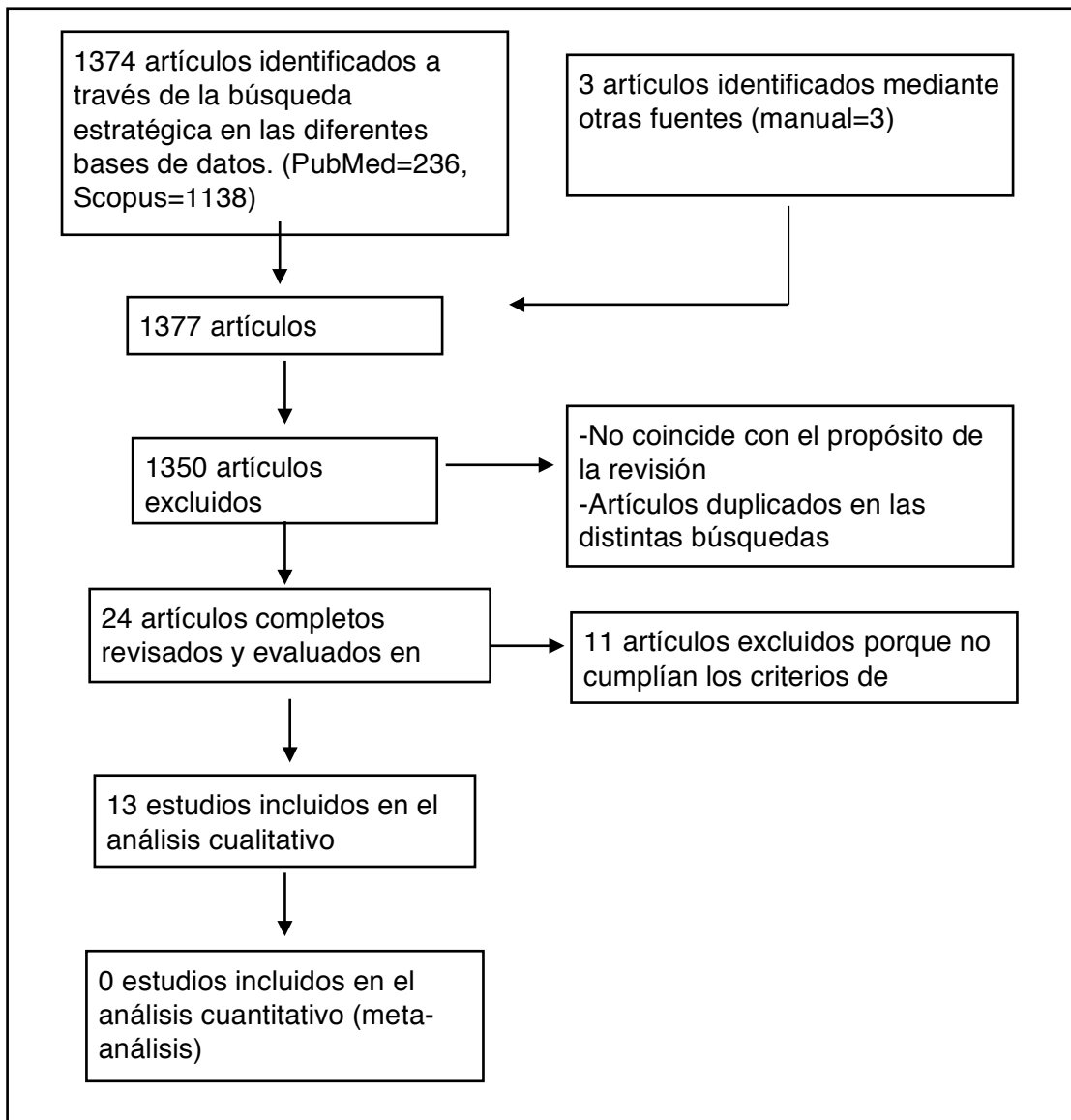


Figura 9: diagrama de flujo PRISMA

Según el sistema de puntuación seguido a través del índice MINORS, de los trece artículos finalmente seleccionados (tabla 3), once de los artículos se determinaron como de calidad alta (A) y dos como de calidad media (M). Por tanto, de los trece estudios incluidos en la revisión sistemática, once presentan un riesgo bajo de sesgo y dos un riesgo moderado (tabla 4).

Tabla 3. Resumen de los artículos incluidos en esta revisión

ESTUDIO	MUESTRA	METODOLOGÍA	MUESTRA	GENES CANDIDATOS	REGIÓN CROMOS	LOCI CANDIDATOS	HERENCIA
Sasaki Y y col. (2009)¹¹²	I: 24 pacientes C III Edad media: 7,3 Sexo: - Origen: Asiático II: 17 pacientes CI Edad media: 7,3 Sexo: - Origen: Asiático	Estudio de asociación	Células epiteliales de la cavidad oral	GHR	-	-	-
Frazier-Bowers S y col. (2009)¹¹³	I: 28 pacientes C III Edad media: 34,77 Sexo: - Origen: Latino II: 29 pacientes CI Edad media: 34,77 Sexo: - Origen: Latino	<i>"Genome-wide linkage"</i>	Sanguínea (<i>PureGene kit, Genra Systems, Minneapolis, MN, USA</i>)	IGF1 HOXC COL2A1	-	1p22.1, 3q26.2, 11q22, 12q13.13, 12q23	A.D (P.I)
Xue F y col. (2010)¹¹⁴	I: 211 pacientes Clase III Edad media: 17,1 Sexo: 103 M y 108 H Origen: Asiático II: 224 pacientes Clase I Edad media: 18,4 Sexo: 109 M y 115 H Origen: Asiático	Estudio de asociación	Sanguínea (<i>Omega Bio-Tek DNA purification kit, Doraville, GA, USA</i>)	EPB41	rs4654388 (Alelo "G")	1p36	-

Tabla 3. Continuación

ESTUDIO	MUESTRA	METODOL OGÍA	MUESTRA	GENES CANDIDATOS	REGIÓN CROMOS	LOCI CANDIDATOS	HERENCIA
Jang JY y col. (2010) ¹¹⁵	I: 164 pacientes Clase III Edad media: 23,69±3,2 Sexo: 78 M y 86 H Origen: Asiático II: 132 pacientes Clase I Edad media: 26,8±2,6 Sexo: 46 M y 86 H Origen: Asiático	Estudio de asociación	Sanguínea (FlexiGene DNA kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA)	Matrilin-1	7987 G>A, 8572 C>T	1p35	—
Li Q y col (2011) ¹¹⁶	I: 11 pacientes Clase III Edad media: 34.77 Sexo:- Origen: Asiático II: 10 pacientes Clase I Edad media: 34.77 Sexo:- Origen: Asiático	"Linkage analysis"	Sanguínea (Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation, Madison, Wisconsin)	TGFB3 LTBP2	rs1468507 rs7141857	14q24.3 31.2	A.D
Tassopoulou-Fishell M y col. (2012) ¹¹⁷	I: 44 pacientes Clase III Edad media: 34.77 Sexo: - Origen: Caucásicos, africanos, latinos y asiáticos. II: 35 pacientes Clase I Edad media: 34.77 Sexo: - Origen: Caucásicos africanos, latinos y asiático.	Estudio de asociación	Salival Oragene DNA Self-Collection kits (DNA Genotek Inc., Ottawa, ON, Canada)	1H - MYO1H	rs10850110 (Alelo "G")	—	—

Tabla 3. Continuación

ESTUDIO	MUESTRA	METODOL OGÍA	MUESTRA	GENES CANDIDATOS	REGIÓN CROMOS	LOCI CANDIDATOS	HERENCIA
Ikuno K y col. (2014)¹⁰⁴	I: 240 pacientes Clase III Edad: 26 Sexo: - Origen: Asiático II: 360 pacientes Clase I Edad: 26 Sexo: - Origen: Asiático	Estudio "genome- wide association"	Sanguínea (QIAamp DNA Blood Maxi Kit, QIAGEN, Hilden, Germany)	PLXNA2 SSX2IP	-	1q32.2 1p22.3	-
Xue F y col. (2014)¹¹⁸	I: 211 pacientes Clase III Edad: 17,3 Sexo: 103 M y 108 H Origen: Asiático II: 224 pacientes Clase I Edad: 18,1 Sexo: 109 M y 115 H Origen: Asiático	Estudio de asociación y "Linkage analysis"	Sanguínea (Omega Bio-Tek DNA purification kit, Doraville, GA, USA)	COL2A1	rs1793953 (Alelo "A")	-	-

Tabla 3. Continuación

ESTUDIO	MUESTRA	METODOL OGÍA	MUESTRA	GENES CANDIDATOS	REGIÓN CROMOS	LOCI CANDIDATOS	HERENCIA
Bayram S y col. (2014)¹¹⁹	I: 99 pacientes Clase III Edad: 21,9±2,2 Sexo: 47 M y 52 H Origen: Caucásicos II: 99 pacientes Clase I Edad: 22,4±2,2 Sexo: 52 M y 47 H Origen: Caucásicos	Estudio de asociación	Sanguínea	GHR	P561T (Alelo "CA")	-	-
Guan X y col. (2015)¹²⁰	I: 230 pacientes C III Edad media: - Sexo: - Origen: Asiático II: 120 pacientes CI Edad media: - Sexo: - Origen: Asiático	Estudio de asociación; <i>linkage analysis</i>	Sanguínea (<i>QIAmp Blood mini kit, Qiagen, Venlo, the Netherlands</i>).	ADAMTS1	-	-	-
Perillo L y col. (2015)¹¹	I: 16 pacientes Clase III Edad media: 29 Sexo: 9 M y 7 H Origen: Caucásicos II: 11 pacientes Clase I Edad media: 27,8 Sexo: 52 M y 47 H Origen: Caucásicos	Estudio de asociación	Sanguínea	ARHGAP21	chr10:24885 785	10p12.1	A.D (P.I)

Tabla 3. Continuación

ESTUDIO	MUESTRA	METODOL OGÍA	MUESTRA	GENES CANDIDATOS	REGIÓN CROMOS	LOCI CANDIDATOS	HERENCIA
da Fontoura CS y col. (2015) ¹²¹	I: 88 pacientes Clase III Edad media: 30,7 Sexo: - Origen: Caucásicos Ila: 53 pacientes Clase I Edad media: 30,7 Sexo: - Origen: Caucásicos Ilb: 128 pacientes Clase II Edad media: 30,7 Sexo: - Origen: Caucásicos	Estudio de asociación y "Linkage analysis"	Salival (<i>Oragene kits, DNA Genotek, Ontario, CA, USA</i>)	COL1A1	rs2249492	-	-
Cruz CV y col. (2017) ¹⁰⁵	I: 54 pacientes Clase III Edad media: 19,65 Sexo: 27 M y 27 H Origen: Caucásicos y latinos II: 120 pacientes Clase I Edad media: 20,46 Sexo: 67 M y 53 M Origen: Caucásicos y latinos	Linkage analysis	Salival	MYO1H GHR FGF10	rs10850110 (A<G, rs2973015 rs593307	12q24.11 5p12 5p13-12	-

Leyenda: M: mujer; H: hombre, A.D: autosómico-dominante; P.I: penetrancia incompleta

TESIS DOCTORAL

Tabla 4. Calidad metodológica de los artículos seleccionados con el Índice Metodológico de Estudios No Aleatorios (MINORS)

Autor y año	Objetivo	Inclusión de pacientes consecutivos	Recolección prospectiva de datos	Objetivo del estudio	Valoración no sesgada	Período de seguimiento adecuado	Pérdida seguim. < 5%	Cálculo prospectivo del tamaño	Grupo control adecuado	Grupos contemporáneos	Equivalencia de línea de base	Adecuado análisis estadístico	Total	R.S	C
Sasaki Y y col. (2009) ¹¹²	2	0	0	2	1	2	2	0	2	2	2	2	17	B	A
Frazier-Bowers S y col. (2009) ¹¹³	2	0	0	2	2	2	2	2	2	0	2	2	18	B	A
Xue F y col. (2010) ¹¹⁴	2	1	0	2	2	2	2	0	2	2	2	2	19	B	A
Jang JY y col. (2010) ¹¹⁵	2	0	1	2	2	2	2	0	2	2	2	2	19	B	A
Li Q y col (2011) ¹¹⁴	2	0	0	2	2	2	2	0	0	2	2	2	16	B	A
Tassopoulou-Fishell M y col. (2012) ¹¹⁷	2	0	0	2	1	2	2	0	0	2	2	0	13	M	M
Ikuno K y col. (2014) ¹⁰⁴	2	0	0	2	2	2	2	0	2	2	2	2	18	B	A
Xue F y col. (2014) ¹¹⁸	2	1	0	2	2	2	2	0	2	2	2	2	19	B	A
Bayram S y col. (2014) ¹¹⁹	2	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	10	M	M
Guan X y col. (2015) ¹²⁰	2	0	0	2	2	2	2	1	2	2	2	2	19	B	A
Perillo L y col. (2015) ¹¹	2	0	0	2	2	2	2	0	2	2	2	2	18	B	A
da Fontoura CS y col. (2015) ¹²¹	2	0	0	2	2	2	2	0	2	2	2	2	18	B	A
Cruz CV y col. (2017) ¹⁰⁵	2	0	2	2	2	2	0	0	2	2	2	2	18	B	A

C: calidad; R.S: riesgo de sesgo; B:bajo; M: medio; A: alto

Debido a la tipología de trabajos específicos requeridos, la muestra de los artículos seleccionados consiste en estudios de asociación genética con diseño de casos y controles, así como estudios de *linkage analysis*. Todos los estudios están realizados en humanos y la mayoría incluyen más de 25 sujetos por grupo (once de trece artículos).

De los trece estudios genéticos que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión, nueve realizaron la recogida de muestra mediante *kits* de recolección de muestra sanguínea del paciente, tres mediante *kits* para muestra salival y uno mediante muestra de células epiteliales de la cavidad oral. Siete de los doce estudios seleccionados se realizaron en población asiática^{104,112,114-116,118,120}, tres en población caucásica^{11,119,121}, uno en población latina¹¹¹ y dos mezclaron diferentes grupos étnicos^{105,117}. A lo largo de los estudios genéticos publicados hasta la fecha, se han asociado diversos genes con un mayor riesgo de susceptibilidad de presentar maloclusión Clase III esquelética. Se han relacionado polimorfismos del receptor de la hormona del crecimiento del gen (GHR) con discrepancias maxilo-mandibulares en el grupo con Clase III frente al grupo control en tres de los trece estudios^{105,112,119}. Otros dos de los trece estudios^{105,117} han encontrado una relación estadísticamente significativa del gen MYO1H y la predisposición de presentar mayor crecimiento mandibular. El gen COL2A1, cuya función es codificar el colágeno tipo II en el cartílago y, por tanto, es importante para el crecimiento craneofacial, también ha sido asociado en dos de los trece estudios incluidos^{113,118}. En cuanto a los *loci* cromosómicos identificados, cuatro de los 13 estudios encuentran relación de la maloclusión con el cromosoma^{104,113-115}, siendo tres de ellos realizados en población asiática y dos autores cuyo estudio incluye población latina coinciden en el cromosoma 12^{105,113}. Finalmente, tres de los trece estudios^{11,113,116} han afirmado un patrón hereditario autosómico dominante, con penetrancia incompleta en dos de ellos^{11,113}, para la maloclusión Clase III esquelética.

5.2. Resultados del estudio de asociación genética

La evaluación de error del método empleado mostró un valor de grado aceptable para las telerradiografías laterales de cráneo, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones originales y repetidas ($p > 0,05$), y el índice de concordancia ($k = 92$) para las mediciones en las radiografías laterales fue muy favorable.

5.2.1. Tamaño muestral y distribución

Una vez aplicados los criterios de inclusión y exclusión y tras el análisis de los registros tanto radiográficos como biológicos de cada paciente, 6 de los 220 pacientes fueron excluidos del proyecto (3 pacientes no eran de origen caucásico, 2 pacientes no presentaban la radiografía inicial y 1 muestra salival fue contaminada). Finalmente, un total de 214 pacientes (82 hombres y 132 mujeres; figura 10) fueron incluidos en base a la siguiente distribución:

*Grupo 1 (grupo control): 107 pacientes con maloclusión Clase I esquelética. Se estimó el número de hombres y mujeres, así como la edad media. (37 hombres y 70 mujeres; edad media $22,71 \pm 10,23$). *Grupo 2: 107 pacientes con maloclusión Clase III esquelética. Se estimó el número de hombres y mujeres, así como la edad media. (45 hombres y 62 mujeres; edad media $25,83 \pm 11,42$).

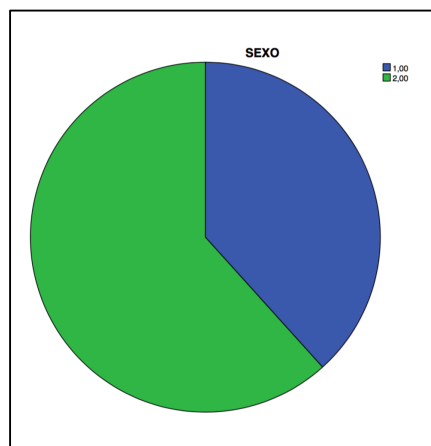


Figura 9. Distribución de sexo en la muestra total seleccionada (n=214), donde 1 es hombre y 2 mujer.

5.2.2. Variables radiográficas cuantitativas

El éxito de los estudios genéticos destinados a identificar genes causantes de rasgos complejos como la maloclusión depende en gran medida de un fenotipo bien caracterizado y analizado. En relación con las variables radiográficas cuantitativas, nuestros resultados muestran una longitud maxilar disminuida, una mayor proyección de pogonion, una longitud mandibular aumentada, un valor de wits appraisal negativo y un valor de plano oclusal disminuido de la muestra de pacientes con maloclusión Clase III esquelética con respecto al grupo control de clase I. Tal y como se describe la población afecta seleccionada presenta unos valores de alteración esquelética en el plano sagital de $-5,54 \pm 3,27$ en relación al parámetro de Wits y un ANB promedio de $0,54^\circ \pm 2,38$ (Tabla 5). Estos valores contrastan con una población control seleccionada como valor de referencia con unos parámetros de alteración esquelética normooclusiva de $0,17 \pm 1,75$ en cuanto al Wits y un ANB de $2,62^\circ \pm 2,84^\circ$ lo cual nos indica un grado de diferencia en los parámetros sagitales que garantizan una sustancial divergencia en las relaciones maxilo-mandibulares, imprescindible para la correcta inferencia de resultados genéticos válidos.

En el aspecto vertical se ha de destacar valor del ángulo goniaco de $123,20^\circ \pm 7,58$ y $128,28^\circ \pm 8,24$ respectivamente para clases I y clases III afectas con lo cual se asumen las no diferencias clínicamente significativas en el grado de crecimiento vertical de los pacientes incluidos y por tanto homogeneidad al respecto. Asimismo en este sentido, el ángulo plano mandibular (GoMe/PoOr) ha resultado en $27,9^\circ \pm 28^\circ$ y de $25,81^\circ \pm 4,92^\circ$ en clases I control y clases III afectas. (Tabla 5)

Tabla 5. Variables radiográficas cuantitativas de los pacientes examinados

Parámetros clínicos	Total de la muestra (n=214)		Grupo control (n=107)		Grupo Clase III (n=107)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
BASE CRANEAL						
Ángulo de la silla	122,67	5,29	123,40	4,95	121,94	5,54
Base craneal posterior	32,80	4,32	32,83	3,69	32,78	4,89
Base craneal anterior	66,22	7,73	65,79	4,12	66,64	10,14
MAXILAR						
SNA	80,62	3,63	80,71	3,75	80,53	3,52
Longitud Maxilar	82,27	8,17	81,80	5,53	82,74	10,16
Convexidad	0,25	3,00	1,92	2,02	-1,41	2,91
Dist A a \perp Na-FR	1,69	3,20	1,86	3,27	1,53	3,13
SN/ENAENP	8,33	3,58	8,27	3,70	8,40	3,46
MANDIBULAR						
Eje Facial	88,27	4,26	87,47	3,88	89,06	4,48
Dist Pg. a \perp Na-FR	2,77	6,58	0,12	5,65	5,67	6,17
Ángulo articular	146,70	7,79	148,15	7,09	145,25	8,21
SNB	79,49	3,92	77,89	3,44	81,10	3,73
Longitud Mandibular (CoGn)	113,77	13,79	110,49	11,25	117,06	15,29
Ángulo goniaco	125,74	8,30	123,20	7,58	128,28	8,24
Ángulo Plano Mandibular (GoMe/PoOr)	26,86	20,08	27,90	28,00	25,81	4,92
Altura de la rama	46,95	6,88	45,37	5,21	48,54	7,94
Ángulo del Plano Mandib. SN/GoNa	34,45	5,68	34,28	5,42	34,62	5,94
Cuerpo mandibular (GoMe)	70,46	7,90	69,04	6,32	71,87	9,02
Altura facial posterior	76,26	9,09	75,15	6,80	77,37	10,83
Altura facial anterior	117,49	12,86	115,22	7,77	119,78	16,20
INTERMAXILARES						
Puntos A y B al plano oclusal	-2,85	3,75	0,17	1,75	-5,54	3,27
ANB	1,15	2,62	2,84	1,52	0,54	2,38
Diferencia Max. - Mand.	31,17	6,25	27,93	3,79	34,42	6,55
ENAENP/GoGn	26,12	5,66	26,00	5,71	26,25	5,64
Altura Facial Anterior Inf.	67,24	8,63	65,93	6,48	68,55	10,21

Tabla 5. Continuación

Parámetros clínicos	Total de la muestra (n=214)		Grupo control (n=107)		Grupo Clase III (n=107)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
DENTAL						
IS^S-N	101,74	6,76	99,98	6,63	103,49	6,45
FMIA	69,52	7,74	65,72	6,08	73,31	7,36
Plano oclusal	84,67	6,04	89,15	3,04	80,18	4,84
Ángulo del incisivo superior	62,10	5,36	63,42	5,57	60,77	4,80
Overjet	1,91	2,47	3,38	1,41	0,44	2,44
Ángulo del incisivo inferior	74,66	6,83	71,13	5,13	78,19	6,51
IMPA	85,88	8,15	90,20	5,89	81,56	7,83
Overbite	1,69	2,03	2,53	1,90	0,84	1,79
Ángulo Interincisivo	136,81	9,40	134,60	9,02	139,02	9,28
S-N^PO	16,26	4,46	16,16	4,09	15,85	4,78
Posición IS	4,54	2,26	4,22	2,32	4,87	2,15
II:N-B	4,46	2,11	4,98	2,03	3,94	2,07
TEJIDOS BLANDOS						
UL - Vv	1,98	1,91	2,03	1,77	1,93	2,05
Ang. Nasolabial	107,24	10,74	108,51	9,89	105,98	11,43
LL - Vv	1,21	3,09	0,20	2,49	2,22	3,31
Pg' - Vv	-2,35	5,37	-4,54	4,41	0,15	5,36

5.2.3. Genotipado y estudio de polimorfismos (SNPs)

Tras el procesado y extracción del ADN se llevó a cabo el genotipado y estudio de polimorfismos (SNPs) seleccionados de los genes diana a través del sistema *Gold Massaray*. El procedimiento de identificación de este análisis, se ha encontrado que los sujetos homocigóticos para el alelo 1 de la región rs10048146 estaba asociado con un mayor riesgo de presentar Clase III esquelética 8,07 veces mayor (OR: 8,07 -95% CI: 4,33–15,06).

En los resultados del estudio de asociación genética se ha determinado que el gen forkhead box L1 (FOXL1) localizado en el cromosoma 16, concretamente en *locus* cromosómico 16q24 de la región rs10048146, presenta un grado de asociación estadísticamente significativo en cuanto al riesgo o predisposición a desarrollar una maloclusión Clase III esquelética en nuestra población española. Este gen específicamente tiene una implicación directa en cuanto a su directa inferencia en el crecimiento maxilo-mandibular esquelético por su papel regulador en células madres mesenquimales de la médula ósea y, por tanto, con un papel decisivo en el desarrollo esquelético facial en cuanto a regulación en los centros de crecimiento óseo mandibular.

No se determinó ningún tipo de asociación estadística en ninguno de los marcadores genéticos pre-seleccionados adicionales de entre las 42 regiones cromosómicas mapeadas, ni en los candidatos de alto riesgo preseleccionados [AArs1038304, AGrS1038304, GGrs1038304, AArs1042903, ACrs1042903, CCrs1042903, AArs104894059, ACrs104894059, CCrs104894059, AArs1127346, ACrs1127346, CCrs1127346, CCrs11864477, TCrs11864477, TTrs11864477, AArs121909190, AGrS121909190, GGrs121909190, CCrs1366594, CGrs1366594, GGrs1366594]. No obstante, señalar que los sujetos heterocigóticos y homocigóticos para el alelo 2 del gen forkhead box L1 presentan un cierto grado de protección o disminución del riesgo a padecer maloclusión de clase III [OR:0,418; 95% CI:0,193-0,909 // OR:0,146; 95% CI:0,70-0,304]

6. DISCUSIÓN

La evidencia de estudios poblacionales ha demostrado que la maloclusión de clase III está fuertemente influenciada por factores genéticos, y se ha demostrado que múltiples factores ambientales afectan el crecimiento mandibular. Como resultado, se supone que la maloclusión de Clase III muestra herencia poligénica. La herencia poligénica o multifactorial se refiere a la herencia de un rasgo fenotípico que puede atribuirse a dos o más genes de susceptibilidad y su interacción con el medio ambiente³⁹. El análisis genético de familias con el fenotipo Clase III apoya esta hipótesis de herencia poligénica. Sin embargo, son algunos estudios publicados los que defienden un modelo monogénico. A diferencia de la herencia poligénica, la herencia monogénica es el resultado de un solo gen mutado y sigue el patrón mendeliano de herencia. Wolff y col² . realizaron un análisis en familias europeas nobles que mostraban prognatismo mandibular y encontraron que este fenotipo estaba determinado por un único gen dominante autosómico. El-Gheriani y col.³⁸ llegaron a una conclusión similar después de analizar las familias de 37 pacientes libios con prognatismo mandibular. Investigaciones recientes sobre 2562 individuos de 55 familias han indicado que un gen importante influye en la expresión del prognatismo mandibular y muestra la herencia mendeliana, pero que los factores ambientales también influyen en la penetrancia del rasgo¹²².

A lo largo de la literatura, esta maloclusión ha demostrado ser causada por diversos patrones de herencia genética y factores ambientales. Se han descrito múltiples modelos de herencia de la enfermedad, incluyendo herencia poligénica, herencia monogénica, herencia autosómica dominante¹²³ y herencia autosómica recesiva¹²⁴, por lo que es evidente que la maloclusión Clase III esquelética es una disarmonía dentofacial compleja a la que se le atribuye una etiología multifactorial¹⁰⁴.

Los avances recientes en genética molecular han permitido examinar los genes de susceptibilidad. Los resultados de estudios de *linkage analysis* y estudios de asociación han sugerido varias regiones cromosómicas que podrían albergar genes de susceptibilidad para la maloclusión Clase III esquelética^{114-116,125,126}. Yamaguchi y

col.¹²⁵ fueron los primeros en la realización de un mapeado los *loci* de susceptibilidad en los cromosomas 1p36, 6q25 y 19p13.2 en una muestra de familias coreanas y japonesas. Posteriormente, otro estudio genómico realizado en cuatro familias hispanas de origen colombiano, reveló cinco posibles *loci* relacionados con esta maloclusión: 1p22.1, 3q26.2, 11q22, 12q13.13 y 12q23¹¹³.

La investigación en una población japonesa mostró que los polimorfismos del receptor de la hormona del crecimiento del gen (GHR) están asociados con la altura mandibular¹²⁷. Zhou y col.¹²⁸ informaron una conclusión similar de la investigación sobre una población china, pero no hay evidencia directa que demuestre una asociación con maloclusión Clase III.

Xue F y col.³⁹ en un estudio de asociación caso-control que, con una muestra de 158 sujetos con prognatismo mandibular, genotiparon 106 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en 1p36 a través de un intervalo crítico de 8,6 Mb y cuatro genes candidatos. Los autores observaron asociaciones genéticas significativas con prognatismo mandibular para rs2249138, rs2254241, rs2788890 y rs2788888, respectivamente ($p = 0,018$; $p = 0,015$; $p = 0,028$; $p = 0,023$); Los cuatro SNPs se localizaron dentro del gen EPB41. Los resultados de este estudio sugiere que el gen EPB41 podría ser un nuevo gen candidato posicional que está implicado en la susceptibilidad al prognatismo mandibular.

Posteriormente, Ikuno y col.¹⁰⁴ realizaron un estudio *GWAS* (*genome-wide association study*) usando microsatélites como marcadores moleculares en una población de sujetos japoneses. La muestra comprendía 250 individuos con prognatismo mandibular y 360 no afectados como grupo control. Todos los pacientes con Clase III eran candidatos a cirugía ortognática del Hospital Universitario de Hokkaido, Japón. Entre los resultados, los autores señalan dos posibles *loci* candidatos (D1S1358i y D1S0411i). En primer lugar, D1S1358i se encuentra en el cromosoma 1q32.2, que constituye un nuevo *locus* de genes candidatos del prognatismo mandibular. Este nuevo *locus* fue un intrón del gen

PLXNA2 (plexin A2), el cual codifica un miembro de la plexina, que a su vez forma parte de una familia de correptores de semaforina. Las semaforinas son una gran familia de proteínas secretadas que median los efectos repulsivos sobre la búsqueda de axones durante el desarrollo del sistema nervioso. La semaforina 3A ejerce un efecto osteoprotector tanto por la supresión de la resorción ósea osteoclástica como por el aumento de la formación ósea osteoblástica. Así, se especuló que el gen PLXNA2 pudiera asociarse con un mayor crecimiento del hueso mandibular. En segundo lugar, D1S0411i (1p22.3) se encuentra en el cromosoma 1p22.3, cerca del *locus* sugerido por un estudio previo (1p22.3: D1S2865), apoyando, por tanto, estos resultados descritos¹¹³.

Recientemente, Cruz CV y col.¹⁰⁵ han publicado un estudio realizado en población caucásica y latina compuesto por una muestra de 54 pacientes de maloclusión Clase III esquelética y un grupo control de 120 pacientes de maloclusión Clase I esquelética. Los autores han analizado 35 polimorfismos en 10 *loci* candidatos con el objetivo de identificar una variación genética común relacionada con la maloclusión Clase III. Entre sus resultados se encuentran que una variación en el gen MYO1H (rs10850110 A/G), en el *locus* 12q24.11 contribuye al prognatismo mandibular y además encuentran relación entre los genes GHR (rs2973015, locus 5p12) y FGF10 (rs593307, locus 5p13-12) con discrepancias horizontales maxilomandibulares en comparación con el grupo control.

Comparando los resultados descritos publicados con nuestro trabajo realizado en población española, nosotros hemos analizado inicialmente 42 genes diana seleccionados de la base de datos NIH GeneCard. Estos genes han sido seleccionados en base a su implicación en el crecimiento craneofacial. Nuestros resultados muestran que el gen FOXL1 localizado en locus cromosómico 16q24 de la región rs10048146, presenta una relación estadísticamente significativa con sujetos de maloclusión Clase III esquelética, siendo la primera vez, a lo largo de la literatura, que se ha descrito asociación del gen FOXL1 con la maloclusión Clase III esquelética.

Con respecto a las manifestaciones esqueléticas de la maloclusión Clase III, sabemos que ésta puede deberse a una posición anterior mandibular (prognatismo), a un mayor crecimiento mandibular (macrognatia), a una posición posterior de maxilar (retrognatismo), un déficit de crecimiento maxilar (micrognatia) o una combinación de discrepancias mandibulares y maxilares. Por tanto, un primer paso necesario para establecer la contribución genética de estos problemas es distinguir los fenotipos, que pueden estar relacionados con diferentes expresiones de la genética del paciente. Estudios anteriores como el de Sanborn RT y col.⁶³ han identificado 4 grupos esqueléticos en adultos con maloclusión clase III esquelética: un primer grupo con protrusión mandibular (45,2%), un segundo grupo con retrusión maxilar (33%), un tercer grupo con combinación de ambos factores (9,5%) y un cuarto grupo con una relación normal (9,5%).

De forma similar, Jacobson y col.¹²⁹ encontraron que un alto porcentaje de adultos con clase III esquelética presentaban una protrusión mandibular con maxilar normal (49%), 26% con retrusión maxilar y mandíbula normal y un 14% con posición normal de maxilar y mandíbula. Ellis y McNamara⁵² encontraron que lo más frecuente era una combinación de retrusión maxilar y protrusión mandibular (30%), seguido de una retrusión maxilar (19,5%) y de una protrusión mandibular únicamente (19,1%).

Recientemente, los estudios que utilizan métodos multivariantes como el análisis de componentes principales y el análisis de conglomerados aplicados a los datos de las radiografías cefalométricas han proporcionado una mayor comprensión de la caracterización de los fenotipos de maloclusión de Clase III más allá de los métodos cefalométricos tradicionales³⁴. El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. El análisis de componentes principales esencialmente descompone las correlaciones de un conjunto de variables en

combinaciones lineales ortogonales de estas variables (denominadas componentes). La información captada por los componentes disminuye con el orden de los componentes. Cada componente tiene coeficientes de puntuación para las variables incluidas que permiten construir un índice lineal que refleja un eje fenotípico de variación en las variables. En otras palabras, el análisis del componente principal explica la variación morfológica general en el complejo craneofacial. Por otra parte, el Análisis de *Cluster* o de Conglomerados complementa el análisis de los componentes principales mediante la identificación de grupos de sujetos de fenotipos similares y permitiendo comparaciones tradicionales de casos y controles. Cada una de estas técnicas se utilizan como método para crear subpoblaciones, subgrupos¹³⁰.

Mackay y col.²⁹ estudiaron la variación morfológica en formas craneofaciales usando análisis *cluster* o análisis de conglomerados en 50 pacientes con crecimiento finalizado de Clase III severos que requirieron corrección quirúrgica e identificaron 5 subgrupos. Estos hallazgos aportaron una buena evidencia de que existen diferentes formas de maloclusión de Clase III y pueden ser divididas con éxito en grupos basados en fenotipos similares. Hong y Yi³² utilizaron el análisis de conglomerados para ilustrar que los diferentes patrones de la arquitectura esquelética (más allá de la clasificación simple actual basada en las posiciones del maxilar y la mandíbula, las unidades dentoalveolares y las relaciones verticales) contribuyen al desarrollo de la deformidad de Clase III. Ellos identificaron 7 grupos en su muestra de 106 sujetos no tratados de Clase III con una edad media de 21 años (rango de 16 a 32 años). Sus resultados mostraron que además de los huesos faciales y la dentición, la base craneal, la bóveda craneal y la columna cervical también estaban implicados en los diferentes patrones arquitectónicos. Abu Alhaija y Richardson¹³⁰ estudiaron 115 niños de Clase III (de 11.6 a 12.7 años) con análisis de conglomerados y análisis de función discriminante para diferenciar a los cultivadores favorables y desfavorables. Encontraron 3 grupos clínicos principales de acuerdo con las alturas faciales intermedias, cortas e intermedias y determinaron que el poder del análisis de la función discriminante para discriminar entre los

cultivadores favorables y desfavorables aumenta del 80% al 100% en algunos casos cuando el análisis de conglomerados es Aplicado antes del análisis de la función discriminante.

Han sido varios las investigaciones que se han desarrollado con el propósito de categorizar las formas faciales de la Clase III, aunque se han llevado a cabo en poblaciones homogéneas con individuos seleccionados²⁹⁻³². Bui C y col. realizaron un estudio³³ para describir la caracterización fenotípica de los pacientes de Clase III en 365 pacientes de diferentes grupos étnicos. Para ello, llevaron a cabo un análisis *cluster* (conjunto de técnicas multivariantes utilizadas para clasificar a un conjunto de individuos en grupos homogéneos) y propusieron una clasificación con los subfenotipos más relevantes. El grupo 1 se caracteriza por una prognacia mandibular marcada y altura facial aumentada. El grupo 4 representa el fenotipo con ligera prognacia mandibular. Por otro lado, el grupo 2 representa una deficiencia maxilar y una disminución en los parámetros verticales, mientras que el grupo 3 también muestra una deficiencia maxilar, pero con un ángulo mayor. El grupo 5 se definió como individuos Clase III al límite (figura X).

Los principales componentes del análisis fueron los sagitales (como el ANB), los verticales (como la altura facial inferior) y ambas dimensiones anteroposteriores y verticales. Dado que en el estudio se incluyen sujetos de diferentes razas y no solo aquellos con un problema esquelético severo, los autores consideran extrapolable los resultados a la población americana.

Posteriormente, Staudt CB y col.⁴⁸ en 2009 realizaron un estudio cefalométrico con el objetivo de clasificar la etiopatogenia de la maloclusión Clase III esquelética en una población caucásica del ejército suizo. En la muestra seleccionada calcularon la prevalencia de los diferentes tipos esqueléticos de esta maloclusión en cuanto a la posición de ambos maxilares (prognatismo mandibular y retrognatismo mandibular), el tamaño (macrognatia mandibular y micrognatia maxilar) y la combinación de posición y tamaño (Figura X), encontrando que una combinación de

prognatismo y macrognatia mandibular era el componente más frecuente que caracterizaba a estos pacientes de Clase III.

Recientemente, Moreno Uribe LM y col.³⁴ en 2013 publicaron un estudio con el objetivo de establecer las variaciones fenotípicas en una población caucásica de sujetos adultos maloclusión Clase III esquelética. Usando métodos similares a los de Bui y col.³³, uno de los objetivos era evaluar si sus fenotipos se reproducían en una muestra étnicamente homogénea. Este trabajo, por tanto, se basa en estudios previos y proporciona un conjunto completo de fenotipos Clase III que pueden aplicarse fácilmente para la caracterización fenotípica de estos sujetos en otras muestras, lo que facilitaría grandes colaboraciones futuras de estudios genéticos. En los resultados de su análisis, encontraron 5 grupos de fenotipos Clase III: los grupos 1 y 2 representan fenotipos con tendencia a la Clase III, con una combinación leve de retrognatismo maxilar y prognatismo mandibular y con un plano mandibular recto o normal, respectivamente. El grupo 3 corresponde al fenotipo vertical Clase III con mandíbula aumentada y vertical y los grupos 4 y 5 representan los fenotipos severos de prognatismo mandibular y retrognatismo maxilar respectivamente (figura X).

Por tanto, estos estudios sugieren que los diferentes subgrupos en los que se han clasificado estos pacientes con maloclusión Clase III esquelética se han realizado en base al componente sagital fundamentalmente (prognatismo mandibular, deficiencia maxilar o ambos), añadiendo en un subgrupo el componente vertical junto con el sagital. Teniendo en cuenta estos resultados y en base a los estudios cefalométricos publicados, nuestro estudio en población española ha recogido un análisis cefalométrico extenso para poder clasificar e identificar la severidad de la maloclusión en la muestra estudiada.

En lo relativo a la relación entre la genética y los mecanismos de actuación para el desarrollo de esta maloclusión, se han descrito algunos estudios donde se expone la importancia del cartílago condilar de la articulación temporomandibular en el crecimiento mandibular¹³¹. Este cartílago se clasifica como cartílago

secundario, puesto que presenta características biológicas distintas y se considera que soporta el crecimiento del hueso mandibular. La carga mecánica o los estímulos funcionales podrían influir en las respuestas del cartílago condilar y el posterior crecimiento mandibular¹³².

Autores como McNamara y Carlson¹³³ plantearon la hipótesis de que el cartílago del cóndilo mandibular es sensible a los cambios biofísicos del medio ambiente y es muy probable que la maloclusión Clase III pueda provocarse debido a estas condiciones biomecánicas por la herencia de genes que predisponen al desarrollo de este fenotipo de Clase III. Varios estudios han documentado la influencia de varios genes que están implicados en la regulación de la morfogénesis mandibular. Las investigaciones recientes se han centrado en la expresión de factores de crecimiento específicos u otras moléculas de señalización que están implicadas en el crecimiento condilar. Los factores de crecimiento y citocinas son mediadores locales y pueden ser secretados en respuesta a la deformación mecánica. Estos mediadores regulan la proliferación celular y la expresión de productos de diferenciación mediante la activación de vías de transducción de señales en las células diana¹³⁴. En un estudio experimental llevado a cabo por Rabie y col.^{36,135} afirmaron que el posicionamiento hacia adelante de la mandíbula desencadena la expresión de IHH y PTHLH, genes que promueven la diferenciación y proliferación de células mesenquimales respectivamente y que, estas proteínas, actuaron como mediadores de la mecanotransducción para promover un mayor crecimiento del cartílago condilar. En otro modelo de rata, la expresión de IGF-1 aumentó significativamente cuando la mandíbula se reposicionó por medio de un aparato propulsor³⁵. Además, factores de crecimiento tales como VEGF y factores de transcripción tales como la región determinante de sexo Y (SRY) -box 9 (Sox9) y el factor de transcripción 2 RUNX (RUNX2) juegan un papel importante en la diferenciación de condrocitos en la placa de crecimiento bajo condiciones de carga mecánica o exposición a otros estímulos¹³⁶⁻¹³⁸.

Los genes que han sido implicados en el crecimiento condilar en estudios realizados en ratones podrían servir como posibles candidatos para aumentar nuestra comprensión de la maloclusión Clase III en seres humanos. El descubrimiento de genes candidatos proporciona la posibilidad de identificar genes que confieren susceptibilidad a este fenotipo. La región 1p36, que ha sido señalada como región de susceptibilidad en estudios ya descritos, alberga genes candidatos de posición de interés, que incluyen heparan sulfato proteoglicano 2 (HSPG2), matrilina 1, proteína de matriz de cartílago (MATN1) y fosfatasa alcalina (ALPL). Recientemente, se ha informado que HSPG2 está relacionado con la formación de cartílago y con anomalías craneofaciales¹³⁹. y *Matn1* y *Alpl* se consideran marcadores para la formación de cartílago y hueso, respectivamente^{140,141}.

Además, en estudios de crecimiento craneofacial realizado en ratones, se determinó que los *loci* de los cromosomas 10 y 11 eran responsables de la longitud mandibular, y estos corresponden a las regiones cromosómicas humanas 12q21 y 2p13, respectivamente⁴⁰. Este resultado comparativo apoya la hipótesis de que las regiones 12q23 y 12q13 son relevantes para el desarrollo craneofacial y pueden estar relacionadas con el fenotipo Clase III. Los genes candidatos de interés están localizados dentro de estas regiones, que incluyen la región homeobox (HOX3), IGF-1 y el colágeno, tipo II, alfa 1 (COL2A1). Se cree que los genes HOX son fundamentales en el desarrollo craneofacial¹⁴². Se ha demostrado que el IGF-1 está implicado en la actividad proliferativa del cartílago condilar¹³⁵ y que *Col2a1* codifica el colágeno tipo II en el cartílago, siendo importante para el crecimiento craneofacial¹⁴³. Por lo tanto, todos estos estudios concluyen que los genes candidatos para el desarrollo de la maloclusión de Clase III podrían localizarse en los loci cromosómicos 1p36, 12q23 y 12q13. En cuanto al mecanismo de actuación de nuestros resultados, el gen *FOXL1* presentado se encuentra en relación con células madres mesenquimales de la médula ósea y presenta implicaciones directas con el crecimiento óseo.

En cuanto a las limitaciones de nuestro estudio, podemos señalar en primer lugar el tamaño escaso de la muestra (107 sujetos por grupo) y la selección de sujetos de origen español únicamente. Sin embargo, debido al estricto criterio de inclusión que hemos implantado, la muestra es homogénea y puede aumentar el poder estadístico.

En segundo lugar, hubiese sido interesante realizar un análisis de morfometría geométrica, que consiste en un conjunto de métodos para la adquisición, procesamiento y análisis de variables morfológicas, reteniendo toda la información geométrica que contienen. Esto haría factible el estudio de la forma y el tamaño morfológico craneofacial conjuntamente en un espacio bi o tridimensional. Para ello se requieren registros de tomografía computerizada de haz cónico (CBCT) de cada paciente, sin embargo, no está justificado la realización de dicha prueba complementaria de rutina en nuestros pacientes de ortodoncia.

En tercer lugar, en los estudios de asociación genética con maloclusión de Clase III realizados hasta ahora, la mayoría de las cohortes existentes han sido recolectadas para estudios de casos y controles y, por lo tanto, sólo pueden proporcionar una evaluación instantánea de la asociación de una variación genética y este rasgo. Sin embargo, no puede ser probada la progresión natural de la Clase III ni las posibles interacciones entre los genes y el medio ambiente, como sugieren algunos autores. Esto hace interesante que a largo plazo los estudios genéticos sean seguidos en el tiempo.

Por último, los subfenotipos altamente variables (protrusión mandibular, retrusión maxilar o una combinación de ambos) y la heterogeneidad clínica de la maloclusión Clase III esquelética elevan la complejidad en la identificación del mecanismo genético para esta alteración dentofacial. Asimismo, a lo largo de la literatura, se ha comprobado que existe una disparidad en el conocimiento acerca de qué genes candidatos están relacionados con el prognatismo mandibular y la

deficiencia maxilar en pacientes con maloclusión esquelética Clase III debido a diferentes antecedentes genéticos entre las poblaciones. Asimismo, a pesar de la selección realizada, la garantización de un linaje no híbrido en el contexto multicultural actual hacen difícil la trazabilidad exacta de tipos de variaciones dado que existe un grado de influencia poblacional inherente de gran magnitud. No obstante, los resultados evidenciados reflejan una tendencia clara que aunque con cautela, nos permiten destacar factores que se asocian y que raramente podrán ser fruto de casualidades probabilísticas sino que se refieren a tendencias reales de asociación, más aún cuando la muestra homogénea analizada cuenta con un tamaño de muestra que garantiza la potencia estadística adecuado para ello.

La desproporción facial que con frecuencia acompaña a las maloclusiones Clase III esqueléticas severas puede provocar una carga significativa para la calidad de vida de los pacientes afectados. Los enfoques actuales para esta condición están dirigidos al tratamiento más que a la prevención. Así, los pacientes son sometidos a años de tratamiento ortodóntico u ortopédico, y muchos requieren corrección quirúrgica en la edad adulta.

Es importante comprender la causa del problema. Gran parte de la literatura ortodóntica ha discutido la contribución de los factores genéticos al crecimiento y a la maloclusión^{78,100,144-146}, pero no existe una fuente de conocimiento clara y definida en nuestra disciplina sobre cuál es el origen de esa potencial mayor atribución del componente genético. El desarrollo de protocolos individualizados, la guía en la toma de decisiones diagnósticas precoces en este tipo de pacientes, así como el desarrollo de líneas de tratamiento en biomedicina en el futuro pasa por determinar con clara evidencia el tipo de influencia asociada en este “carácter genético” de la maloclusión de clase III esquelética^{106,147}. En definitiva, para desarrollar estrategias preventivas y mejorar las modalidades de tratamiento para estos pacientes, son necesarios estudios que identifiquen la etiología genética de la maloclusión Clase III.

La maloclusión de Clase III esquelética es el resultado de múltiples factores

que interactúan durante el período morfogenético del maxilar y la mandíbula, siendo posible regular algunos de estos factores durante la infancia. Por esta razón, se ha sugerido que una mejor comprensión de las variables genéticas que contribuyen al fenotipo Clase III es necesario para desarrollar nuevas estrategias preventivas. Estos enfoques prometedores podrían permitir al ortodoncista seleccionar enfoques de tratamientos tempranos dentofaciales y ortodónticos que estén dirigidos a prevenir el desarrollo de esta maloclusión.

La cuestión práctica de la ortodoncia y la genética sería si diferentes individuos responden en algún grado a un cambio de entorno (tratamiento) de distintas formas, según la influencia de sus factores genéticos concretos. Es decir, este estudio puede preceder a más investigaciones que evalúen posibles diferencias en las respuestas de tratamiento basadas en polimorfismos genéticos. Este estudio ha permitido poner de relieve la existencia de al menos un grado de influencia genéticamente condicionado que marca el fuerte componente genético que se relaciona con el desarrollo de la maloclusión Clase III esquelética. El conocimiento de la etiología a través de estudios de asociación genética puede aportarnos en un futuro el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas para el control de esta alteración dentofacial.

7. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos previos, así como la revisión exhaustiva y específica sobre la influencia genética en la maloclusión Clase III esquelética existentes hasta la actualidad, y tras analizar los resultados obtenidos del estudio genético, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Los resultados descritos sugieren que la herencia de un alelo específico del gen FOXL1 (forkhead box L1, rs10048146) puede determinar la susceptibilidad genética de presentar Clase III esquelética con un grado de riesgo de 8 veces más comparativamente con sujetos control de Clase I esquelética ($p < 0,001$).

2. No se han determinado ninguna otra asociación estadísticamente significativa en relación a ninguna de las 42 regiones mapeadas de riesgo y de alto riesgo potencial. ($p > 0,05$)

3. Los resultados descritos arrojan nueva información específica sobre el origen y rasgo de carácter heredable implicado en un tipo de desequilibrio esquelético sagital de clase III. Es la primera vez, a lo largo de la literatura, que se ha descrito asociación del gen FOXL1 con la maloclusión Clase III esquelética.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TESIS DOCTORAL

1. Kingsley N, Norman W. Treatise on Oral Deformities as a Branch of Mechanical Surgery. 1st ed. New York: Appleton Co; 1880.
2. Wolff G, Wienker T, Sander H. On the genetics of mandibular prognathism: analysis of large European noble families. *MedGenet.* 1993;30:112-6.
3. Angle E. Treatment of malocclusion of the teeth. In: Angle's System. 7th ed. Philadelphia: SS White Dental Mfg Co; 1907.
4. Moyers R. Manual de Ortodoncia. 4^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1992.
5. Proffit W, Fields H, Sarver D. Contemporary Orthodontics. 4th ed. St Louis: MO Mosby; 2007.
6. Kanas R, Carapezza L, Kanas S. Treatment classification of Class III malocclusion. *J Clin Pediatr Dent.* 2008;33:175-85.
7. Ngan P, Moon W. Evolution of Class III treatment in orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015;148:22-36.
8. Akan B, Veli I. Comparison of dental arch and mandibular-maxillary base widths between true and pseudo-ClassIII malocclusions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2017;151(2):317-23.
9. Cevidanes L, Bailey L, Tucker G, Styner M, Mol A, Phillips C, et al. Superimposition of 3D cone-beam CT models of orthognathic surgery patients. *Dentomaxillofac Radiol.* 2005;34:369-75.
10. Noble J, Karaikos N, Wiltshire W. Diagnosis and clinical management of patients with skeletal Class III dysplasia. *Gen Dent.* 2007;55:543-47.
11. Perillo L, Monsurrò A, Bonci E, Torella A, Mutarelli M, Nigro V. Genetic association of ARHGAP21 gene variant with mandibular prognathis m. *J Dent Res.* 2015;94(4):569-76.
12. Haque S, Alam M, Khamis M. Factors Responsible for Unfavorable Dental Arch Relationship in non Syndromic Unilateral Cleft Lip and Palate Children. *J Clin Pediatr Dent.* 2017;41(3):236-42.
13. Kim Y, Kown S, Park Y, Chung K. Clinical application of the tongue elevator. *J Clin Orthod.* 2002;36:104-6.

14. Chang H, Tseng Y, Chang H. Treatment of mandibular prognathism. *J Formos Med Assoc.* 2006;105:781-90.
15. Chen F, Li Q, Gu M, Li X, Yu J, Zhang Y. Identification of a Mutation in FGF23 Involved in Mandibular Prognathism. *Sci Rep.* 2015; (10)5:11250.
16. Massler M, Frankel J. Prevalence of malocclusion in children aged 14 to 18 years. *Am J Orthod.* 1951;37:751-68.
17. Thilander B, Myrberg N. The prevalence of malocclusion in Swedish schoolchildren. *Scand J Dent Res.* 1973;81:12-21.
18. Foster T, Day A. A survey of malocclusion and the need for orthodontic treatment in a Shropshire school population. *Br J Orthod.* 1974;1:73-8.
19. Silva R, Kang D. Prevalence of malocclusion among Latino adolescents. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;119:313-15.
20. Allwright W, Burndred W. A survey of handcapping dentofacial anomalies among Chinese in Hong-Kong. *International Dental Journal.* 1964; 14:505-19.
21. Irie M, Nakamura S. Orthopedic approach to severe skeletal Class III malocclusion. *Am J Orthod.* 1975;67:377-92.
22. Iwagaki H. Hereditary influence of malocclusion. *J Oral Maxillofac Surg.* 1983;24:328-38.
23. Tang E. The prevalence of malocclusion amongst Hong Kong male dental students. *Br J Orthod.* 1994;21:57-63.
24. Baik H, Han H, Kim D, Proffit W. Cephalometric characteristics of Korean Class III surgical patients and their relationship to plans for surgical treatment. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg.* 2000;15:119-28.
25. Chan G. Class III malocclusion in Chinese: etiology and treatment. *Am J Orthod.* 1974;65:152-7.
26. Mills L. Epidemiological studies of occlusion IV. The prevalence of malocclusion in a population of 1,455 school children. *J Dent Res.* 1966;45:332-6.

27. Liu H, Wu C, Lin J, Shao J, Chen Q, Luo E. Genetic Etiology in Nonsyndromic Mandibular Prognathism. *J Craniofac Surg.* 2017;28(1):161-9.
28. Noble J, Karaiskos N, Wiltshire W. Diagnosis and clinical management of patients with skeletal Class III dysplasia. *Gen Dent.* 2007;55:543-7.
29. Mackay F, Jones J, Thompson R, Simpson W. Craniofacial form in class III cases. *Br J Orthod.* 1992;19:15-20.
30. Mouakeh M. Cephalometric evaluation of craniofacial pattern of Syrian children with Class III malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;119:640-9.
31. Lu Y, Tanne K, Hirano Y, Sakuda M. Craniofacial morphology of adolescent mandibular prognathism. *Angle Orthod.* 1993;63:277-82.
32. Hong S, Yi C. A classification and characterization of skeletal class III on etio-pathogenic basis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30:264-71.
33. Bui C, King T, Proffit W, Frazier-Bowers S. Phenotypic characterization of Class III patients. *Angle Orthod.* 2006;76:564-9.
34. Moreno U, Vela K, Kummet C, Dawson D, Southard T. Phenotypic diversity in white adults with moderate to severe Class III malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013;144(1):32-42
35. Tang G, Rabie A, Hagg U. Indian hedgehog: a mechanotransduction mediator in condylar cartilage. *J Dent Res.* 2004;83:434-8.
36. Rabie A, Tang G, Xiong H, Hägg U. PTHrP regulates chondrocyte maturation in condylar cartilage. *J Dent Res.* 2003;82:627-31.
37. Watanabe M, Suda N, Ohyama K. Mandibular prognathism in Japanese families ascertained through orthognathically treated patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005;128:466-70.
38. El-Gheriani AA, Maher B, El-Gheriani A, Sciote J, Abu-Shahba F, Al-Azemi R, et al. Segregation analysis of mandibular prognathism in Libya. *J Dent Res.* 2003;82:523-7.
39. Xue F, Wong R, Rabie A. Genes, genetics, and Class III malocclusion. *Orthod Craniofac Res.* 2010;3:69-74.

40. Dohmoto A, Shimizu K, Asada Y, Maeda T. Quantitative trait loci on chromosomes 10 and 11 influencing mandible size of SMXA RI mouse strains. *J Dent Res.* 2002;81:501-4.
41. Berkowitz S. State of the art in cleft palate orofacial growth and dentistry. A historical perspective. *Am J Orthod.* 1978;74:564-76.
42. Bok J, Son W. The effects of cleft on mesiodistal dimension of permanent teeth in unilateral cleft lip and palate patients. *Korean J Orthod.* 1995;25:447-51.
43. Kang J, Kang J, Son W. A study of the frequency of congenital missing and supernumerary teeth in cleft lip and palate patients. *Korean J Orthod.* 1993 23:319-26.
44. Rosenstein S. Two unilateral complete cleft lip and palate orthodontic cases treated from birth to adolescence. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 1999;115:61-71.
45. Crean S, Firrozeai R, Hopper C. The role of three-dimensional computed tomographic reconstruction in orthognathic surgery planning. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1997;35:376-7.
46. Kim Y, Kown S, Park Y, Chung K. Clinical application of the tongue elevator. *J Clin Orthod.* 2002;36:104-6.
47. Travesí J. Estudio cefalométrico de 1.000 casos de maloclusión en población española. I Análisis de Steiner. *Ortod Esp.* 1990;31:1-24.
48. Staudt C, Kiliaridis S. Different skeletal types underlying Class III malocclusion in a random population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;136:715-21.
49. Keles A, Tokmak E, Erverdi N, Nanda R. Effect of varying the force direction on maxillary orthopedic protraction. *Angle Orthod.* 2002; 72:387-96.
50. Kim J, Viana M, Graber T, Omerza F, BeGole E. The effectiveness of protraction face mask therapy: A meta-analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999;115:675-85.
51. Guyer E, Ellis E, McNamara J, Behrents R. Components of Class III malocclusion in juveniles and adolescents. *Angle Orthod.* 1986;56:7-30.

52. Ellis E, McNamara J. Components of adult class III malocclusion. *J Oral Maxillofac Surg.* 1984;42:295-305.
53. Kapust A, Sinclair P, Turley P. Cephalometric effects of face mask/expansion therapy in class III children: a comparison of three age groups. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1998;113:204-12.
54. Masaki F. The longitudinal study of morphological differences in the cranial base and facial structure between Japanese and American white. *J Jpn Orthod Soc.* 1980;39:436-56.
55. Ferre C. Acciones de la mentonera en clase III entre 5 y 10 años, con seguridad de su utilización. *Ortod Esp.* 1990;31:123-46.
56. Innocenti C, Giuntini V, Defraia E, Baccetti T. Glenoid fossa position in Class III malocclusion associated with mandibular protrusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135:438-41.
57. Giuntini V, De Toffol L, Franchi L, Baccetti T. Glenoid fossa position in Class II malocclusion associated with mandibular retrusion. *Angle Orthod.* 2008;78:808-12.
58. Arnett G, Bergman R. Facial keys to orthodontic diagnosis and treatment planning. Part I. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993;103:299-312.
59. Arnett G, Bergman R. Facial keys to orthodontic diagnosis and treatment planning--Part II. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993;103:395-411.
60. Powell S, Rayson R. The profile in facial aesthetics. *Br J Orthod.* 1976;3:207-15.
61. Mengi A, Sharma V, Tandon P, Agarwal A, Singh A. A cephalometric evaluation of the effect of glenoid fossa location on craniofacial morphology. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2016;6(3):204-12.
62. Ludlow J, Gubler M, Cevidanes L, Mol A. Precision of cephalometric landmark identification: Cone-beam computed tomography vs conventional cephalometric views. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;136:12.
63. Sanborn R. Differences between the facial skeletal patterns of Class III malocclusion and normal occlusion. *Angle Orthod.* 1955;25:208-22.

64. Sadao S. Case report: developmental characterization of skeletal Class III malocclusion. *Angle Orthod* 1994;64:105-11.
65. Williams S, Andersen C. The morphology of the potential Class III skeletal pattern in the young child. *Am J Orthod*. 1986;89:302-311.
66. Solano E. Nueva aproximación al diagnóstico ortodóncico a través del plano oclusal. *Ortod Esp*. 2009;49:180-207.
67. Baccetti T, Franchi L, McNamara J. Cephalometric variables predicting the long term success or failure of combined rapid maxillary expansion and facial mask therapy. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2004;126:16-22.
68. Gu Y. Factors contributing to stability of protraction facemask treatment of Class III malocclusion. *Aust Orthod J*. 2010;26:171-7.
69. Lee B. Correction of crossbite. *Dent Clin North Am*. 1978;22:647-68.
70. Gravely J. A study of the mandibular closure path in Angle Class III relationship. *Br J Orthod*. 1984;11:85-91.
71. Sharma P, Brown R. Pseudo mesiocclusion: diagnosis and treatment. *J Dent Child*. 1968;35:385-92.
72. Graber T, Rakosi T, Petrovic A. *Ortopedia Dentofacial con aparatos funcionales*. 2ª Ed. España: Ed Harcourt Brace; 1998.
73. Turley P. The Don Spring Memorial Oration--Part II: early management of the developing Class III malocclusion. *Aust Orthod J*. 1993;13:19-22.
74. Rabie A, Gu Y. Diagnostic criteria for pseudo-Class III malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2000;117:1-9.
75. Morales M, Iglesias A, Yañez R , Mendoza A, Solano E. Bone- and dentoalveolar-anchored dentofacial orthopedics for Class III malocclusion: new approaches, similar objectives? : a systematic review. *Angle Orthod*. 2013;83(3):540-52.
76. Woon S, Thiruvengkatachari B. Early orthodontic treatment for Class III malocclusion: A systematic review and meta-analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2017;151(1):28-52.
77. Graber L. *Principios y técnicas actuales*. 5ª ed. España: S.A. Elsevier; 2012.

78. Mossey PA. The Heritability of Malocclusion: Part 1—Genetics, principles and terminology. *Br J Orthod*. 1999 Jun;26(2):103-13.
79. Lidral A, Moreno L, Bullard S. Genetic Factors and Orofacial Clefting. *Semin Orthod*. 2008;14(2):103-14.
80. Harris E. Interpreting Heritability Estimates in the Orthodontic Literature *Semin Orthod*. 2008;14(2):125-34.
81. Shaza K, James K. Investigation of Genetic Factors Affecting Complex Traits Using External Apical Root Resorption as a Model. *Semin Orthod*. 2008;14(2):115-24.
82. Pulst S. Genetic Linkage Analysis. *Arch Neurol*. 1999;56:667-72 .
83. Feingold E. Methods for Linkage Analysis of Quantitative Trait Loci in Humans. *Theoretical Popul Biolog*. 2001;60:167-80.
84. Thein S, Menzel S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *Br J Haematol*. 2009;145:455-67.
85. Carlson C, Eberle M, Kruglyak L, Nickerson D. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature*. 2004;429:446-52.
86. Cheh C, Hirschhorn J. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutation Research*. 2005;573(1-2):54- 69.
87. Hirschhorn J, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med*. 2002;4(2):45-61.
88. Cardon L, Bell J. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*. 2001;2(2):91-9.
89. Kwok P. Genomics. Genetic association by whole-genome analysis? *Science*. 2001;294(5547):1669-70.
90. Wang W, Barratt B, Clayton D, Todd J. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*. 2005;6(2):109-18.
91. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996;273:1516-7.
92. Hirschhorn J, Daly M. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005;6:95-108.

93. Pearson J, Huentelman M, Halperin R, Tembe W, Melquist S, Homer N, et al. Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide-polymorphism association studies. *Am J Hum Genet.* 2007;80:126-39.
94. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005;7063:1299-320.
95. Weber J, May P. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 1989;44:388-96.
96. Beckman J, Weber J. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics.* 1992;12:627-31.
97. Litt M, Luty J. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet.* 1989;44:397-401.
98. Liébana J. *Microbiología oral.* 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.; 2002.
99. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G. Analysis of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;139:487-91.
100. Litton S, Ackermann L, Isaacson R, Shapiro B. A genetic study of Class III malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1970;58:565-77.
101. Nakasima A, Ichinose M, Nakata S. Genetic and environmental factors in the development of so-called pseudo- and true mesiocclusions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1986;90(2):106-16.
102. Mao J, Nah H. Growth and development: hereditary and mechanical modulations. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;125(6):676-89.
103. Ko J, Suh Y, Hong J, Paeng J, Baek S, Kim Y. Segregation analysis of mandibular prognathism in Korean orthognathic surgery patients and their families. *Angle Orthod.* 2013;83(6):1027-35.
104. Ikuno K, Kajii T, Oka A, Inoko H, Ishikawa H, Iida J. Microsatellite genome-wide association study for mandibular prognathism. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2014;145(6):757-62.

105. Cruz C, Mattos C, Maia J, Granjeiro J, Reis M, Mucha J, et al. Genetic polymorphisms underlying the skeletal Class III phenotype. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2017;151(4):700-7.
106. Weaver C, Miller F, da Fontoura C, Wehby G, Amendt B, Holton N, Allareddy V, Southard T, Moreno U. Candidate gene analyses of 3-dimensional dentoalveolar phenotypes in subjects with malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2017;151(3):539-58.
107. Slim K, Nini E, Forestier D, Kwiatkowski F, Panis Y, Chipponi J. Methodological index for non-randomized studies (minors): development and validation of a new instrument. *ANZ J Surg.* 2003;73:712-6.
108. The World Medical Association [página web]. Ferney-Voltaire, France: WMA; 2004 [fecha de acceso: 24/02/2015]. Publications [WMA Declaration of Helsinki – Ethical principles for medical research involving human subjects]. <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>.
109. Baccetti T, Franchi L, McNamara J. The cervical vertebral maturation method for the assessment of optimal treatment timing in dentofacial orthopedics. *Semin Orthod.* 2005;11:119-29.
110. Rainey B, Burnside G, Harrison J. Reliability of cervical vertebral maturation staging. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2016;150(1):98-104.
111. Gabriel, S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform. *Current Protocols in Human Genetics.* 2009;60:2.12:2.12.1–2.12.16.
112. Sasaki Y, Satoh K, Hayasaki H, et al. The p561t polymorphism of the growth hormone receptor gene has an inhibitory effect on mandibular growth in young children. *Eur J Orthodont* 2009;31:536–541.
113. Frazier-Bowers S, Rincon R, Zhou J, Alexander K, Lange E. Evidence of linkage in a Hispanic cohort with a class III dentofacial phenotype. *J Dent Res.* 2009;88:56-60.
114. Xue F, Wong R, Ab R. Identification of SNP markers on 1p36 and association analysis of epb41 with mandibular prognathism in a Chinese population. *Arch Oral Biol.* 2010;55:867-72.

115. Jang J, Park E, Ryoo H, Shin H, Kim T, Jang J, et al. Polymorphisms in the matrilin-1 gene and risk of mandibular prognathism in Koreans. *J Dent Res.* 2010;89:1203-7.
116. Li Q, Li X, Zhang F, Chen F. The identification of a novel locus for mandibular prognathism in the Han Chinese population. *J Dent Res.* 2011;90:53-7.
117. Tassopoulou-Fishell M, Deeley K, Harvey E, Sciote J, Vieira A. Genetic variation in myosin 1 h, contributes to mandibular prognathism. *Am J Orthod Dentofac.* 2012;141:51-9.
118. Xue F, Rabie A, Luo G. Analysis of the association of col2a1, and igf-1, with mandibular prognathism in a Chinese population. *Orthod Craniofac Res.* 2014;17:144-9.
119. Bayram S, Basciftci FA, Kurar E. Relationship between p561t and c422f polymorphisms in growth hormone receptor gene and mandibular prognathism. *Angle Orthod.* 2014;84:803-9 .
120. Guan X, Song Y, Ott J, Zhang Y, Li C, Xin T, Li Z, et al. The adamts1 gene is associated with familial mandibular prognathism. *J Dent Res.* 2015;94:1196-1201.
121. Fontoura C, Miller S, Wehby G, Amendt B, Holton NE, Southard T, et al. Candidate gene analyses of skeletal variation in malocclusion. *J Dent Res.* 2015;94:913-20.
122. Cruz R, Krieger H, Ferreira R, Mah J, Hartsfield J, Oliveira S. Major gene and multifactorial inheritance of mandibular prognathism. *Am J Med Genet.* 2008;146:71-7.
123. Kraus B, Wise W, Frie R. Heredity and the craniofacial complex. *Am J Hum Genet.* 1959;58:1347-63.
124. Downs W. Studies in the causes of dental anomalies. *J Dent Res.* 1928;8:367-79.
125. Yamaguchi T, Park S, Narita A, Maki K, Inoue I. Genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism in Korean and Japanese patients. *J Dent Res.* 2005;84:255-9.

126. Cruz R, Hartsfield J, Falcao-Alencar G, Koller D, Pereira R, Mah J, et al. Exclusion of Class III malocclusion candidate loci in Brazilian families. *J Dent Res.* 2011;90:1202-5.
127. Yamaguchi T, Maki K, Shibasaki Y. Growth hormone receptor gene variant and mandibular height in the normal Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;119:650-3.
128. Zhou J, Lu Y, Gao X, Chen Y, Lu J, Bai Y, et al. The growth hormone receptor gene is associated with mandibular height in a Chinese population. *J Dent Res.* 2005;84:1052-6.
129. Jacobson A, Evans W, Preston C, Sadowsky P. Mandibular prognathism. *Am J Orthod.* 1974;66:140-71.
130. Abu Alhaja E, Richardson A. Growth prediction in Class III patients using cluster and discriminant function analysis. *Eur J Orthod.* 2003;25:599-608.
131. Copray J, Dibbets J, Kantomaa T. The role of condylar cartilage in the development of the temporomandibular joint. *Angle Orthod.* 1988;58:369-80.
132. Kiliaridis S, Thilander B, Kjellberg H, Topouzelis N, Zafiriadis A. Effect of low masticatory function on condylar growth: a morphometric study in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999;116:121-5.
133. McNamara J, Carlson D. Quantitative analysis of temporomandibular joint adaptations to protrusive function. *Am J Orthod.* 1979;76:593-611.
134. Von den Hoff J, Delatte M. Interplay of mechanical loading and growth factors in the mandibular condyle. *Arch Oral Biol.* 2008;53:709-15.
135. Hajjar D, Santos M, Kimura E. Propulsive appliance stimulates the synthesis of insulin-like growth factors I and II in the mandibular condylar cartilage of young rats. *Arch Oral Biol.* 2003;48:635-42.
136. Rabie A, Shum L, Chayanupatkul A. VEGF and bone formation in the glenoid fossa during forward mandibular positioning. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;122:202-9.
137. Tang G, Rabie A. Runx2 regulates endochondral ossification in condyle during mandibular advancement. *J Dent Res.* 2005;84:166-71

138. Papadopoulou A, Papachristou DJ, Chatzopoulos SA, Pirttiniemi P, Papavassiliou A, Basdra E. Load application induces changes in the expression levels of Sox-9, FGFR-3 and VEGF in condylar chondrocytes. *FEBS Lett.* 2007;581:204-166.
139. Rodgers K, Sasaki T, Aszodi A, Jacenko O. Reduced perlecan in mice results in chondrodysplasia resembling Schwartz-Jampel syndrome. *Hum Mol Genet.* 2007;6:515-28.
140. Pei M, Luo J, Chen Q. Enhancing and maintaining chondrogenesis of synovial fibroblasts by cartilage extracellular matrix protein matrilins. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;6:1110-7.
141. Hu J, Simmer J. Developmental biology and genetics of dental malformations. *Orthod Craniofac Res.* 2007;10:45-52.
142. Vieille-Grosjean I, Hunt P, Gulisano M, Boncinelli E, Thorogood P. Branchial HOX gene expression and human craniofacial development. *Dev Biol.* 1997;183:49-60.
143. Garofalo S, Vuorio E, Metsaranta M, Rosati R, Toman D, Vaughan J, et al. Reduced amounts of cartilage collagen fibrils and growth plate anomalies in transgenic mice harboring a glycine-to-cysteine mutation in the mouse type II procollagen alpha 1-chain gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:9648-52.
144. Ko J, Suh Y, Hong J, Paeng JY, Baek SH, Kim YH. Segregation analysis of mandibular prognathism in Korean orthognathic surgery patients and their families. *Angle Orthod.* 2013;83:1027-35 .
145. Mitani H, Takahashi I, Onodera K, Bae JW, Sato T, Takahashi N, et al. Comparison of age-dependent expression of aggrecan and adamts in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats. *Histochem Cell Biol.* 2006;126:371-80.
146. Tian Y, Liu J, Bai X, Tan X, Cao Y, Qin K, et al. MicroRNA expression profile of surgically removed mandibular bone tissues from patients with mandibular prognathism. *J Surg Res.* 2015;198:127-34-

TESIS DOCTORAL

147. Marewski M, Petto C, Schneider M, Harzer W. Genetic response in masseter muscle after orthognatic surgery in comparison with healthy controls- A Microarray study. J Craniomaxillofac Surg. 2017;45(4):547-51.

9. ANEXOS

TESIS DOCTORAL

9.1. Informe del Comité de Ética de la Investigación (CEI).



Informe Dictamen Favorable Proyecto Investigación Biomédica

C.P. CLASE III Y GENOTIPO - C.I. 0230-N-17

15 de mayo de 2017

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Dr. Víctor Sánchez Margalet
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

CERTIFICA

1º. Que el CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío en su reunión del día 28/04/2017, acta 04/2017 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: BASES GENÉTICAS DE LA MALOCCLUSIÓN CLASE III ESQUELÉTICA

Código Promotor: CLASE III Y GENOTIPO **Código Interno:** 0230-N-17

Promotor: Investigador

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEI emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este CEI acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes CEI/Centros por los Investigadores:

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Alejandro Iglesias Linares
(Estomatología) Universidad de Sevilla

Lo que firmo en Sevilla, a 15 de mayo de 2017

Fdo:

Dr. Víctor Sánchez Margalet
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío
Avda. Manuel Siurot, s/n - Edificio de Laboratorios, 6ª plta Sevilla 41013 Sevilla España
Tel. 600 162 458 Fax. Correo electrónico administracion.eecc.hvm.sspa@juntadeandalucia.es

Página 1 de 2

9.2. Abreviaturas

A: adenina
C: citosina
G: guanina
g: gramo
k: índice kappa
T: timina
G1: grupo 1
G2: grupo 2
ACP: análisis de componentes principales
ADN: ácido desoxirribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ARNr: ARN ribosómico
ARNt: ARN transferente
CEI: comité de ética de la investigación
COL: colaboradores
CBCT: tomografía computerizada de haz cónico
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
dNTP: dinucleóticos trifosfatos
GWA: *Genome-wide association*
ICC: índice de correlación interclase
JCR: *Journal Citation Report*
MESH: *Medical Subject Heading*
MSE: multiseccional
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PT-L2P: prepIT•L2P
SSR: *simple sequence repeat*
SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*
STR: *Short Tandem Repeats*
mL: mililitros
µL: microlitros
°C: grado centígrado
°F: grado Fahrenheit

9.3. Publicaciones⁷⁵

Review Article

Bone- and dentoalveolar-anchored dentofacial orthopedics for Class III malocclusion: New approaches, similar objectives?

A systematic review

Marta Morales-Fernández^a; Alejandro Iglesias-Linares^b; Rosa María Yañez-Vico^b; Asuncion Mendoza-Mendoza^c; Enrique Solano-Reina^d

ABSTRACT

Objectives: To analyze the scientific literature and compare in the results of conventional orthopedic appliances with those obtained from recent bone-anchored orthopedics for Class III malocclusion.

Materials and Methods: The literature was systematically reviewed using PubMed/Medline, Scopus, and Scirus databases up to January 2012. Articles were selected by two different researchers (kappa index = 0.83), based on established inclusion/exclusion criteria. Methodologic quality was classified as high, medium, or low quality.

Results: The search strategy identified 1020 titles. Thirty studies were selected after applying the criteria (high quality = 9, medium quality = 21). Protraction rates differed within a range of one- to twofold between bone-anchored and dentoalveolar therapies ($P < .001$). All studies noted the effect of clockwise rotation on the mandible and an increase in inferior-anterior and total facial height; this was more obvious in dentoalveolar therapy than in bone-anchored orthopedics ($P < .001$).

Conclusions: Dental parameters like overjet increased significantly with both sets of groups, ranging from 1.7 to 7.9 mm with dentoalveolar therapy and from 2.7 to 7.6 mm with bone-anchored orthopedics. (*Angle Orthod.* 2013;83:540–552.)

KEY WORDS: Dentofacial orthopedics; Orthodontics; Bone-anchored orthopedics

INTRODUCTION

Treating Class III malocclusion is one of the most complex problems arising in orthodontic practice because the growth patterns in such patients are unpredictable and unfavorable. The components of a

Class III malocclusion include dental compensation and skeletal problems. Maxillary retrusion (hypoplasia), mandibular protrusion (hyperplasia), or a combination of the two may form the skeletal origin of malocclusion,¹ leading to an anterior crossbite and a concave profile.²

The traditional orthopedic treatment for skeletal Class III malocclusion in children who have not yet reached the period of pubertal growth spurt involved correcting skeletal deficiencies.³ The introduction of the new orthopedics based on bone-anchored systems has made it necessary to revise all of these previous concepts.⁴ In modern orthodontic practice, it appears possible to apply pure bone-borne orthopedic forces between the maxilla and the mandible for 24 hours per day, avoiding dentoalveolar compensations.⁵

The aim of the present study is to compile and analyze the various possibilities of orthopedic treatment for Class III malocclusion in the scientific literature and to compare the results of conventional orthopedic appliances with those obtained from recent bone-anchored orthopedics.

^a PhD student, Department of Orthodontics, School of Dentistry, University of Seville, Seville, Spain.

^b Assistant Professor of Orthodontics, Department of Orthodontics, School of Dentistry, University of Seville, Seville, Spain.

^c Full Professor of Pediatric Dentistry, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, University of Seville, Seville, Spain.

^d Chairman of Orthodontics, Department of Orthodontics, School of Dentistry, University of Seville, Seville, Spain.

Corresponding author: Dr Alejandro Iglesias Linares, School of Dentistry, University of Seville, C/Avicena sn, 41009 Seville, Seville, Spain

(e-mail: brpi@us.es)

Accepted: July 2012. Submitted: May 2012.

Published Online: September 26, 2012

© 2013 by The EH Angle Education and Research Foundation, Inc.