

**BIOMARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS A
FENOTIPOS ESQUELÉTICOS MALOCLUSIVOS
DE CLASE III: UN ESTUDIO EN FAMILIAS
ESPAÑOLAS**

**Máster en Ciencias Odontológicas.
Departamento de Especialidades Clínicas
Odontológicas.
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

CURSO ACADÉMICO 2023-2024

**Autora: LUCÍA CARREÑO GÓMEZ
Tutor: Dr. ALEJANDRO IGLESIAS LINARES**

Máster Universitario en CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)

ESTUDIANTE: LUCÍA CARREÑO GÓMEZ

TUTOR/TUTORA DEL TFM: DR. ALEJANDRO IGLESIAS LINARES

TÍTULO DEL TFM:

“BIOMARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS A FENOTIPOS ESQUELÉTICOS MALOCLUSIVOS DE CLASE III: UN ESTUDIO DE LIGAMIENTO EN FAMILIAS”

1. Objeto

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster Universitario en Ciencias Odontológicas y su tutor y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su profesor tutor del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

2. Colaboración mutua

El tutor del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

3. Normativa

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

4. Obligaciones del estudiante de Máster

- Elaborar, consensuado con el Tutor del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Odontología

- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le haga su tutor del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

5. Obligaciones del tutor del TFM

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

6. Buenas prácticas

El estudiante y el tutor del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del tutor, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

8. Confidencialidad

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor del TFM o de cualquier otro miembro del equipo

*A lo único realmente importante-
mi familia.*

Agradecimientos

Al Doctor Alejandro Iglesias, director de este trabajo e investigador principal de esta línea de investigación. Por dedicarme su tiempo, conocimientos, confianza e introducirme en el mundo de la investigación.

A la Doctora Alexandra Dehesa Santos, mi hermana mayor y guía en el mundo de la investigación.

A mis padres -mis mayores ejemplos. A mi padre, por ser mi mentor en nuestra profesión y en la vida y a mi madre, por enseñarme la felicidad de vivirla.

A mis hermanas -mis grandes pilares- y a mi apoyo principal.

A mis amigos, por celebrar mis logros como si fuesen suyos. A mis 5 grandes nuevos compañeros con los que -por suerte- compartiré siempre nuestra profesión.

Y, por último, agradecer por tener – y nunca dejar de hacerlo – ganas e ilusión por aprender cada vez más.

Índice

1. Introducción y antecedentes	9
2. Justificación	18
3. Hipótesis	21
4. Objetivos	28
4.1 <i>Objetivos primarios</i>	23
4.2 <i>Objetivos secundarios</i>	24
5. Material y métodos	26
5.1 <i>Registro del estudio y aspectos éticos</i>	26
5.2 <i>Cálculo del tamaño muestral y estimación de la potencia</i>	26
5.3 <i>Proceso de selección de familias y criterios de inclusión/exclusión</i>	27
5.4 <i>Registros clínicos y radiográficos.</i>	28
5.5 <i>Fenotipado de clase III: variables clínicas y radiográficas</i>	29
5.6 <i>Aislamiento del ADN y análisis de ligamiento</i>	32
5.7 <i>Genotipado del AND y análisis de asociación genética</i>	32
5.10 <i>Diseño del pedigree</i>	33
5.10 <i>Análisis estadístico: error y precisión del método</i>	34
6. Resultados	35
7. Discusión	54
8. Conclusión	64
9. Referencias	66
10. Anexos	73

Índice de figuras y tablas.

Figura 1: 76 puntos de referencia radiológica identificados en una radiografía lateral de cráneo (paciente LC6.23).....	30
Figura 2: Fórmula Dalhberg	34
Figura 3: Resumen de los pedigrís de las 21 familias junto con los resultados genéticos de las familias con la totalidad de los sujetos analizados afectos.....	40
Figura 4: Representación gráfica de la familia XI.....	52
Figura 5: Heatmap	53
Tabla 1: Listado de los 14 genes candidatos y 31 SNPs incluidos en el estudio con sus correspondientes locus cromosómicos y fenotipos craneofaciales o maloclusivos asociados	33
Tabla 2: Características cefalométricas descriptivas de la muestra dividido por familias y sujetos con clase III y sujetos control	37-38
Tabla 3: Variables cefalométricas de los sujetos diagnosticados de clase III esquelética.....	42
Tabla 4: Distribución de alelos	47-48
Tabla 5: Penetrancia del alelo menor.....	49
Tabla 6: Significación de la penetrancia en base al sexo.....	50

Índice de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

CBCT: Tomografía computarizada de haz cónico.

CCI: Coeficiente de correlación interclase.

EM: Error de método.

GHR: Receptor de la hormona de crecimiento.

GWAS: Estudios de asociación del genoma completo.

IFG2R: Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo II.

LOD: Logaritmo de las probabilidades.

NGS: Secuenciación de ADN de nueva generación.

PCA: Análisis de componentes principales.

PGH: Proyecto de secuenciación del genoma humano.

PM: Prognatismo mandibular.

TGFB3: Factor de crecimiento transformador beta 3.

SNPs: Polimorfismos de nucleótido único.

Resumen

Introducción: La posición sagitalmente avanzada de la mandíbula con respecto al maxilar está influida por factores tanto genéticos -considerado un rasgo poligénico- como epigenéticos [25]. Su transmisión familiar, estudiada en diferentes poblaciones por su gran influencia étnica, apoya la hipótesis de que la herencia desempeña un papel sustancial en su etiología [29]. Por ello, el objetivo de este estudio es identificar marcadores asociados a variantes genéticas vinculadas a clase III esquelética y su patrón de herencia entre familias de origen español. **Métodos:** Un total de 91 individuos de origen español (46 afectados y 44 no afectados) pertenecientes a 21 familias fueron reclutados. De cada sujeto se obtuvieron registros clínicos, cefalométricos y 2 mL de saliva para el genotipado del ADN realizado mediante un genotipado multiplexado y espectrometría de masas. A partir de este, se realizó un análisis de 14 genes candidatos y 31 SNPs. **Resultados:** El mayor porcentaje de sujetos afectados (39,13%) presentaron una clase III esquelética de causa mandibular. Pudiéndose observar un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta, los tres genes que obtuvieron una mayor penetrancia fueron BMP3 (4q21.21- SNP rs1495643) - 67% -, RUNX2 (6p21- SNP rs1997992) -61%- y el gen FGF10 (5p12- SNP rs593307) -100%- pudiendo ser el único en considerarse como alelo de riesgo entre sujetos de origen español. Respaldando estudios previos [6, 10, 11, 24, 26, 56, 57, 58, 59, 60,77], se pudo observar la presencia de homocigosidad del alelo menor del SNP rs2277071 (IGF2R, 6q25.3), rs2205181 y rs1012861 (14q24.3) en afectados de clase III y del SNP rs2249492 (COL1A1), *rs11200014 (FGFR2)*, *rs10850110 (MYOIH)* por igual en sujetos con clase II y III esquelética. **Conclusión:** La presencia en sujetos de origen español de genes ya identificados como susceptibles de desarrollar la maloclusión de clase III y su transmisión autosómica dominante con penetrancia incompleta respalda el papel de la genética en el desarrollo de la maloclusión. Por ello, su identificación es crucial para esclarecer su etiología permitiendo un avance en el diagnóstico y tratamiento de la clase III esquelética.

Palabras clave:

Maloclusión de clase III, prognatismo mandibular, genética, origen español, familias.

Abstract

Introduction: The sagittally advanced position of the mandible by reference to the maxilla is influenced by both genetic - considered a polygenic trait - and epigenetic factors [25]. Its familial transmission, studied in different populations due to its strong ethnic influence, supports the hypothesis that heredity plays a substantial role in its etiology [29]. Therefore, the aim of this study is the identification of markers associated with genetic variants linked to skeletal class III and their inheritance pattern among families of Spanish origin. **Methods:** A total of 91 individuals of Spanish origin (46 affected and 44 unaffected) belonging to 21 families were recruited. Clinical and cephalometric records and 2 mL of saliva were obtained from each subject. A DNA genotyping was performed by multiplex genotyping and mass spectrometry. 14 candidate genes and 31 SNPs were selected in order to study their presence. **Results:** The most prevalent cluster among affected subjects (39.13%) was C4 representing a mandibular skeletal class III. An autosomal dominant inheritance pattern with incomplete penetrance was observed among spanish population. The three genes with the highest penetrance were BMP3 (4q21.21- SNP rs1495643) - 67% -, RUNX2 (6p21- SNP rs1997992) -61%- and the FGF10 gene (5p12- SNP rs593307) -100%- being the only one to be considered as a risk allele. In accordance with previous studies [6, 10, 11, 24, 26, 56, 57, 58, 59, 60,77], the presence of homozygosity of the minor allele of the SNP rs2277071 (IGF2R, 6q25. 3), rs2205181 and rs1012861 (14q24.3) in class III subjects and of the SNP rs2249492 (COL1A1), rs11200014 (FGFR2), rs10850110 (MYOIH) equally in skeletal class II and III subjects. **Conclusion:** The presence of susceptible genes in Spanish population and their autosomal dominant transmission with incomplete penetrance supports the role of genetics in the development of the skeletal class III malocclusion. Therefore, its identification is crucial to clarify its etiology allowing an advance in the diagnosis and treatment of skeletal class III.

Keywords:

Class III malocclusion, mandibular prognathism, genetics, spanish origin, family.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En los últimos 25 años, la incorporación de nuevos avances y enfoques tecnológicos en el estudio de la genética humana ha permitido ampliar la comprensión sobre las bases genéticas de ciertas enfermedades [1]. Teniendo como principal objetivo la identificación de variantes de la secuencia de ADN influyentes en la aparición y progresión de enfermedades, la genética humana es un campo de la medicina que cobra cada vez más importancia [1].

La identificación de la susceptibilidad individual, ciertamente influida por la genética, a ciertas enfermedades supone una herramienta indispensable en la comprensión de la etiología y patogénesis de estas acercándonos hacia nuevas estrategias preventivas, diagnósticas y de tratamiento [1].

Durante la primera década del siglo XXI, el ámbito de la genética sufrió una gran transformación con la incorporación de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) y la secuenciación de ADN de nueva generación (Next-generation sequencing “NGS”) [2] partiendo del predecesor gran proyecto de secuenciación del genoma humano (PGH), referente para la identificación de múltiples variaciones genéticas.

Al inicio, las enfermedades raras, monogénicas y sindrómicas asumieron el papel principal en la investigación genética mediante análisis de ligamiento en muestras con pedigrís multigeneracionales [1]. La identificación de variantes potencialmente causales segregadas a través de individuos genéticamente relacionados y su ausencia en individuos sanos permitió sobre el año 2000, la caracterización de 1.000 de las aproximadamente 7.000 enfermedades hereditarias monogénicas identificadas, entre las cuales se encuentra la enfermedad de Huntington [3], suponiendo un gran impacto en la medicina. Sin embargo, existen enfermedades de aparición tardía o etiología multifactorial compleja (asma, diabetes, depresión...) en los cuales este tipo de análisis aún es limitado [1].

Se espera pronto conseguir categorizar la mayoría de las enfermedades monogénicas, conocidas estas como “aquellas cuya aparición se podría ligar casi exclusivamente a un único gen”. El mayor reto se sitúa en el estudio de fenotipos complejos, cuya manifestación depende de múltiples localizaciones cromosómicas (loci), y de etiología

multifactorial, es decir, influidos además por factores ambientales como es el caso de la maloclusión de clase III esquelética.

La identificación de estos datos genéticos y fenotípicos han creado una red de datos (Matchmaker Exchange, entre otras) que contribuye en el diagnóstico de dichas enfermedades emparejando pacientes con variaciones genéticas/fenotípicas similares [4], incluso entre pacientes de diferente origen.

La mayoría de los datos conocidos proceden de individuos de descendencia europea y aunque los patrones de predisposición genética parecen ser similares intercontinentalmente, pueden ser susceptibles a variaciones. Por ello, su aplicación a diferentes poblaciones permitiría nutrir la base de datos [1].

Hoy en día, el acceso a la medicina genética es cada vez más viable. Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento permiten identificar intrafamiliarmente variaciones genéticas sugestivas de ser causantes de trastornos dominantes y recesivos [1].

Uno de los campos de gran interés en la genética son los patrones de herencia. Aun sabiendo la importancia de la genética en la etiología de las enfermedades, se debe tener en cuenta la posible contribución de factores ambientales en la aparición de estas [5]. Por ello, identificar su peso en el desarrollo de enfermedades es crucial. La heredabilidad se define como “un cociente de varianzas, concretamente como la proporción de la varianza total en una población para una medida concreta, tomada en un momento o edad determinados, que es atribuible a la variación en los valores genéticos aditivos o genéticos totales” [5]. En otras palabras, la heredabilidad puede ser descrita como “aquella proporción de variabilidad genética que se atribuye a factores genéticos que proceden de progenitores y no a factores ambientales” [5].

Mediante la detección de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), nuevas vías de investigación resurgen permitiendo estimar la heredabilidad de rasgos fenotípicos como la maloclusión de clase III [5].

La identificación de cuán heredable es un fenotipo de interés entre individuos genéticamente emparentados nos permite conocer más en profundidad la diferenciación entre variaciones fenotípicas y su porcentaje de influencia en la etiología de una enfermedad.

La maloclusión de Clase III puede ser descrita como un “conjunto de fenotipos dentofaciales diversos caracterizados esqueléticamente por una posición avanzada de la mandíbula con respecto al maxilar con una clara predisposición genética” [7, 8]. Puede asociarse a un sobrecrecimiento de la mandíbula con (50-60%) o sin (20%) déficit del crecimiento maxilar como parte de un síndrome o como un rasgo aislado [8].

El rango de frecuencias difiere entre las poblaciones de todo el mundo, mostrando una mayor prevalencia en asiáticos (14,8%) y una menor en caucásicos (0,48-4%), lo que justifica la correlación de esta enfermedad con la diversidad étnica [6]. Varios estudios apoyan la importancia de la genética y la procedencia geográfica en el desarrollo del prognatismo mandibular [9, 10, 11, 12], explicando así la heterogeneidad de esta enfermedad.

Hoy en día, diversos estudios intentan identificar el rol del origen étnico en el desarrollo del prognatismo mandibular. Yamaguchi y cols [10] realizaron un análisis de ligamiento en familias coreanas y japonesas revelando 3 loci (1p36, 6q25, 19p13) con evidencias de ligamiento. Por otro lado, se ha encontrado una asociación del cromosoma 12 (12q13.13) con la maloclusión esquelética de clase III entre cuatro familias hispanas [11]. Sin embargo, estos vínculos no pudieron corroborarse en un grupo de familias brasileñas, probablemente, debido a la heterogeneidad de los orígenes étnicos de los sujetos estudiados [12].

La existencia de diferentes variantes genéticas apoya la heterogeneidad de locus en esta maloclusión poligénica [12]. Estas comparaciones interpoblacionales con resultados dispares sugieren que el origen étnico es un factor de riesgo importante para la maloclusión de clase III [10] y demuestran que conocerlo favorece la comprensión de su desarrollo [12].

Aunque el origen étnico desempeña un papel importante, no es el único factor que influye en esta condición. Se cree que es un trastorno poligénico atribuido a la interacción entre factores genéticos y ambientales (sistema endocrino, hormonas, amígdalas hipertróficas... [13]) con un porcentaje de contribución ambiguo [9]. Aunque ciertos factores ambientales se han asociado al desarrollo de esta maloclusión, la agregación familiar de esta condición apunta a la importancia que tiene la heredabilidad en la etiología de la clase III [10].

El principal y mayor ejemplo de agregación familiar de esta condición es la familia real Habsburgo donde el fenotipo de maloclusión de clase III fue heredado a lo largo de 23 generaciones. Tan llamativa es esta que incluso se ha utilizado el término “The Habsburg jaw” para hacer referencia a la maloclusión de clase III [14, 15]. Los Habsburgo reinaron en España y Austria desde el siglo XV hasta finales del siglo XVII. Siendo una de las más poderosas familias en la Europa de entonces, contamos con una extensa documentación detallada sobre su linaje e informes médicos que describen sus anomalías faciales. Hoy en día, estos han sido estudiados mediante retratos [16]. Hodge defendía la hipótesis de que el “prognatismo mandibular” se trataba de un rasgo autosómico dominante de antepasados españoles, portugueses y austriacos.

A pesar de que algunos aspectos de la maloclusión esquelética de Clase III han sido ampliamente estudiados, aún persiste un significativo desconocimiento sobre el papel de la genética y su patrón de herencia. Su conocimiento ofrecería nuevas oportunidades permitiendo aclarar la interacción entre sus factores etiológicos y comprender su agregación familiar. A partir de perfiles genéticos familiares, el análisis de ligamiento nos acerca a la identificación de variantes raras vinculadas a enfermedades mendelianas hereditarias [17]. Hasta la fecha, se han estudiado genéticamente ciertas patologías como la aterosclerosis [17], la esclerosis múltiple [18], diferentes cánceres como el de mama, ovario, páncreas [17, 19], gástrico [20], colorrectal, próstata [21] y pulmón [22] con la esperanza de dar un paso hacia una detección precoz, un mayor conocimiento del curso de las enfermedades y establecer opciones terapéuticas personalizadas y precisas. Sin embargo, las maloclusiones dentales son un campo todavía a investigar.

Se han realizado pocos estudios genéticos en familias con maloclusión esquelética de clase III que muestren su segregación entre generaciones [6, 9, 10, 11, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30]. En estos, se han sugerido algunos modelos de herencia asumiendo, en muchas de

las investigaciones, un patrón autosómico dominante con penetrancia incompleta [6]. Existen diferentes regiones cromosómicas identificadas que podrían albergar genes asociados a la presencia de prognatismo mandibular (21q21.3 y 12q24.11, entre otros, en población china y coreana y 1p22.3, 1q32.2, 3q23, 6q23.2, 7q11.22 y 15q22.22 en individuos japoneses, 1p22.1, 3q26.2, 11q22, 12q13.13 y 12q23 entre familias hispanas) [9, 10, 11], una mayor longitud mandibular y retrusión maxilar [31].

Debido a su naturaleza compleja, se manifiesta en diversas entidades clínicas y puede expresarse con un gran número de combinaciones de componentes esqueléticos, dentales y variaciones de los tejidos blandos pudiendo diferenciarse entre varios subclústers fenotípicos [32]. Actualmente, la clasificación de los fenotipos de clase III se basa fundamentalmente en medidas cefalométricas [33] y teniendo en cuenta algunos de los factores que influyen en su desarrollo, como la edad y el sexo [32]. Por ello, ¿es realmente preciso una clasificación donde no se tiene en cuenta todos los factores influyentes en el desarrollo de la enfermedad? - como, por ejemplo, la etnia o el perfil genético [34].

Los rasgos maloclusivos de clase III esquelética propios de cada grupo étnico difieren en cuanto a sus características faciales y la estructura esquelética. Dicho hecho da lugar a una destacada heterogeneidad en el diagnóstico de clase III esquelética [35, 36, 37, 38].

Por ello, su diagnóstico no puede residir en una clasificación general simplista, útil para el uso clínico pero insuficiente para comprender su fisiopatología [24]. Existen estudios que proporcionan clasificaciones más detalladas mediante la subclasificación de los fenotipos de Clase III utilizando el análisis de componentes principales (PCA) [32,33].

El número deseable (de 4 a 7 clústeres [32]) debe ser práctico para el uso clínico y suficiente para evitar interacciones intragrupalas [33]. Sin embargo, este número varía sustancialmente entre estudios y pocos tienen en cuenta todos los factores implicados en el desarrollo la clase III.

Es importante recalcar la necesidad de una clasificación donde la etnia juegue un papel relevante facilitando futuras líneas de investigación sobre el pronóstico y los resultados del tratamiento. Hoy en día, el patrón esquelético rige dichas subclasificaciones ya siendo

útil para poder llegar a analizar cómo evolucionan los diferentes subfenotipos según el tratamiento empleado [32].

Otra gran incógnita en el mundo de la clase III es la elección del tratamiento idóneo y el momento de actuación. La edad del paciente (etapa de crecimiento), la severidad de la maloclusión y la exploración clínica junto con la cefalométrica (donde se valora, entre otros, la discrepancia ósea sagital y vertical, compensaciones dentoalveolares y estética facial [39]) son, hoy en día, algunos de los factores determinantes a la hora de establecer un plan de tratamiento [39]. Sin embargo, existen ciertos casos donde esta información es insuficiente.

A grandes rasgos, el tratamiento de la maloclusión esquelética de clase III puede abordarse, según la etapa de crecimiento del paciente y la severidad de la afección- entre otros factores-, de una manera ortopédica, ortodóntica o quirúrgica.

Con respecto al tratamiento ortopédico, las modificaciones a nivel óseo deben de realizarse, idóneamente, antes del pico de crecimiento puberal favoreciendo la obtención de resultados en un menor tiempo. Sin embargo, muchas de las veces esto no es posible [39].

Por otro lado, el tratamiento quirúrgico actúa como tratamiento de elección en ciertos casos. Kerr y cols. [38] sugirieron que este sería preferente en casos donde el paciente presentaba un ANB menor a -4° y un ángulo de Tweed de 83° o ausencia de crecimiento remanente. Stellzig-Eisenhauer y cols. [40] incluyeron medidas como Wits appraisal, SN, ratio maxilar/mandibular y el ángulo goniaco como determinantes en la elección del tratamiento -ortodóntico o quirúrgico- de la clase III. El problema surge en la elección entre ambas terapéuticas en aquellos pacientes límites, es decir, pacientes con problemas esqueléticos leves o moderados que pueden ser tratados de ambas formas [39]. Para ello, Eslami y cols. [39] propuso establecer el límite de tratamiento quirúrgico en un Wits menor a -5.8 mm. Por otro lado, Rabie y cols. [41] propuso valorar el ángulo de Holdaway como determinante en la elección. Aquellos con un ángulo de Holdaway menor a 12° serán susceptibles de tratamiento quirúrgico mientras que aquellos con un ángulo mayor a 12°

serán más propensos a ser tratados ortodóncicamente. Contrastando estos resultados, Eslami y cols. [39] establecieron los 10. 3º como límite entre ambos tratamientos.

Ortodóncicamente la clave del tratamiento de las maloclusiones de clase III reside en la inclinación del plano oclusal. La orientación de este permite a la mandíbula realizar movimientos laterales excursivos simétricos hacia el lado derecho e izquierdo y un correcto componente vertical y protrusivo de los movimientos laterales consiguiendo una fricción interarcada idónea [42]. Los pacientes diagnosticados de clase III generalmente presentan un plano oclusal inclinado en sentido horario y convergente, en la parte anterior, con el plano de Camper [42]. La masticación fisiológica depende de la relación entre la inclinación de los cóndilos mandibulares y el plano oclusal [43] por lo tanto, el conocimiento del canto de inclinación de este debe ser considerado y reestablecido en la corrección de las clases III rehabilitando la masticación por, entre otros, su influencia en el crecimiento facial y en la estabilidad.

El momento del comienzo del tratamiento es crucial. Existen diversos estudios [42, 44] que valoran realizar un tratamiento temprano debido a la posibilidad de influir en el desarrollo maxilofacial durante la etapa de crecimiento y por la tendencia natural de acentuación de las clases III. El objetivo de comenzar en dentición mixta es simplificar el tratamiento posterior en dentición permanente [44] aunque pueda presentar desventajas como el aumento del tiempo de tratamiento global y los costes (biológico, económico, temporal..).

Como se ha expuesto anteriormente, a nivel oclusal el tratamiento temprano está justificado debido a la facilidad que supone la reorientación del plano oclusal en dentición temporal. Esto se debe a la simplicidad de este por la ausencia de curvas de Spee y Wilson y una longitud más corta (por la ausencia de molares permanentes) [42]. Cuanto más largo sea, más componente vertical se deben de dar a los molares inferiores dificultando su manejo. Además, la presencia de mordida cruzada anterior puede acarrear disfunciones articulares, desplazamiento y recesión de los dientes incisivos o el favorecimiento del desarrollo de clase III [44]

Por otro lado, funcionalmente un tratamiento temprano también brinda ventajas. La rehabilitación de la masticación puede reducir el crecimiento patológico favorecedor del

hiperdesarrollo mandibular y la normalización de la postura muscular (labio-mental, lingual y velofaríngea) y las funciones orofaciales (respiración nasal, masticación y deglución) [42].

¿Es posible identificar aquellos pacientes que se beneficiarán realmente de un tratamiento temprano a largo plazo? Un abordaje correcto comienza por un diagnóstico certero. Conociendo la heredabilidad en esta afección buscamos entender mejor la predictibilidad del desarrollo del prognatismo mandibular avanzando hacia un enfoque clínico más preciso y precoz. Para ello, es precisa una investigación mucho más amplia de la identificación de genes susceptibles de desarrollar rasgos de clase III y cómo podrían heredarse entre generaciones.

Partiendo de una escasa literatura publicada al respecto, el objetivo principal de este estudio es identificar los marcadores asociados a variantes genéticas codificantes y no codificantes vinculados a la clase III esquelética y su patrón de herencia familias de origen español, con el fin de aumentar la comprensión de su etiología.

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Los GWAS son una herramienta útil para el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP) y alelos de riesgo comunes asociados a enfermedades complejas [31, 45], los cuales representan sólo una pequeña parte de la variación genotípica [46]. Sin embargo, en cierto porcentaje [47, 48] estas pueden deberse a SNP raros [49], incapaces de ser identificados mediante GWAS debido a su bajo desequilibrio de ligamiento con los SNP genotipados más comunes [31, 45].

Como alternativa, el análisis de ligamiento es un método independiente de la heterogeneidad alélica [31, 45], que permite identificar posibles regiones genéticas que alberguen variantes, tanto comunes como raras, causantes de enfermedades complejas [31]. Mediante agregación familiar, los análisis de ligamiento permiten analizar la transmisión de variantes con fenotipos [45] y suplir las limitaciones de GWAS. De este modo, el estudio de ligamiento en familias de origen español permitiría la identificación de SNP raros esclareciendo la etiología de enfermedades de naturaleza compleja, como la Clase III esquelética.

Gran parte de la complejidad de esta maloclusión, en comparación con otras, reside en el importante papel que cursa la genética en su etiología. A pesar de su baja prevalencia, la distribución heterogénea que presenta confirma la influencia de los factores étnicos en el fenotipo y genotipo de esta maloclusión [9, 10, 32].

Hasta el momento, la investigación pone el foco en identificar el abordaje terapéutico más idóneo sin hacer hincapié en la comprensión profunda de la etiología de la Clase III esquelética, lo que permitiría establecer diagnósticos precoces, protocolos de prevención o intervención de bajo impacto, así como en la individualización del caso con posibles enfoques terapéuticos alternativos [11]. Un conocimiento específico de la etiología nos permitiría establecer protocolos de actuación individualizados (momento de tratamiento, duración y opción terapéutica idónea) que ayudarían a predecir de manera más precisa el curso de la enfermedad y por lo tanto un mejor abordaje terapéutico.

Por ello, los resultados obtenidos en esta investigación podrían contribuir a esclarecer la predisposición a desarrollar clase III entre familias españolas con individuos afectados. El conocimiento más profundo de su fisiopatología, mediante el análisis del perfil genético, podría conducirnos a un diagnóstico precoz, anticipando y detectando los casos de desarrollo severo de la maloclusión. Por igual, conduciría a un mejor abordaje clínico evitando la sobre intervención crónica en este tipo de pacientes desde edades muy tempranas y reconduciendo hacia la mejor opción individualizada mínimamente interventora para el paciente.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Partiendo de la mejor evidencia científica disponible hasta el momento y ahondando en el papel predominante que se le atribuye al componente genético en el desarrollo de la clase III y su tendencia a segregarse entre familias con individuos afectados, la hipótesis alternativa propuesta para este trabajo es:

Hipótesis alternativa (H₁):

El fenotipo de clase III esquelética se asocia con variantes genéticas específicas que se transmiten intergeneracionalmente entre sujetos con vínculo familiar, en población de origen español.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS PRIMARIOS Y OBJETIVOS SECUNDARIOS

Debido al limitado conocimiento sobre la heredabilidad en esta condición, para predecir el desarrollo del prognatismo mandibular y/o hipoplasia maxilar, así como proponer un enfoque clínico más preciso y precoz, es necesaria una investigación mucho más amplia de cómo los biomarcadores genéticos putativos vinculados a los fenotipos de la clase III esquelética podrían heredarse entre generaciones.

a. *Objetivos primarios*

OP1. Identificar los marcadores asociados a variantes genéticas codificantes y no codificantes vinculados a la clase III esquelética en familias de origen español.

OP2. Identificar el patrón de herencia de la maloclusión de clase III entre descendientes en familias de origen español.

b. *Objetivos secundarios*

OS1. Subclasificar a los sujetos de clase III en base a sus características morfológicas mediante PCA y de subgrupos (clúster) [33, 32].

OS2. Identificar si existe una relación directa entre los diferentes biomarcadores genéticos putativos y los subgrupos fenotípicos de la maloclusión de clase III.

MATERIAL
Y
MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Registro del estudio y aspectos éticos.

El estudio, iniciado en el tercer trimestre de 2022, ha sido registrado en la facultad de odontología de la UCM (referencia URI158). Se trata de un estudio de genotipado multiplexado (Multiplex genotyping) y espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*) realizado en familias de origen español reclutadas de una clínica dental privada en Madrid.

La aprobación de este estudio (*Anexo 1*) fue conferida por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (referencia 23/043-E). A cada adulto o tutor legal, en caso de menores, fue entregado un consentimiento informado (*Anexo 2*) y hoja de información (*Anexo 3*). Teniendo como objetivo principal el cumplimiento de los derechos de los participantes, la recogida de información se llevó a cabo mediante el principio de la Declaración de Helsinki [50].

Todo dato personal, clínico y genético han sido tratados bajo lo establecido en la Ley 14/2007 de investigación biomédica. Además, con el objetivo de preservar su privacidad, todo dato ha sido codificado y almacenado con acceso restringido cumpliendo la ley Orgánica 3/2018 de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales.

5.2 Cálculo del tamaño muestral y estimación de la potencia.

El cálculo del tamaño muestral fue realizado mediante la herramienta online ClinCalc.com (<https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>). Para la población general se asumió una frecuencia del 2% [51] y para la población estudio del 95 % con una potencia del 0,8 y un umbral de significación del 0.05.

La potencia para detectar ligamiento se calculó con el programa SLINK mediante la realización de 500 réplicas. Los pedigree mostraron una puntuación LOD (logaritmo de las probabilidades) máxima esperada de 2,55, asumiendo un modelo autosómico

dominante con penetrancia incompleta y una tasa de fenocopia de 0,005. La potencia para detectar puntuaciones LOD superiores a 1 y 2 fue del 80,8% y el 37,4%, respectivamente.

5.3 Proceso de reclutamiento de familias y criterios de inclusión/exclusión.

A través de la colaboración con una clínica dental privada de Madrid, se reclutó una muestra de sujetos para ser estudiados como representación de la población diana. Para llevar a cabo la elección de los pacientes, se realizaron dos procedimientos: especificación y muestreo.

5.3.1 *Especificación.*

5.3.1.1 *Criterios de inclusión:*

- Sujetos de origen español sin hacer distinciones provinciales.
- Multigeneracionales: 3 generaciones con al menos un individuo por generación.
- ≥ 1 sujeto/ familia con diagnóstico positivo de maloclusión esquelética de clase III.

Definición de sujetos con diagnóstico positivo de Clase III esquelética:

- Ausencia de antecedentes de trauma facial severo.
- Ausencia de síndrome craneofacial o alteración congénita (Ej.: paladar hendido).
- Presencia de al menos dos criterios esqueléticos o un criterio esquelético combinado con un criterio dentario:

Criterios esqueléticos:

- o $ANB \leq 0^\circ$ [40]
- o Valoración de Wits ≤ 0 mm y ≤ 1 mm en hombres y mujeres, respectivamente [40].

Criterios dentarios:

- o Overjet ≤ 0 mm: mordida cruzada anterior o al menos borde a borde [10, 11, 25].
- o Relación molar o canina de Clase III de Angle sin pérdida de espacio anterior [33]

5.3.1.2 Criterios de exclusión: aquellos individuos que, cumpliendo con los criterios de inclusión, se rechazaron por posibles interferencias en la calidad de los datos o interpretación de los resultados. Los posibles motivos son:

- Pérdida de sujeto durante la recogida de datos: riesgo de fallecimiento.
- Negativa frente a firmar el consentimiento informado.
- Muestra de saliva de mala calidad/no analizable.

5.3.2 Muestreo.

Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

5.3.3 Proceso de reclutamiento de familias.

Con el requisito fundamental de la presencia de al menos un individuo afectado y cumpliendo el resto de los criterios anteriormente mencionados, se reclutaron sujetos dentro de una misma familia tanto en sentido vertical (al menos 3 generaciones valiendo tanto ascendentes como descendentes del sujeto afectado) como en sentido horizontal (al menos uno por cada generación). El reclutamiento de individuos, la entrega del consentimiento informado/hoja de información (*Anexo 2 y 3*), recogida de datos clínicos, radiográficos y muestra salival fue realizado en una clínica dental privada de Madrid.

5.4 Registros clínicos y radiográficos.

De todos los sujetos diagnosticados de prognatismo mandibular que formaban parte de la base de datos de la clínica, se recogieron fotografías extraorales e intraorales, tomografía computarizada de haz cónico (CBCT) y telerradiografías laterales de cráneo previos al tratamiento -en posición natural de la cabeza- al igual que todos los registros clínicos tomados en consideración para un diagnóstico positivo de clase III esquelética.

Para cada uno de los demás miembros de la familia, se recogió únicamente un CBCT y una telerradiografía lateral de cráneo, en posición natural de la cabeza. No se pudo obtener

los registros radiográficos de un único sujeto (LC21.90) por incapacidad física. Por ello, su diagnóstico se basó en registros fotográficos. El sexo, posición generacional dentro de la familia y fecha de nacimiento fue registrado de todos los sujetos de cada generación como información adicional (*Anexo 4 y 5*).

Las telerradiografías laterales de cráneo fueron escaneadas y digitalizadas usando Dolphin imaging, versión 11.95 Premium (Dolphin Imaging Systems, Chatsworth, CA, USA). Cada una fue calibrada y estandarizada con una regla digital de 10 mm.

5.5 Fenotipado de clase III: variables clínicas, radiográficas y proceso de clustering.

5.5.1 *Variables clínicas.*

El diagnóstico positivo de clase III, en parte, se realizó mediante exploración intra y extraoral. Se recolectaron fotografías intraorales y extraorales de aquellos sujetos con clase III esquelética como registros complementarios.

La relación molar y canina de cada lado [33] y el resalte [10, 11, 25] fueron valoradas en las fotografías intraorales laterales con el objetivo de registrarlas como criterios clínicos a valorar para el diagnóstico de clase III.

Los criterios clínicos requeridos, a combinar con los cefalométricos, para un diagnóstico positivo de clase III son:

- a. Clase III molar y canina sin pérdida de espacio anterior [33].
- b. Resalte ≤ 0 mm: mordida cruzada anterior o borde a borde [10, 11, 25].

5.5.2 *Variables cefalométricas.*

Partiendo de las telerradiografías laterales, la investigadora principal realizó los análisis cefalométricos de la totalidad de los sujetos identificando un total de 54 medidas cefalométricas -23 angulares, 23 distancias y 8 medidas proporcionales- y 76 puntos de referencia radiológicos, de los cuales 30 se encuentran en estructuras esqueléticas (tanto lineales como angulares), 24 son dentales, 15 se localizan en tejidos blandos, 4 están

relacionados con estructuras de las vías respiratorias y 1 con una estructura muscular (Figura 1, Anexo 6 y 7). Independiente a estos puntos de referencia, es necesario la localización de dos puntos suplementarios para la correcta calibración de la radiografía (Figura 1, Anexo 6 y 7) [32]. Toda la información fue recolectada en una hoja de cálculo de Excel (Tabla 2).

Los criterios radiográficos requeridos, únicos o a combinar con los clínicos, para un diagnóstico positivo de clase III son:

- a. $ANB \leq 0^\circ$ [40].
- b. Valoración de Wits ≤ 0 mm y ≤ 1 mm en hombres y mujeres respectivamente [40].

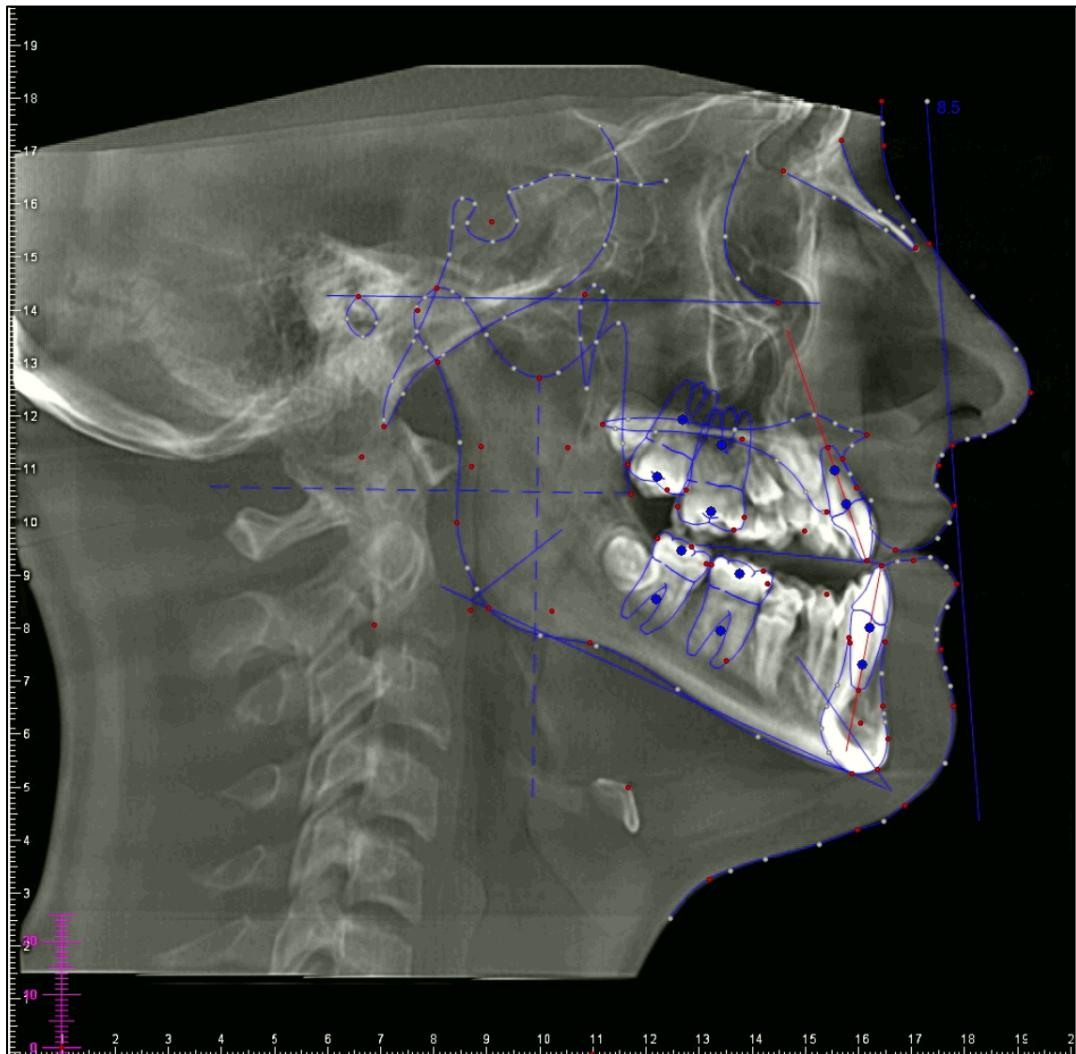


FIGURA 1. Ubicación de los 76 puntos de referencia radiológica identificados en una radiografía lateral de cráneo (paciente LC6.23).

Las medidas cefalométricas utilizadas como indicativas de clase III fueron el ANB y la valoración de Wits [52, 53]. A pesar de su sensibilidad a pequeños cambios, se tomaron dichas medidas como indicativas debido a su fiabilidad, precisión y a su fuerte intercorrelación para el diagnóstico de las relaciones esqueléticas sagitales [52, 53].

5.5.3 *Proceso de subclustering.*

Con el objetivo de identificar y agrupar los diferentes fenotipos de la maloclusión de clase III [32, 33], todos los individuos afectados fueron agrupados en diferentes subclusters mediante un análisis predictivo discriminante.

Para ello, se utilizaron dos propuestas de Frutos-Valle L y cols. [33, 32]. Por un lado, se subclasificaron entre 4 clústers [33] y, por otro lado, de manera independiente, entre 6 clústers [32] (*Anexo 8*). Al subclasificar a los individuos, la comparación intrasujetos es más fácil y detallada permitiendo obtener unos resultados más específicos.

Con respecto a la primera subclasificación, los subclusters se agrupan desde la maloclusión esquelética de clase III más severa (C1) a la menos severa (C4) [33]. C1 hace referencia a una clase III esquelética severa de causa mixta, con el tamaño maxilar menor y mandibular mayor comparado con el resto de los grupos. C2 representa una clase III esquelética de causa maxilar con birretrusión, rama mandibular proporcionalmente disminuida y una altura facial posterior proporcionalmente disminuida con respecto a la altura facial anterior. C3 refiere a una clase III esquelética de causa mixta con disminución del tamaño del cuerpo mandibular, rama mandibular proporcionalmente aumentada y ligera retrusión maxilar y, por último, C4 representa una clase III leve de causa mandibular con la menor diferencia maxilo-mandibular y una disminución de la altura facial inferior y del plano mandibular.

Por otro lado, con respecto a la segunda subclasificación propuesta por Frutos-Valle L y cols. [32], podemos diferenciar entre: C1, caracterizado por un tamaño mandibular y altura facial aumentada; C2, plano mandibular aumentado y birretrusión maxilar; C3, ligera clase III esquelética con una ligera proyección mandibular; C4, clase III severa con gran proyección mandibular e hipoplasia maxilar; C5, clase III de causa maxilar por un

aumento de su tamaño y C6 que hace referencia a una clase III esquelética moderada con cara corta y altura facial anterior y plano mandibular reducido.

5.6 Aislamiento del ADN y análisis de ligamiento.

Para obtener muestras de saliva de cada individuo, se utilizó el kit ORAgene-DNA OG-500 (DNA Genotek Inc., Ottawa, ON, Canadá). Se extrajo y purificó el ADN genómico de cada muestra siguiendo el protocolo de purificación con prepIT-L2P (DNA Genotek) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De cada 2 mL de saliva recogida por paciente se obtuvieron 110 µg de ADN. Todas las muestras fueron codificadas preservando el anonimato de todos los individuos.

5.7 Genotipado del ADN y análisis de asociación genética.

El genotipado del ADN fue realizado mediante el genotipado multiplexado (Multiplex genotyping) y la espectrometría de masas (Mass Spectrometry). Se seleccionaron un total de 14 genes identificados como susceptibles de desarrollar la maloclusión esquelética de clase III [4, 10, 12, 25, 48, 54, 55, 24, 56, 62, 57, 58, 59, 60, 61, 63] a partir de los cuales se obtuvo una lista de “Tag SNPs” -32 en total. Tras el control de calidad realizado mediante el desequilibrio de ligamiento de Hardy Wimberg se excluyó un SNP por lo que el total de SNPs analizados fue de 31. Para la identificación de los “Tag SNPs”, se usa el desequilibrio de ligamiento (LD). Con el objetivo de amplificar los loci diana, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) -mediante el uso de la enzima Shrimp phosphatase alkaline (SAP)- seguida de la extensión de nucleótido único y la medición de los amplicones mediante espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF) [98].

5.7.1 *Genes candidatos y SNPs*

Un total de 14 genes y 31 SNPs (*Tabla 1*) fueron seleccionados para ser analizados por su implicación en el desarrollo de la maloclusión esquelética de clase III: BMP3, FBN3, IGF2R, TGFB3, GHR, MYO1H, COL1A1, HOXC, MATN1, RUNX2, TWIST1, FGFR2, FGF23 Y FGF10.

Tabla 1. Listado de los 14 genes candidatos y 31 SNPs incluidos en el estudio con sus correspondientes locus cromosómicos y fenotipos craneofaciales o maloclusivos asociados.

SNP	Gen	Locus	Alelo	Asociación fenotípica	Referencia
rs74764079 rs1390319 rs985328 rs4693810 rs1495643	BMP3	4q21.21	T > A, G T > C, G C > A, G, T C > T T > A, G	Hipoplasia maxilar	35-Perillo
rs7351083	FBN3	19p13.2	A > G, T	Crecimiento óseo y regulación de las células madre de la médula espinal.	15-Dehesa, 38-Li C, 97-Davis MR2012
rs2277071	IGF2R	6q25.3	G > A, C, T	Morfología de estructuras craneofaciales: maxilar y mandíbula.	5-Yamaguchi, 89-Marañón-Vásquez GA
rs2205181 rs1012861	TGFB3	14q24.3	C > T C > T	Prognatismo mandibular	60. Li Q 2011
rs1509460 rs2910875 rs2973015	GHR	5p12	T > G G > A, T A > G, T	Morfología mandibular: rs1509460-tamaño mandibular rs2973015-altura facial anterior inferior	52-Tassopoulou-Fishell, 62-Cruz, C. V
rs10850110	MYO1H	12q24.11	G > A, T	PM y discrepancias maxilo-mandibulares.	52-Tassopoulou-Fishell A, 89-Atteri 2021
rs2249492	COL1A1	12q13.13	C > G, T	Anomalías craneofaciales (micrognatia, hipoplasia del tercio medio facial y maloclusión esquelética de clase III) y osteogénesis imperfecta.	92-JungH2021, 93-da Fontaura2015, 94-Shibata2013
rs2677101 rs1997992 rs2396441 rs6458447 rs485817 rs1200425	RUNX2	6p21	C > A, G, T C > T A > G G > A, C, T A > G G > A	Desarrollo y mantenimiento del hueso y del cartilago: diferenciación osteoblástica. Asociación a craneosinostosis, formación ósea ectópica y defectos en las extremidades.	91-Maeno T 2011
rs985246 rs2189000	TWIST1	7p21.2	T > G A > G, T	Síndrome de Saethre-Chotzen: craneosinostosis, hipoplasia maxilar, paladar estrecho, asimetrías faciales con desviación del tabique nasal y paladar hendido	4-Cruz RM, 93-da Fontaura2015, 95-Zhang2012, 96-Carver2002
rs2981578 rs1078806 rs11200014 rs2162540	FGFR2	10q26	C > A, T A > G, T G > A, T C > A, T	Craneosinostosis e hipoplasia/retrognacia maxilar.	4-Cruz RM, 87-Piccione M, 2009
rs7955866 rs11063118 rs3812822	FGF23	12p13.32	G > A T > C, G T > C	Morfogénesis ósea (homeostasis de la vitamina D y del fosfato).	80-Chen F 2015
rs593307	FGF10	5p12	A > C, G, T	Regulador de la formación del cartilago de Meckel.	86-Terao.2011
rs143043350	HOXA2	7p15.2	C > A, T	Desarrollo embrionario.	35-Perillo

5.8 Diseño del pedigree

Las figuras de pedigree de cada familia se llevaron a cabo con el programa Microsoft PowerPoint versión 16.66.1 (*Anexo 10*). Por otro lado, mediante el programa Visual Studio Code junto con Keynote, se llevó a cabo la *Figura 4* -representativa del conjunto de pedigree de las familias incluidas en el estudio.

5.9 Análisis estadístico

Error y precisión del método.

Teniendo en cuenta los elevados errores potenciales de inter e intravariabilidad relacionados con la identificación imprecisa de puntos de referencia cefalométricos [52], una operadora externa y la investigadora principal repitieron 10 radiografías cefalométricas laterales -seleccionadas aleatoriamente- con un intervalo de 3 semanas para evaluar la fiabilidad de localización de puntos de referencia intraexaminador. Una vez trazadas todas, se calculó el error de método (EM) mediante el coeficiente de correlación interclase (CCI) [65].

Se calculó la prueba T de Student para evaluar las diferencias significativas entre ambas mediciones cefalométricas: la original y la replicada. Un valor p superior a 0,05 se consideró como indicador de ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre mediciones.

Además, se utilizó la fórmula de Dahlberg para valorar la exactitud de la reproducibilidad entre los dos conjuntos de mediciones [66]. La fórmula de Dalhberg (*Figura 2*) [25] utilizada es:

$$D = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{d_i^2}{2N}}$$

FIGURA 2. *Fórmula de Dalhberg [65].*

donde d_i hace referencia a la diferencia entre la primera y la segunda medida y N es la muestra total que se ha vuelto a medir. Por lo tanto, como expuesto anteriormente, hace referencia a las 10 radiografías laterales las cuales fueron elegidas aleatoriamente (3 individuos con clase III y 7 sin clase III).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Datos de error del método y de la precisión.

El valor del CCI obtenido fue de 0,998 para el grado de concordancia interexaminador y de 0,999 para el grado de concordancia intraexaminador a la hora de clusterizar (*Anexo 9*) ambos indicando una muy alta fiabilidad. La precisión de reproductibilidad de medidas, calculada mediante la fórmula de Dahlberg, dio un error que oscilaba entre 0.01 (N-ANS/ANS-Me (°)) y 7.52 (SGo (mm)).

6.2. Características descriptivas de la muestra familiar incluida.

Un total de 91 individuos fueron reclutados de 21 familias diferentes. Basándonos en los criterios de diagnóstico anteriormente expuestos, de la totalidad de los sujetos, 46 presentan clase III esquelética y 44 no. La edad oscila entre los 5,5 y 91 años siendo la edad media 47,51 años. Con respecto al sexo, existe un predominio de mujeres con un total de 65 frente a 26 hombres. Con respecto al porcentaje de prevalencia de clase III según el sexo entre los individuos de este estudio, la mayoría de los diagnosticados de esta maloclusión eran mujeres (60,9%).

Todas las familias presentaban tres generaciones con al menos un individuo por cada una y todos los individuos son de origen español sin hacer distinción entre la zona concreta de procedencia. Información más extensa se encuentra recogida en la *Figura 4 y Anexo 4, 5, 10*.

Los números de sujetos estudiados por familia varían entre 3 y 7 siendo la familia con más sujetos estudiados la familia 4 y la 13. La familia 4, junto con la nº 15, presentan el mayor número de sujetos diagnosticados de clase III (4 sujetos) (*Figura 4 y Anexo 4, 5, 10*).

TABLA 2. Características cefalométricas descriptivas de la muestra dividida por familias y sujetos con clase III y sujetos control.

	Familia I (n=3)	Familia II (n=5)	Familia III (n=3)	Familia IV (n=7)	Familia V (n=3)	Familia VI (n=5)	Familia VII (n=5)	Familia VIII (n=4)	Familia IX (n=6)	Familia X (n=3)	Familia XI (n=5)											
	Clase III	Control	Clase III	Control	Clase III	Control	Clase III	Control	Clase III	Control	Clase III	Control										
SKELETAL ANGULAR																						
FH - SN (°)	11,9	n.a.	7,7	11,7	12,6	n.a.	11,9	13,2	15,4	13,2	9,1	11,2	10,2	11,3	9,8	14,6	9,6	11,5	13,6	13,4	10,2	11,6
SNA (°)	76,7	n.a.	83,2	81,8	79,9	n.a.	75,7	77,1	82,8	80,3	78,6	82,9	82,0	83,8	80,5	78,9	81,8	81,4	76,6	83,4	79,2	82,0
SNB (°)	76,5	n.a.	85,4	76,6	81,6	n.a.	78,3	73,3	82,6	77,9	80,2	79,5	84,0	79,5	84,5	74,8	83,4	75,9	78,1	78,8	80,5	76,2
ANB (°)	1,3	n.a.	-3,6	5,2	-1,6	n.a.	-3,4	3,8	0,3	2,4	-0,6	3,5	-2,1	4,3	-4,0	4,2	-1,6	5,5	-1,6	4,6	-1,4	5,8
SND (°)	75,1	n.a.	82,2	74,0	79,2	n.a.	77,4	72,2	80,7	75,8	78,7	77,3	82,8	77,9	82,5	73,3	80,9	75,0	75,4	75,0	78,5	74,6
Y-Axis (SgN-SN) (°)	71,7	n.a.	60,6	69,4	65,5	n.a.	67,4	73,1	67,4	70,5	66,4	68,5	63,7	68,2	63,8	70,9	62,9	71,0	73,0	72,4	68,7	71,4
SN - GoGn (°)	32,2	n.a.	21,5	27,5	31,0	n.a.	35,8	35,4	31,9	31,6	28,5	31,9	29,6	27,6	27,2	36,7	32,9	35,2	43,7	38,0	33,2	33,3
Crano-Mx Base/SN-Palatal Plane (°)	11,0	n.a.	3,3	7,1	8,2	n.a.	11,6	12,8	14,4	12,1	12,0	8,2	9,3	8,7	4,7	4,6	9,8	6,9	10,8	10,3	6,7	11,9
Oce Plane to SN (°)	20,9	n.a.	11,0	16,9	17,3	n.a.	17,2	17,7	19,1	19,7	11,6	17,7	15,5	15,9	9,5	15,2	15,4	17,8	23,4	16,2	15,7	23,7
Oce Plane to FH (°)	9,0	n.a.	8,0	5,2	4,7	n.a.	5,4	4,5	3,7	6,5	2,5	6,5	5,2	4,6	-0,4	0,5	5,8	6,4	9,8	2,8	5,5	12,1
Facial Axis-Ricketts (NaBa-PrGn)(°)	87,9	n.a.	99,0	90,3	93,5	n.a.	91,9	87,6	89,9	86,9	91,0	88,9	91,5	89,0	94,6	87,6	96,3	89,3	86,4	86,3	90,7	87,8
FMA (MP-FH) (°)	22,1	n.a.	17,5	20,0	20,7	n.a.	26,2	26,0	19,5	21,6	21,7	24,0	21,3	18,5	18,6	25,2	24,8	27,1	32,0	27,3	25,5	23,9
Lower Face Height (ANS-Xi-Pm)(°)	45,2	n.a.	36,5	43,0	40,5	n.a.	42,4	43,6	39,0	40,9	43,0	44,7	42,5	42,7	42,3	50,1	38,8	47,5	47,9	45,5	47,9	43,8
Facial Angle (FH-NPo) (°)	90,1	n.a.	93,9	89,5	95,1	n.a.	92,9	88,7	99,1	91,9	90,7	91,6	95,7	92,5	95,6	90,7	94,1	89,2	91,2	90,7	91,4	89,0
N-A-Pg (°)	-0,7	n.a.	-8,6	13,4	-3,5	n.a.	-11,2	3,8	-1,8	3,4	-6,3	5,1	-7,5	5,3	-11,4	5,5	-5,9	6,9	-2,1	12,3	-4,1	10,3
Facial Taper (°)	67,8	n.a.	68,6	70,6	64,2	n.a.	60,9	65,5	61,4	66,5	67,5	64,5	63,1	69,1	65,8	64,2	61,1	63,7	56,8	61,9	63,1	67,1
Gonial/Jaw Angle (Ar-Go-Me) (°)	116,8	n.a.	121,8	117,1	126,2	n.a.	131,8	126,3	124,1	126,3	119,5	123,9	127,7	114,0	129,7	135,8	139,0	128,1	129,1	134,9	131,5	123,7
Upper Gonial Angle (Ar-Go-Na) (°)	43,6	n.a.	54,9	47,8	52,4	n.a.	56,1	49,8	46,6	49,4	47,8	47,9	53,3	43,4	56,1	54,1	63,1	49,8	47,0	52,9	53,1	47,1
Lower Gonial Angle (Na-Go-Me) (°)	73,2	n.a.	67,2	69,3	73,8	n.a.	75,7	76,5	77,5	76,9	71,7	76,0	74,5	70,6	73,6	81,7	75,9	78,2	82,2	82,0	78,4	76,6
Articular Angle (°)	147,2	n.a.	139,2	143,4	146,3	n.a.	138,3	141,8	148,0	137,8	147,5	148,5	142,9	149,3	129,2	141,9	130,0	140,9	152,0	134,7	133,0	152,2
Saddle/Sella Angle (SN-Ar) (°)	130,0	n.a.	124,3	131,2	120,8	n.a.	128,0	131,1	122,8	130,7	123,9	122,9	120,9	126,5	129,6	122,2	125,3	129,6	124,4	131,1	131,2	119,6
Superior Angle SN-AB (°)	75,9	n.a.	88,9	70,2	84,7	n.a.	82,1	67,1	81,7	74,3	82,5	74,7	87,0	73,5	90,7	69,9	86,0	68,9	80,2	72,5	82,3	65,4
Rp-FH (°)	85,3	n.a.	75,8	82,9	74,5	n.a.	74,4	79,7	75,4	75,3	82,2	80,1	73,5	84,5	68,9	69,5	65,8	79,0	82,9	72,4	74,0	80,2
SKELETAL LINEAR																						
Anterior Cranial Base (SN) (mm)	63,4	n.a.	68,6	62,7	68,7	n.a.	69,8	68,8	65,4	63,9	68,0	66,1	61,3	66,0	70,6	67,0	67,9	71,3	63,1	62,8	63,2	63,3
Anterior Face Height (NaMe) (mm)	117,6	n.a.	105,8	106,0	114,7	n.a.	117,8	122,8	120,8	114,6	115,9	116,6	103,3	118,1	121,6	114,0	109,0	126,3	119,4	116,2	114,1	113,6
Upper Face Height (N-ANS) (mm)	51,5	n.a.	48,7	47,0	53,5	n.a.	54,1	57,7	57,4	54,2	53,1	51,5	46,3	53,5	53,2	47,5	51,8	53,8	50,9	53,2	48,6	54,8
Lower Face Height (ANS-Me) (mm)	67,0	n.a.	58,0	62,6	61,5	n.a.	64,1	67,0	65,6	63,4	63,5	67,6	57,8	67,9	69,7	68,7	57,5	75,5	70,2	66,4	66,5	61,5
Posterior Cranial Base (S-Ar) (mm)	32,3	n.a.	33,4	30,6	33,9	n.a.	33,8	34,0	31,1	30,1	31,4	29,8	30,7	31,6	37,2	30,7	32,3	32,3	27,3	30,8	31,2	37,1
Posterior Face Height (SGo) (mm)	78,3	n.a.	74,9	71,0	73,7	n.a.	70,0	75,9	78,2	76,5	77,4	74,2	68,6	81,5	84,9	71,7	67,7	78,7	65,2	71,9	74,1	74,8
Ramus Height (Ar-Go) (mm)	49,2	n.a.	46,6	44,1	43,3	n.a.	41,2	46,3	50,4	51,5	49,1	47,1	41,7	52,6	56,4	45,1	42,2	51,3	40,2	46,9	49,3	40,0
Co-Go (mm)	64,9	n.a.	54,1	54,3	58,9	n.a.	55,3	61,6	67,0	58,7	61,6	63,1	54,0	68,0	63,2	54,3	54,2	60,6	51,7	51,6	58,7	63,4
Convexity (A-NPo) (mm)	1,2	n.a.	-3,9	3,0	-2,7	n.a.	-5,6	1,8	-0,8	1,6	-3,0	2,4	-3,2	2,9	-5,4	2,5	-2,6	3,6	-1,0	5,9	-2,0	4,8
Maxillary Skeletal (A-Na Perp) (mm)	0,7	n.a.	2,0	4,3	2,3	n.a.	-3,0	0,4	8,3	3,4	-2,1	4,0	2,3	5,1	0,4	3,0	1,3	2,7	0,2	6,7	-0,8	3,8
Midface Length (Co-A) (mm)	78,3	n.a.	82,1	78,2	86,3	n.a.	84,9	85,4	82,5	78,7	80,5	83,0	74,7	83,3	87,9	77,9	86,5	88,0	75,5	80,5	78,1	80,3
Ar - A (mm)	77,3	n.a.	85,1	80,6	81,5	n.a.	82,1	84,9	81,7	80,8	80,1	81,2	74,3	84,5	89,4	77,8	83,7	89,0	72,9	83,3	79,1	78,4
Maxillary length (ANS-PNS) (mm)	47,7	n.a.	49,5	52,2	49,4	n.a.	46,5	52,2	53,0	49,2	50,5	54,3	45,8	53,4	60,9	55,3	48,6	56,6	48,9	48,3	47,8	57,9
Pog - NB (mm)	3,2	n.a.	1,4	3,3	1,7	n.a.	5,3	4,2	2,4	1,4	2,6	1,9	2,6	3,0	2,7	2,5	2,0	3,8	-1,0	-2,9	1,4	2,5
Mand. Skeletal (Pg-Na Perp) (mm)	0,7	n.a.	6,9	0,1	8,6	n.a.	5,9	-2,7	17,7	3,6	1,7	3,2	10,0	4,7	10,9	1,1	7,3	-2,0	2,5	1,4	2,6	-1,9
Mandibular Body Length (Go-Gn)(mm)	79,1	n.a.	82,1	74,7	81,5	n.a.	87,2	80,1	84,5	72,0	81,4	77,9	75,4	82,2	83,9	66,2	79,0	81,6	81,4	70,6	75,0	70,8
Length of Mand Base (Go-Pg)(mm)	70,4	n.a.	76,8	66,2	75,6	n.a.	80,9	72,5	74,5	70,9	75,1	69,2	69,5	72,2	81,5	64,9	74,2	75,7	76,6	69,4	71,0	58,5
Mandibular length (Co-Gn)(mm)	114,5	n.a.	110,4	100,2	117,3	n.a.	121,7	116,0	121,9	108,8	115,9	116,3	107,4	115,9	126,8	106,1	117,5	119,2	114,9	106,7	113,9	105,8
Co-BI Total mand (mm)	110,3	n.a.	108,3	98,4	114,6	n.a.	119,1	113,3	118,7	107,3	113,6	112,8	105,3	113,3	123,9	104,4	114,7	117,4	112,3	105,1	111,6	104,5
Ar - Gn (mm)	106,4	n.a.	109,5	97,9	106,8	n.a.	113,0	108,2	114,0	105,4	110,0	107,8	101,3	109,9	123,9	99,3	109,3	114,6	106,4	104,5	109,0	94,4
Basal Width (mm)	6,3	n.a.	7,0	6,7	7,5	n.a.	5,3	5,2	5,8	4,7	6,4	5,4	5,2	5,6	7,3	5,3	5,4	5,1	3,9	7,2	6,2	6,7
Mx/Md diff (Co-Gn - Co-A)(mm)	36,3	n.a.	28,4	21,9	31,0	n.a.	36,8	30,6	39,5	30,1	35,4	33,3	32,7	32,6	38,9	28,2	31,0	31,2	39,5	26,3	35,9	25,5
Wits Appraisal (mm)	-4,5	n.a.	-5,3	1,9	-6,9	n.a.	-7,8	3,5	-7,3	-2,5	-3,1	-1,9	-7,5	0,5	-6,8	3,8	-6,7	2,6	-10,1	0,9	-5,9	0,5
SKELETAL PROPORTIONAL																						
P-A Face Height (S-Go/N-Me) (%)	66,6	n.a.	70,5	66,8	64,7	n.a.	59,4	61,8	64,9	66,7	66,8	63,8	66,6	69,2	69,8	61,5	62,1	62,4	54,6	61,9	65,1	65,9
PFH/AFH (%)	55,2	n.a.	50,7	50,8	51,9	n.a.	46,8	50,1	55,4	51,2	52,2	54,1	52,2	57,7	51,8	47,7	49,7	48,1	43,2	44,4	51,6	55,8
S-Ar/Ar-Go (%)	65,8	n.a.	72,6	71,9	78,4	n.a.	83,4	75,5	63,6	58,4	64,4	63,5	74,0	59,9	67,4	68,1	76,5	63,8	68,6	65,7	63,7	92,9
UFH (N-ANS)(N-ANS+ANS-Me) (%)	43,5	n.a.	45,8	42,7	46,7	n.a.	45,8	46,3	46,7	46,1	45,7	43,3	44,3	43,9	43,6	40,9	47,4	41,7	42,0	44,5	42,3	47,1
LFH/TFH (ANS-Me/N-Me) (%)	56,3	n.a.	54,2	56,8	53,5	n.a.	54,2	53,0	54,3	53,8	54,1	56,9	55,9	56,3	56,7							

	Familia XII (n=5)		Familia XIII (n=7)		Familia XIV (n=3)		Familia XV (n=4)		Familia XVI (n=4)		Familia XVII (n=4)		Familia XVIII (n=3)		Familia XIX (n=4)		Familia XX (n=3)		Familia XXI (n=5)		
	Class III	Control	Class III	Control	Class III	Control	Class III	Control	Class III	Control	Class III	Control	Class III	Control	Class III	Control	Class III	Control	Class III	Control	
SKELETAL ANGULAR																					
FH - SN (°)	15,1	12,8	11,2	13,5	9,5	n.a.	6,1	11,2	10,0	n.a.	8,25	10,6	11,2	9,5	14,1	14,2	8,6	14,1	9,4	8,4	
SNA (°)	74,9	78,7	80,2	78,7	83,8	n.a.	93,0	84,0	76,9	n.a.	78,7	79,75	80,2	81,85	76,3	77,1	79,8	73,6	83,4	85,4	
SNB (°)	76,6	73,7	80,7	75,6	84,2	n.a.	93,3	80,8	75,9	n.a.	82,6	75,8	82,7	80	76,6	74,5	81,4	69,9	82,0	81,9	
ANB (°)	-1,7	5,0	-0,5	3,1	-0,5	n.a.	-0,4	3,1	0,9	n.a.	-3,85	3,95	-2,5	1,9	-0,4	2,7	-1,6	3,7	1,4	3,5	
SND (°)	75,0	72,2	79,6	74,2	82,1	n.a.	90,7	78,7	73,9	n.a.	82,35	74,1	80,6	78,05	75,1	72,6	80,7	69,2	81,1	80,3	
Y-Axis (SGn-SN) (°)	70,3	73,0	65,9	70,2	64,4	n.a.	57,8	66,7	74,0	n.a.	63,85	69,95	67,2	68,05	69,3	73,6	64,5	77,0	64,8	63,7	
SN - GoGn (°)	43,0	37,1	31,6	33,3	27,0	n.a.	17,3	25,3	39,1	n.a.	24,05	30,25	28,7	23,95	27,8	37,3	26,8	44,0	28,1	25,9	
Cranio-Mx Base/SN-Palatal Plane (°)	9,3	12,1	6,5	9,4	11,0	n.a.	-0,1	6,6	12,9	n.a.	7,45	9,85	10,1	9,95	12,3	13,4	10,1	13,0	5,8	3,2	
Oce Plane to SN (°)	19,0	19,5	15,4	19,4	14,0	n.a.	2,2	10,5	19,9	n.a.	7,2	18,45	15,3	15,45	27,1	25,2	8,8	25,2	12,0	10,3	
Oce Plane to FH (°)	3,8	6,7	4,2	5,9	4,6	n.a.	-3,9	-0,7	10,0	n.a.	0,4	7,85	4,1	5,95	13,0	9,3	0,2	11,2	2,6	1,8	
Facial Axis-Ricketts (NaBa-PtGn) (°)	94,1	87,8	92,5	88,6	93,5	n.a.	99,9	88,5	85,2	n.a.	94,4	88	92,7	92,6	90,7	87,7	93,0	83,7	94,0	96,7	
FMA (MP-FH) (°)	28,7	26,3	22,6	22,5	19,6	n.a.	14,6	16,5	31,6	n.a.	18,05	23,55	20,8	17,85	18,1	26,4	20,5	34,5	21,6	20,9	
Lower Face Height (ANS-Xi-Pm) (°)	46,1	46,9	42,2	45,5	40,5	n.a.	39,2	42,7	49,5	n.a.	45,1	43,6	44,5	40,85	41,8	47,5	42,5	50,3	46,5	43,3	
Facial Angle (FH-NPo) (°)	93,5	88,2	93,7	90,1	94,8	n.a.	98,9	93,3	86,6	n.a.	93,5	88,05	94,8	91,4	92,4	89,1	92,6	86,1	93,5	91,9	
N-A-Pg (°)	-6,8	6,6	-4,9	4,1	-3,1	n.a.	0,4	3,8	0,5	n.a.	-14,1	4,8	-6,6	3	-4,4	4,5	-8,7	3,3	-1,8	3,8	
Facial Taper (°)	57,8	65,5	63,7	67,4	65,6	n.a.	66,5	70,2	61,8	n.a.	68,45	68,4	64,4	70,75	69,6	64,7	66,9	59,5	64,9	67,3	
Gonial/Jaw Angle (Ar-Go-Me) (°)	130,7	127,8	123,2	128,0	124,6	n.a.	116,8	118,9	134,1	n.a.	127,2	124,65	118,7	116,05	117,7	126,3	113,3	138,8	134,1	124,7	
Upper Gonial Angle (Ar-Go-Na) (°)	51,3	49,8	50,4	52,8	52,0	n.a.	47,1	48,1	50,4	n.a.	52,25	49,7	46,1	46,35	46,2	49,3	44,3	53,1	54,2	52,7	
Lower Gonial Angle (Na-Go-Me) (°)	79,4	77,9	72,7	75,2	72,6	n.a.	69,7	70,8	83,8	n.a.	74,95	75	72,6	69,65	71,6	77,1	69,0	85,7	79,9	72,0	
Articular Angle (°)	143,2	134,6	144,9	138,4	138,8	n.a.	155,8	140,1	134,4	n.a.	136,7	142,6	143,8	140,15	148,8	132,8	155,2	128,3	135,6	142,5	
Saddle/Sella Angle (SN-Ar) (°)	129,8	136,8	125,8	129,6	125,7	n.a.	108,0	128,7	133,0	n.a.	122,4	126,9	129,6	131,15	125,7	141,4	120,6	141,5	121,3	122,1	
Superior Angle SN-AB (°)	78,6	66,7	81,5	71,3	84,7	n.a.	93,9	76,2	74,6	n.a.	88,65	69,85	86	77,05	77,0	71,0	83,7	64,6	80,2	77,3	
Rp-FH (°)	78,0	78,5	79,4	74,5	75,0	n.a.	77,8	77,6	77,5	n.a.	70,9	78,9	82,1	81,8	80,4	80,0	87,2	75,7	67,6	76,2	
SKELETAL LINEAR																					
Anterior Cranial Base (SN) (mm)	66,1	66,8	72,1	71,2	63,2	n.a.	68,8	68,8	66,9	n.a.	70,3	73,25	77,2	70,1	70,9	72,3	73,1	72,2	75,2	75,4	
Anterior Face Height (NaMe) (mm)	115,4	119,9	122,2	120,0	109,8	n.a.	116,5	120,5	127,4	n.a.	120,1	125,1	143,4	127,2	121,5	130,0	122,8	132,7	130,9	122,3	
Upper Face Height (N-ANS) (mm)	48,4	54,0	53,1	53,5	49,2	n.a.	49,9	54,1	57,1	n.a.	55,1	58,45	61,8	60,5	55,8	57,6	54,4	58,7	57,6	52,9	
Lower Face Height (ANS-Me) (mm)	69,8	69,2	70,7	69,4	62,0	n.a.	67,4	69,3	72,5	n.a.	65,7	69,4	82,5	68,25	68,4	75,1	68,8	76,7	74,9	73,5	
Posterior Cranial Base (S-Ar) (mm)	24,1	28,4	33,0	33,7	32,6	n.a.	40,3	33,9	32,1	n.a.	37,6	33,75	37,7	38	34,1	30,1	34,2	28,5	40,4	34,7	
Posterior Face Height (SGo) (mm)	62,6	74,8	76,9	76,6	75,6	n.a.	87,7	85,9	80,8	n.a.	88,9	82,8	93,9	91,7	81,4	79,1	83,1	74,3	93,5	83,0	
Ramus Height (Ar-Go) (mm)	41,6	52,1	47,6	48,5	48,0	n.a.	49,4	57,2	55,2	n.a.	58,2	53,65	60,7	59,3	50,8	55,4	50,8	53,1	60,4	52,8	
Co-Go (mm)	56,2	62,0	63,9	58,6	59,1	n.a.	68,2	69,5	63,8	n.a.	73,75	63,35	82,4	72,9	67,4	66,3	65,4	62,2	68,7	65,3	
Convexity (A-NPo) (mm)	-3,2	3,4	-2,4	2,1	-1,4	n.a.	0,2	1,9	1,5	n.a.	-6,95	2,5	-3,9	0	-1,7	2,5	-4,3	1,8	-0,7	2,0	
Maxillary Skeletal (A-Na Perp) (mm)	0,0	1,4	1,5	2,1	2,9	n.a.	8,9	5,1	-3,4	n.a.	-3,25	0,35	1,7	1,55	0,6	1,4	-1,7	-2,7	3,3	3,5	
Midface Length (Co-A) (mm)	76,5	83,5	90,1	85,5	80,5	n.a.	89,2	89,0	83,4	n.a.	84,4	87,6	98	90,35	84,4	91,1	86,5	88,5	92,6	94,3	
Ar - A (mm)	75,0	84,9	87,4	86,7	80,9	n.a.	86,1	89,6	83,5	n.a.	82,6	89,25	97,1	92,9	83,0	92,5	84,9	87,7	92,8	93,5	
Maxillary length (ANS-PNS) (mm)	50,5	56,5	54,9	56,7	49,1	n.a.	61,7	55,7	54,6	n.a.	57,65	58,9	63,9	59,15	54,0	56,6	53,2	54,0	58,8	64,1	
Pog - NB (mm)	3,4	3,4	3,5	2,1	2,0	n.a.	-1,0	2,7	1,5	n.a.	5,35	3,55	2	3,95	3,2	1,0	5,1	4,6	4,6	3,0	
Mand. Skeletal (Pg-Na Perp) (mm)	6,6	-4,1	7,4	0,1	8,4	n.a.	16,3	6,4	-7,4	n.a.	6,3	-4,1	11,3	2,9	4,2	-2,2	5,2	-8,7	7,8	3,1	
Mandibular Body Length (Go-Gn) (mm)	82,7	74,6	90,8	76,4	78,5	n.a.	87,3	81,7	74,6	n.a.	75,5	78,8	104,3	87,95	81,3	84,8	94,3	78,4	81,6	85,6	
Length of Mand Base (Go-Pg) (mm)	75,5	70,1	82,4	71,4	76,2	n.a.	76,5	77,3	71,5	n.a.	67,65	74,2	90,8	78,95	70,4	76,0	86,8	72,6	82,4	80,5	
Mandibular length (Co-Gn) (mm)	119,7	115,1	127,6	114,2	114,2	n.a.	124,8	122,2	121,0	n.a.	125,35	117,3	147,6	124,7	117,3	125,2	124,1	123,2	132,1	125,5	
Co-BI Total mand (mm)	113,6	113,1	123,7	111,7	112,0	n.a.	118,9	120,4	118,2	n.a.	121,5	115,3	145,1	123,1	114,7	122,9	122,0	120,9	129,7	124,1	
Ar - Gn (mm)	110,7	110,8	118,4	109,6	108,3	n.a.	114,8	116,6	115,4	n.a.	117,6	113,3	138,2	120,95	109,5	121,5	116,1	117,4	125,5	118,9	
Basal Width (mm)	6,0	7,2	4,1	5,3	6,6	n.a.	4,9	5,5	7,2	n.a.	4,7	8	7,1	3,95	8,1	7,9	4,8	4,4	7,1	10,0	
Mx/Md diff (Co-Gn - Co-A) (mm)	43,2	31,5	37,6	28,7	33,6	n.a.	35,5	33,2	37,6	n.a.	40,95	29,7	49,7	34,35	33,0	34,2	37,6	34,7	39,4	31,1	
Wits Appraisal (mm)	-5,6	2,9	-4,9	-0,6	-5,7	n.a.	-4,0	2,4	-3,4	n.a.	-7,2	1,25	-9,9	-1,85	-9,6	-5,1	-1,9	0,2	-2,0	1,8	
SKELETAL PROPORTIONAL																					
P-A Face Height (S-Go/N-Me) (%)	54,2	62,4	62,9	63,7	68,9	n.a.	75,3	71,4	63,2	n.a.	74,2	66,35	65,5	72,15	66,8	60,8	67,6	56,1	72,0	68,2	
PFH:AFH (%)	48,7	51,7	52,3	48,7	53,8	n.a.	58,6	57,9	49,9	n.a.	61,7	50,7	57,5	57,3	55,2	50,9	53,2	46,9	53,2	53,5	
S-Ar/Ar-Go (%)	57,8	54,1	69,3	72,5	70,0	n.a.	81,7	59,3	59,1	n.a.	65,9	63	62,1	64,45	67,3	55,7	67,3	53,5	67,7	65,8	
UFH (N-ANS/(N-ANS+ANS-Me)) (%)	40,9	43,9	42,9	43,5	44,2	n.a.	42,5	43,7	44,1	n.a.	45,7	45,7	42,8	47	45,1	43,4	44,2	43,4	43,4	41,8	
LFH/TH (ANS-Me:N-Me) (%)	59,5	55,6	57,3	56,3	56,0	n.a.	58,3	56,8	55,1	n.a.	54,45	53,5	57,5	52,9	55,0	56,2	55,7	55,8	56,9	58,7	
Face Ht Ratio (N-ANS/ANS-Me) (%)	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	n.a.	0,7	0,8	0,8	n.a.	0,85	0,85	0,7	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	
SN/GoMe (%)	90,9	99,3	92,1	105,0	87,9	n.a.	91,1	94,3	99,6	n.a.	111,4	105,9	87,3	93,75	107,8	101,0	90,5	103,5	96,0	98,5	
ANS-PNS/Me-Go (%)	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	n.a.	0,8	0,7	0,8	n.a.	0,95	0,85	0,7	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,9	

La familia 11 (*Figura 3*) actúa como un claro ejemplo del modo de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta que presenta este síndrome. Sin embargo, cabe destacar la diferencia fenotípica de la maloclusión intrafamiliarmente: mientras que el individuo LC11.41 presenta una clase III leve de causa mandibular con patrón braquifacial (clúster 4 [33]), su hijo -LC11.40- presenta una clase III de causa maxilar con birretrusión (clúster 2 [33]), su hija -LC11.50- presenta una clase III severa de causa mixta y su nieta -LC11.42- una clase III también de causa mixta.

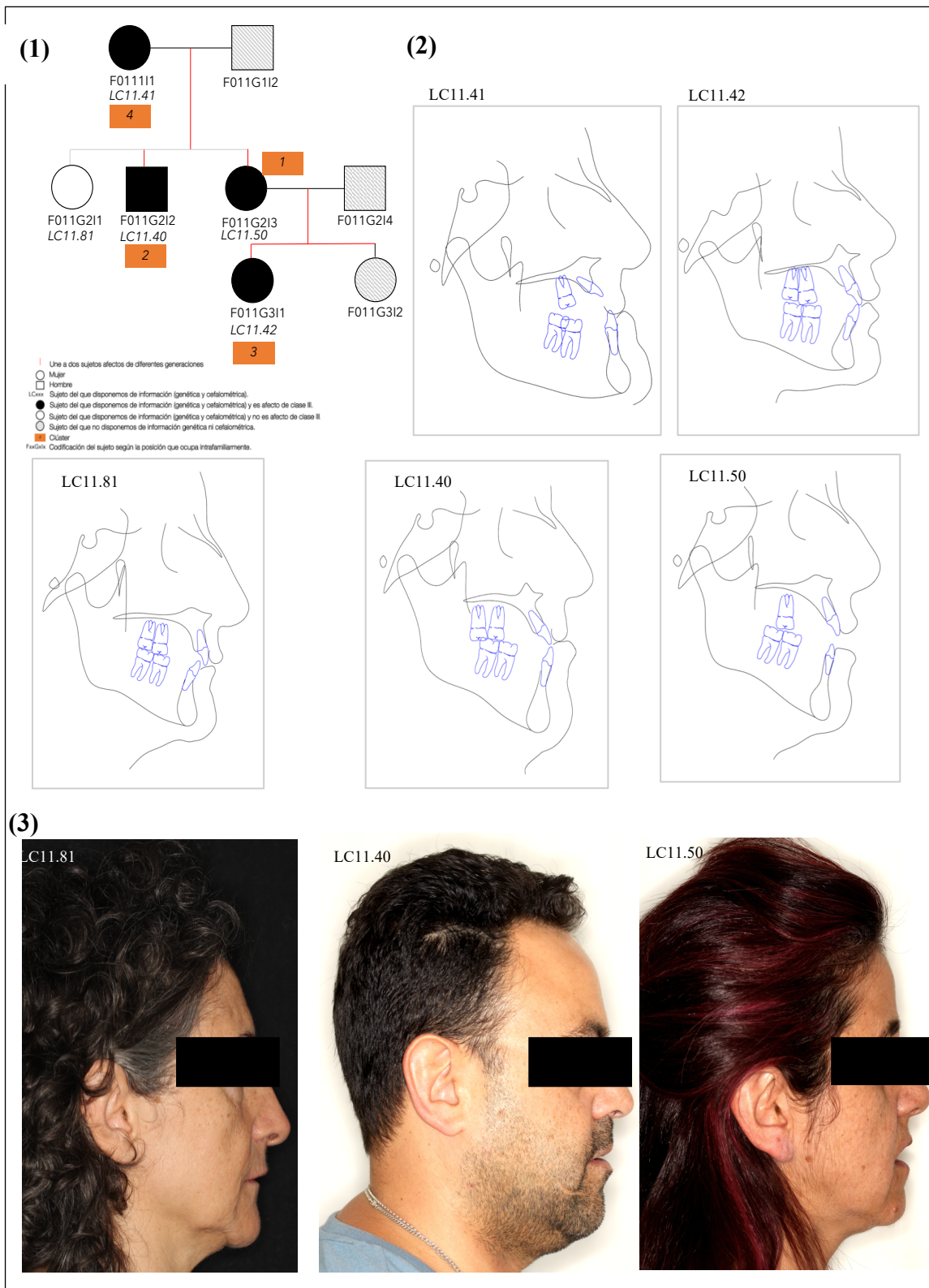


FIGURA 3. Representación gráfica de la familia 11 (1) Pedigrí (2) Trazado cefalométrico de cada individuo (3) Foto de perfil de los individuos de la 2º generación.

6.3. Valores craneométricos de la muestra familiar incluida.

Un total de 89 cefalometrías fueron trazadas con el objetivo de identificar, en cada una, un total de 54 medidas cefalométricas -23 angulares, 23 distancias y 8 medidas proporcionales- (*Anexo 6, Anexo 7 y Tabla 2*) para realizar un diagnóstico dicotómico de los sujetos (presencia o ausencia de clase III esquelética) y la posterior subclusterización [33, 32] de aquellos individuos afectados de dicha maloclusión.

El valor medio de ANB de la muestra total fue de 1.53° . El individuo LC2.06 presentó el mayor valor (ANB: $11, 2^\circ$) -diagnosticado con clase II esquelética de causa mixta- y LC4.18 el menor valor (ANB: $-8, 2^\circ$) -diagnosticado de clase III esquelética de causa maxilar con birretrusión (clúster 2). Con respecto a la valoración de Wits, el valor medio fue de $-2,39$ mm. El sujeto que presentó el mayor valor fue LC12.71 con un valor de 6.8 mm e igual que con los valores ANB, LC4.18 presentó el menor valor ($-17,2$ mm).

Con respecto a la muestra de los individuos afectados de clase III (*Tabla 3*), el valor promedio de ANB fue de $-1, 145^\circ$ y el sujeto con el valor menor fue LC4.18 (ANB: $-8, 2^\circ$). Con respecto al valor de Wits, el valor medio fue de $-5,94$ mm y el sujeto con el valor menor fue también LC4.18 ($-17,2$ mm). Por otro lado, cabe destacar que el 35,5% de los individuos presenta un patrón dolicofacial, el 4,2% un patrón mesodolicofacial, el 17,2% un patrón mesofacial, el 10,7% un patrón mesobraquifacial y el 32,4% braquifacial. Información más extensa se encuentra recogida en la *Tabla 2 y 3*.

TABLA 3. Variables cefalométricas de los sujetos diagnosticados de clase III esquelética. (1) Individuo diagnosticado de clase III esquelética según los criterios establecidos (2) Edad del individuo en años. (3) SNA (°) (4) SNB (°) (5) ANB (°) (6) Valoración de Wits (mm). (7) Plano mandibular (°) (8) Clúster según la clasificación de Leixure et al. [32, 33]

SUJETO	EDAD	SNA (°)	SNB (°)	ANB (°)	WITS (mm)	PLANO MANDIBULAR (°)	CLUSTER	
							18-Frutos-Valle: novel-Subclustering	33-Frutos-Valle: Subclustering 2020
LC1.01	66	78,9	75,8	3,1	-4,5	30,6	6	4
LC1.02	39	77,7	78,2	-0,5	-8,9	31,2	3	3
LC1.03	84	73,5	75,5	-2,0	-0,7	34,9	3	3
LC2.04	10	80,5	81,1	-0,6	-4,5	25,3	6	4
LC2.07	41	85,9	89,6	-3,6	-6	17,6	6	4
LC3.09	23	83,2	84,8	-1,6	-4,1	28,3	4	3
LC3.10	62	83,5	86,7	-3,1	-9,3	27,9	6	4
LC3.11	77	73	73,4	-0,4	-7,3	36,7	4	3
LC4.15	19	75,8	76,7	-0,9	-2,9	37,1	2	2
LC4.16	16	76,4	77,4	-1,1	-2,2	33,5	6	3
LC4.17	17	72,5	72,6	-0,1	-4,1	40,9	1	2
LC4.18	20	78,2	86,4	-8,2	-17,2	31,7	1	2
LC5.20	19	83	85,1	-2,1	-12	33,8	4	2
LC5.21	43	82,6	80	2,6	-2,6	29,9	5	3
LC6.23	20	77,2	81,1	-3,9	-12,2	35,6	3	2
LC6.24	18	79,5	80,3	-0,8	-1,9	23,6	3	3
LC6.27	56	79	79,3	-0,3	4,7	26,2	6	4
LC7.28	19	82	83,7	-1,7	-8,3	32,1	3	3
LC7.55	16	81,9	84,3	-2,4	-6,7	27	6	4
LC8.31	18	79,7	87,8	-8,1	-11,3	25,5	6	4
LC8.72	50	81,2	81,1	0,1	-2,3	28,5	6	4
LC9.34	14	81,8	83,4	-1,6	-6,7	32,9	4	3
LC10.37	26	78,8	79	-0,2	-11,1	44,5	1	1
LC10.38	45	74,3	77,2	-2,9	-9,1	42,9	4	3
LC11.40	49	78,9	82,5	-3,6	-9,2	35,9	2	2
LC11.41	86	78,9	85,7	-6,8	-5,7	24,6	6	4
LC11.42	19	83,7	79,5	4,2	-0,9	30,4	5	3
LC11.50	52	75,1	74,3	0,8	-7,9	41,9	2	1
LC12.43	22	74,9	76,6	-1,7	-5,6	43	4	1
LC13.46	19	80,2	80,7	-0,5	-4,9	31,6	5	3
LC14.51	15	84,3	84,4	-0,1	-5,2	30,8	5	4
LC14.52	53	83,6	86	-2,4	-7,8	21,5	6	4
LC14.53	78	83,4	82,2	1,1	-4	28,7	4	4
LC15.56	24	93	93,3	-0,4	-4	17,3	4	4
LC16.59	51	71,2	72,5	-1,3	-3,7	41,6	1	1
LC16.60	14	78,4	74,3	4	-2,5	46,5	2	1
LC16.61	16	78,2	75,3	2,8	-1,2	37,1	2	1
LC16.62	78	79,7	81,5	-1,9	-6,3	31,1	5	3
LC17.64	19	85,2	88,7	-3,5	-7,2	17,7	5	3
LC17.66	85	72,2	76,5	-4,2	**	30,4	5	4
LC18.68	29	80,2	82,7	-2,5	-9,9	28,7	6	4
LC19.73	15	73,4	76,4	-3	-15,1	28,1	5	4
LC19.76	44	79,1	76,8	2,3	-4	27,4	5	3
LC20.78	20	79,8	81,4	-1,6	-1,9	26,8	5	4
LC21.86	55	88,2	84,9	3,2	-3,7	40	1	1
LC21.87	58	78,5	79	-0,5	-0,2	16,1	6	4

6.4. *Subclustering* de la muestra familiar incluida

Mediante un análisis predictivo discriminante, todos los individuos afectados fueron agrupados en diferentes subclusters. Basándonos en los valores cefalométricos de cada sujeto, se predice a que subcluster es más probable que pertenezca cada individuo (*Tabla 2*).

El clúster más frecuente ha sido el C4 representando una clase III esquelética de causa mandibular correspondiendo a un 39,13% de la muestra. El segundo más frecuente ha sido el C3 con una representación del 32,61% de la muestra. Sin embargo, el clúster menos frecuente ha sido el C2 correspondiendo a un 13,04% de la muestra. Este hace referencia a una clase III de causa maxilar con birretrusión.

En comparativa con la muestra de sujetos españoles estudiada por Frutos-Valle L y cols [4] el clúster más predominante fue el C3 y el menos el C1. Dicha discrepancia puede deberse, y por lo tanto para tener en cuenta, a que el 43.5% de los sujetos que forman parte de la muestra estudiada son candidatos para someterse a cirugía ortognática (Wits < -5,8 mm).

De entre el total de las 21 familias estudiadas, se identificaron únicamente 4 familias donde la totalidad de sujetos analizados presentaban un diagnóstico positivo de clase III (Familia 1, 3, 14 y 16). Sin embargo, únicamente en la Familia 14, dichos sujetos fueron subclusterizados en el mismo clúster (C4). En la Familia 1 y 3 fueron subclusterizados entre C3 -Clase III mixta- (LC1.01, LC1.02, LC3.09, LC3.11) y C4 -Clase III leve de causa mandibular- (LC1.03, LC3.10), en la Familia XVI entre C1 -Clase III severa de causa mixta- (LC16.59, LC16.60 y LC16.61) y C3 -Clase III de causa mixta- (LC16.62) y, por último, la familia 11 que presentaba la mayor heterogeneidad pudiéndose observar un ejemplo de cada clúster: LC11.41 (C4), LC11.42 (C3), LC11.40 (C2) y LC11.50 (C1).

La presencia de un mismo subcluster entre individuos de diferentes generaciones intrafamiliares se observó transmitido en siete de las familias estudiadas. En tres familias (Familia 2, 8 y 14), el C4 fue el clúster repetido. En dos familias (Familia 1 y 3) varios familiares se agruparon en el clúster 3. El clúster 2 se repitió en tres de cinco familiares

de una misma generación (Familia 4) y el clúster 1 en tres de los cuatro familiares estudiados (Familia 16).

Por otro lado, cabe destacar que en dos familias (10 y 16), la totalidad de los individuos afectados estudiados presentan clase III de causa mixta, aunque diferentes fenotipos (C1 y C3). Esto podría aportar información relevante a la hora de analizar los perfiles genéticos de los individuos y valorar si existen alguna predisposición a heredar ciertos fenotipos.

6.5. Distribución y penetrancia de los alelos.

La distribución de los alelos en base a afectados vs no afectados, según el sexo y por generación ha destacado principalmente que únicamente la homocigosidad del alelo menor del SNP rs593307 (gen FGF10) ha sido identificada en sujetos afectados tanto masculinos (1 sujeto) como femeninos (1 sujeto), pero no se ha encontrado entre los sujetos no afectados (*Tabla 4 y Figura 5*). A diferencia de este, para el resto de SNPs se ha observado homocigosidad del alelo menor en sujetos afectados como no afectados femeninos y masculinos.

Con respecto a la penetrancia (*Tabla 5, Figura 5*), los SNPs que han mostrado un mayor porcentaje de penetrancia han sido rs1495643 (gen BMP3) con un 67%, rs1997992 (gen RUNX2) con un 61% y rs593307 (gen FGF10) con un 100%.

El SNP rs1012861 (gen TGFB3), entre los sujetos de la 1^o generación, se ha detectado homocigosidad del alelo menor en un 5% de las mujeres afectas y en un 8% de no afectas a diferencia de los hombres -afectos (1%) y no afectados (2%)- donde el porcentaje es menor. Con respecto a la 2^o generación, se ha observado en un mayor porcentaje (18%) en mujeres no afectas a diferencia que entre los sujetos de la 3^o generación donde el mayor porcentaje se ha dado en mujeres afectas (10%) (*Tabla 4*). La mayor presencia de homocigosidad del alelo menor para el SNP rs1012861 (gen TGFB3) ha sido detectado en mujeres no afectas de la 2^o generación.

Para el SNP rs10850110 (gen MYO1H), en las 3^o generaciones, el porcentaje mayor detectado de homocigosidad del alelo menor ha sido en mujeres no afectas.

En relación con el SNP rs1495643 (gen BMP3) se han identificado tres personas, 2 mujeres (LC8.32 y LC9.34) y un hombre (LC11.40) que presentan homocigosidad del alelo menor (*Tabla 4 y 5*). De estos, solo dos (LC9.34 y LC11.40) han expresado el fenotipo (hipoplasia maxilar). La sujeto LC9.34 ha sido clusterizada con C3- clase III de causa mixta con ligera retrusión maxilar y el sujeto LC11.40 como C2 que hace referencia a una clase III maxilar con birretrusión. La homocigosidad del alelo menor del SNP rs1495643 (gen BMP3) no ha sido observado en ningún sujeto de la 1° generación y únicamente en un 1% de las mujeres no afectas de la 2° generación y de las mujeres afectas de la 3° generación.

Para el SNP rs1997992 (gen RUNX2), se ha observado la homocigosidad del alelo menor en 28 personas (la totalidad de los sujetos de la Familia 1 y 2, el sujeto LC4.17, LC7.30, LC7.29, LC7.55, la totalidad de los sujetos de la Familia 8, los sujetos LC9.86 y LC9.34, la totalidad de los sujetos de la Familia 10, el sujeto LC13.49, LC14.52, LC16.60, LC17.66, LC17.67, LC19.76 y LC19.73) de los cuales sólo 14 han expresado el fenotipo: la totalidad de los sujetos de la Familia 1 (Clúster 4 y 3), el sujeto LC2.07 (C4), LC2.04 (C4), LC4.17 (C2), LC7.55 (C4), LC8.72 (C4), LC8.31 (C4), LC9.34 (C3), LC10.38 (C3), LC10.37 (C1), LC14.52 (C4), LC16.60 (C1), LC17.66 (C4), LC19.76 (C3) y LC19.73 (C4). De estos últimos sujetos, 8 son mujeres (LC4.17, LC7.55, LC9.34, LC10.37, LC10.38, LC14.52, LC16.60, LC19.73) y 6 son hombres (LC2.04, LC2.07, LC8.31, LC8.72, LC17.66, LC19.76) (*Tabla 4 y 5*). El 71% de los que han expresado el fenotipo se han clusterizado como Clase III leve de causa mandibular. El porcentaje más elevado de la homocigosidad del alelo menor del SNP rs1997992 (gen RUNX2) ha sido observado en mujeres no afectas para la 1° y 2° generación, pero para la 3° generación se ha observado en un mayor porcentaje en mujeres afectas de clase III (*Tabla 4 y Figura 5*).

Por último, para el SNP rs593307 (gen FGF10) se ha observado la homocigosidad del alelo menor en 2 personas de las cuales 1 es mujer (LC10.37 (C1)) y la otra es hombre (LC15.56 (C4)) ambos que, además de presentarlo, han expresado el fenotipo (*Tabla 4 y 5, Figura 5*). Es decir, se ha identificado la homocigosidad del alelo menor de este SNP en un 1% de las mujeres y hombres afectos de clase III de 3° generación (*Tabla 4*).

Con respecto a la penetrancia comparada según el sexo, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres para ningún SNP ya que todos los valores son $>0,05$ (*Tabla 6*).

TABLA 4. Distribución genotípica para las 14 variantes genómicas estudiadas.

mA: homocigosidad del alelo menor / HA: heterocigosidad / MA: homocigosidad del alelo mayor.

SNP	Generación	Casos						Controles					
		Femeninos			Masculinos			Femeninos			Masculinos		
		mA n (%)	HA n (%)	MA n (%)	mA n (%)	HA n (%)	MA n (%)	mA n (%)	HA n (%)	MA n (%)	mA n (%)	HA n (%)	MA n (%)
rs1012861	1	05(05%)	00(00%)	01(01%)	01(01%)	00(00%)	00(00%)	07(08%)	00(00%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)
	2	07(08%)	00(00%)	00(00%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)	16(18%)	00(00%)	01(01%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)
	3	09(10%)	00(00%)	00(00%)	09(10%)	00(00%)	00(00%)	05(05%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs1078806	1	07(08%)	02(02%)	00(00%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)	06(07%)	05(05%)	02(02%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)
	2	03(03%)	04(04%)	01(01%)	01(01%)	03(03%)	01(01%)	06(07%)	10(11%)	03(03%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)
	3	01(01%)	09(10%)	01(01%)	07(08%)	02(02%)	02(02%)	02(02%)	01(01%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs10850110	1	05(05%)	04(04%)	00(00%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)	08(09%)	04(04%)	01(01%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)
	2	03(03%)	05(05%)	00(00%)	03(03%)	02(02%)	00(00%)	10(11%)	08(09%)	01(01%)	02(02%)	02(02%)	00(00%)
	3	05(05%)	06(07%)	00(00%)	07(08%)	04(04%)	00(00%)	07(08%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs11063118	1	06(07%)	03(03%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)	05(05%)	08(09%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)
	2	05(05%)	03(03%)	00(00%)	04(04%)	01(01%)	00(00%)	09(10%)	08(09%)	02(02%)	03(03%)	01(01%)	00(00%)
	3	07(08%)	04(04%)	00(00%)	05(05%)	06(07%)	00(00%)	06(07%)	01(01%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs11200014	1	07(08%)	02(02%)	00(00%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)	06(07%)	05(05%)	02(02%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)
	2	03(03%)	04(04%)	01(01%)	01(01%)	03(03%)	01(01%)	06(07%)	10(11%)	03(03%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)
	3	01(01%)	09(10%)	01(01%)	07(08%)	02(02%)	02(02%)	02(02%)	01(01%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs1200425	1	04(04%)	04(04%)	01(01%)	02(02%)	01(01%)	00(00%)	09(10%)	03(03%)	01(01%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)
	2	03(03%)	03(03%)	02(02%)	02(02%)	03(03%)	00(00%)	12(13%)	06(07%)	01(01%)	00(00%)	02(02%)	02(02%)
	3	04(04%)	05(05%)	02(02%)	05(05%)	04(04%)	02(02%)	03(03%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs1390319	1	00(00%)	02(02%)	07(08%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)	00(00%)	00(00%)	13(14%)	00(00%)	01(01%)	02(02%)
	2	00(00%)	01(01%)	07(08%)	00(00%)	02(02%)	03(03%)	02(02%)	04(04%)	13(14%)	00(00%)	01(01%)	03(03%)
	3	01(01%)	04(04%)	06(07%)	00(00%)	04(04%)	07(08%)	00(00%)	03(03%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs143043350	1	09(10%)	00(00%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)	13(14%)	00(00%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)
	2	08(09%)	00(00%)	00(00%)	05(05%)	00(00%)	00(00%)	19(21%)	00(00%)	00(00%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)
	3	11(12%)	00(00%)	00(00%)	11(12%)	00(00%)	00(00%)	07(08%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs1495643	1	00(00%)	04(04%)	05(05%)	00(00%)	00(00%)	02(02%)	00(00%)	03(03%)	10(11%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)
	2	00(00%)	05(05%)	03(03%)	01(01%)	02(02%)	02(02%)	01(01%)	07(08%)	11(12%)	00(00%)	01(01%)	03(03%)
	3	01(01%)	06(07%)	04(04%)	00(00%)	05(05%)	06(07%)	00(00%)	03(03%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs1509460	1	00(00%)	06(07%)	03(03%)	00(00%)	01(01%)	01(01%)	02(02%)	08(09%)	03(03%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)
	2	04(04%)	02(02%)	02(02%)	02(02%)	03(03%)	00(00%)	05(05%)	12(13%)	02(02%)	01(01%)	01(01%)	02(02%)
	3	01(01%)	07(08%)	03(03%)	01(01%)	06(07%)	04(04%)	05(05%)	00(00%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs1997992	1	02(02%)	03(03%)	04(04%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)	05(05%)	06(07%)	02(02%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)
	2	03(03%)	04(04%)	01(01%)	03(03%)	01(01%)	01(01%)	04(04%)	10(11%)	05(05%)	00(00%)	03(03%)	01(01%)
	3	06(07%)	04(04%)	01(01%)	02(02%)	04(04%)	05(05%)	02(02%)	03(03%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs2162540	1	00(00%)	03(03%)	06(07%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)	02(02%)	06(07%)	05(05%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)
	2	01(01%)	04(04%)	03(03%)	01(01%)	03(03%)	01(01%)	03(03%)	10(11%)	06(07%)	00(00%)	00(00%)	04(04%)
	3	01(01%)	09(10%)	01(01%)	02(02%)	01(01%)	08(09%)	04(04%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs2189000	1	06(07%)	03(03%)	00(00%)	01(01%)	01(01%)	00(00%)	09(10%)	04(04%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)
	2	05(05%)	03(03%)	00(00%)	05(05%)	00(00%)	00(00%)	14(15%)	05(05%)	00(00%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)
	3	09(10%)	02(02%)	00(00%)	10(11%)	01(01%)	00(00%)	06(07%)	01(01%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs2205181	1	02(02%)	05(05%)	02(02%)	00(00%)	01(01%)	02(02%)	05(05%)	06(07%)	02(02%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)
	2	00(00%)	08(09%)	00(00%)	01(01%)	03(03%)	01(01%)	05(05%)	10(11%)	04(04%)	03(03%)	00(00%)	01(01%)
	3	05(05%)	02(02%)	04(04%)	05(05%)	03(03%)	03(03%)	02(02%)	03(03%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs2249492	1	01(01%)	05(05%)	03(03%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	02(02%)	07(08%)	04(04%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)
	2	00(00%)	03(03%)	05(05%)	01(01%)	01(01%)	03(03%)	03(03%)	09(10%)	07(08%)	00(00%)	02(02%)	02(02%)
	3	01(01%)	05(05%)	05(05%)	01(01%)	06(07%)	04(04%)	00(00%)	02(02%)	05(05%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs2277071	1	09(10%)	00(00%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)	00(00%)	10(11%)	03(03%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)
	2	07(08%)	01(01%)	00(00%)	03(03%)	02(02%)	00(00%)	13(14%)	06(07%)	00(00%)	03(03%)	01(01%)	00(00%)
	3	07(08%)	04(04%)	00(00%)	08(09%)	03(03%)	00(00%)	05(05%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)

SNP	Generación	Casos						Controles					
		Femeninos			Mascullinos			Femeninos			Mascullinos		
		mA n (%)	HA n (%)	MA n (%)	mA n (%)	HA n (%)	MA n (%)	mA n (%)	HA n (%)	MA n (%)	mA n (%)	HA n (%)	MA n (%)
rs2396441	1	01(01%)	03(03%)	05(05%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)	03(03%)	04(04%)	06(07%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)
	2	02(02%)	04(04%)	02(02%)	00(00%)	04(04%)	01(01%)	04(04%)	13(14%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)	04(04%)
	3	01(01%)	05(05%)	05(05%)	03(03%)	06(07%)	02(02%)	01(01%)	06(07%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs2677101	1	02(02%)	05(05%)	02(02%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)	08(09%)	03(03%)	02(02%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)
	2	05(05%)	02(02%)	01(01%)	03(03%)	01(01%)	01(01%)	07(08%)	07(08%)	05(05%)	01(01%)	02(02%)	01(01%)
	3	07(08%)	04(04%)	00(00%)	02(02%)	07(08%)	02(02%)	02(02%)	03(03%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs2910875	1	05(05%)	03(03%)	01(01%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)	04(04%)	04(04%)	05(05%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)
	2	03(03%)	03(03%)	02(02%)	00(00%)	05(05%)	00(00%)	06(07%)	12(13%)	01(01%)	01(01%)	03(03%)	00(00%)
	3	03(03%)	07(08%)	01(01%)	05(05%)	05(05%)	01(01%)	01(01%)	06(07%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs2973015	1	05(05%)	03(03%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)	00(00%)	04(04%)	04(04%)	05(05%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)
	2	03(03%)	03(03%)	02(02%)	00(00%)	05(05%)	00(00%)	06(07%)	12(13%)	01(01%)	01(01%)	03(03%)	00(00%)
	3	03(03%)	07(08%)	01(01%)	05(05%)	05(05%)	01(01%)	01(01%)	06(07%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs2981578	1	01(01%)	04(04%)	04(04%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)	05(05%)	04(04%)	04(04%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)
	2	03(03%)	02(02%)	03(03%)	01(01%)	03(03%)	01(01%)	04(04%)	10(11%)	05(05%)	00(00%)	01(01%)	03(03%)
	3	01(01%)	09(10%)	01(01%)	02(02%)	03(03%)	06(07%)	04(04%)	02(02%)	01(01%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs3812822	1	07(08%)	02(02%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)	10(11%)	03(03%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)
	2	05(05%)	03(03%)	00(00%)	04(04%)	01(01%)	00(00%)	15(16%)	04(04%)	00(00%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)
	3	10(11%)	01(01%)	00(00%)	08(09%)	03(03%)	00(00%)	06(07%)	01(01%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs4693810	1	04(04%)	03(03%)	02(02%)	01(01%)	00(00%)	01(01%)	06(07%)	05(05%)	02(02%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)
	2	03(03%)	04(04%)	01(01%)	03(03%)	02(02%)	00(00%)	06(07%)	11(12%)	02(02%)	01(01%)	01(01%)	02(02%)
	3	05(05%)	03(03%)	03(03%)	05(05%)	05(05%)	01(01%)	02(02%)	04(04%)	01(01%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs485817	1	01(01%)	06(07%)	02(02%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)	03(03%)	06(07%)	04(04%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)
	2	02(02%)	03(03%)	03(03%)	00(00%)	04(04%)	01(01%)	05(05%)	12(13%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)	04(04%)
	3	03(03%)	05(05%)	03(03%)	03(03%)	05(05%)	03(03%)	00(00%)	07(08%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs593307	1	00(00%)	04(04%)	05(05%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)	07(08%)	06(07%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)
	2	00(00%)	03(03%)	05(05%)	00(00%)	02(02%)	03(03%)	00(00%)	03(03%)	16(18%)	00(00%)	04(04%)	00(00%)
	3	01(01%)	03(03%)	07(08%)	01(01%)	05(05%)	05(05%)	00(00%)	03(03%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs6458447	1	01(01%)	04(04%)	04(04%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)	04(04%)	06(07%)	03(03%)	01(01%)	01(01%)	01(01%)
	2	03(03%)	04(04%)	01(01%)	00(00%)	05(05%)	00(00%)	07(08%)	10(11%)	02(02%)	00(00%)	01(01%)	03(03%)
	3	02(02%)	06(07%)	03(03%)	05(05%)	04(04%)	02(02%)	03(03%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs7351083	1	01(01%)	06(07%)	02(02%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	03(03%)	06(07%)	04(04%)	01(01%)	00(00%)	02(02%)
	2	00(00%)	04(04%)	04(04%)	00(00%)	02(02%)	03(03%)	03(03%)	08(09%)	08(09%)	01(01%)	02(02%)	01(01%)
	3	02(02%)	08(09%)	01(01%)	01(01%)	06(07%)	04(04%)	01(01%)	02(02%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs74764079	1	09(10%)	00(00%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)	13(14%)	00(00%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)
	2	08(09%)	00(00%)	00(00%)	05(05%)	00(00%)	00(00%)	18(20%)	01(01%)	00(00%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)
	3	11(12%)	00(00%)	00(00%)	11(12%)	00(00%)	00(00%)	07(08%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs7955866	1	07(08%)	02(02%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)	10(11%)	03(03%)	00(00%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)
	2	05(05%)	03(03%)	00(00%)	04(04%)	01(01%)	00(00%)	15(16%)	04(04%)	00(00%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)
	3	10(11%)	01(01%)	00(00%)	08(09%)	03(03%)	00(00%)	05(05%)	02(02%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs985246	1	06(07%)	01(01%)	02(02%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)	07(08%)	04(04%)	02(02%)	01(01%)	02(02%)	00(00%)
	2	03(03%)	04(04%)	01(01%)	04(04%)	01(01%)	00(00%)	10(11%)	08(09%)	01(01%)	04(04%)	00(00%)	00(00%)
	3	05(05%)	05(05%)	01(01%)	08(09%)	03(03%)	00(00%)	04(04%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)
rs985328	1	00(00%)	04(04%)	05(05%)	00(00%)	02(02%)	01(01%)	00(00%)	02(02%)	11(12%)	00(00%)	01(01%)	02(02%)
	2	00(00%)	04(04%)	04(04%)	00(00%)	01(01%)	04(04%)	02(02%)	06(07%)	11(12%)	00(00%)	01(01%)	03(03%)
	3	01(01%)	06(07%)	04(04%)	00(00%)	05(05%)	06(07%)	00(00%)	04(04%)	03(03%)	00(00%)	00(00%)	00(00%)

TABLA 5. Penetrancia del alelo menor total y según el sexo. Los SNPs resaltados en azul representan aquellos con mayor porcentaje de penetrancia y los resaltados en naranja aquellos con penetrancia del 0%.

TOTAL	Homocigosidad del alelo menor	Recuento de la expresión del fenotipo	Penetrancia (%)	FEMENINO	Homocigosidad del alelo menor	Recuento de la expresión del fenotipo	Penetrancia (%)	MASCULINO	Homocigosidad del alelo menor	Recuento de la expresión del fenotipo	Penetrancia (%)
rs1012861	68	35	51%	rs1012861	49	21	43%	rs1012861	19	14	74%
rs1078806	39	20	51%	rs1078806	25	11	44%	rs1078806	14	9	64%
rs10850110	54	24	44%	rs10850110	38	13	34%	rs10850110	16	11	69%
rs11063118	56	30	54%	rs11063118	38	18	47%	rs11063118	18	12	67%
rs11200014	39	20	51%	rs11200014	25	11	44%	rs11200014	14	9	64%
rs1200425	44	20	45%	rs1200425	35	11	31%	rs1200425	9	9	100%
rs1390319	3	1	33%	rs1390319	3	1	33%	rs1390319	0	0	0%
rs143043350	93	47	51%	rs143043350	67	28	42%	rs143043350	26	19	73%
rs1495643	3	2	67%	rs1495643	2	1	50%	rs1495643	1	1	100%
rs1509460	22	8	36%	rs1509460	17	5	29%	rs1509460	5	3	60%
rs1997992	28	17	61%	rs1997992	22	11	50%	rs1997992	6	6	100%
rs2162540	15	5	33%	rs2162540	11	2	18%	rs2162540	4	3	75%
rs2189000	72	36	50%	rs2189000	49	20	41%	rs2189000	23	16	70%
rs2205181	28	13	46%	rs2205181	19	7	37%	rs2205181	9	6	67%
rs2249492	9	4	44%	rs2249492	7	2	29%	rs2249492	2	2	100%
rs2277071	70	36	51%	rs2277071	51	23	45%	rs2277071	19	13	68%
rs2396441	16	8	50%	rs2396441	12	4	33%	rs2396441	4	4	100%
rs2677101	38	20	53%	rs2677101	31	14	45%	rs2677101	7	6	86%
rs2910875	30	17	57%	rs2910875	22	11	50%	rs2910875	8	6	75%
rs2973015	30	17	57%	rs2973015	22	11	50%	rs2973015	8	6	75%
rs2981578	22	8	36%	rs2981578	18	5	28%	rs2981578	4	3	75%
rs3812822	75	37	49%	rs3812822	53	22	42%	rs3812822	22	15	68%
rs4693810	37	21	57%	rs4693810	26	12	46%	rs4693810	11	9	82%
rs485817	18	10	56%	rs485817	14	6	43%	rs485817	4	4	100%
rs593307	2	2	100%	rs593307	1	1	100%	rs593307	1	1	100%
rs6458447	27	12	44%	rs6458447	20	6	30%	rs6458447	7	6	86%
rs7351083	13	4	31%	rs7351083	10	3	30%	rs7351083	3	1	33%
rs74764079	92	47	51%	rs74764079	66	28	42%	rs74764079	26	19	73%
rs7955866	74	37	50%	rs7955866	52	22	42%	rs7955866	22	15	68%
rs985246	53	27	51%	rs985246	35	14	40%	rs985246	18	13	72%
rs985328	3	1	33%	rs985328	3	1	33%	rs985328	0	0	0%

TABLA 6. Significancia de la penetrancia en base al sexo.

SNP	Valor de p
rs1012861	0,31
rs1078806	0,69
rs10850110	0,26
rs11063118	0,62
rs11200014	0,69
rs1200425	0,08
rs1390319	1
rs143043350	0,19
rs1495643	1
rs1509460	0,73
rs1997992	0,5
rs2162540	0,42
rs2189000	0,29
rs2205181	0,6
rs2249492	0,73
rs2277071	0,47
rs2396441	0,44
rs2677101	0,5
rs2910875	0,77
rs2973015	0,77
rs2981578	0,54
rs3812822	0,33
rs4693810	0,47
rs485817	0,57
rs593307	1
rs6458447	0,27
rs7351083	1
rs74764079	0,2
rs7955866	0,35
rs985246	0,32
rs985328	1

6.6. Análisis de asociación genética.

Se han identificado cuatro familias donde la totalidad de individuos estudiados presentan clase III esquelética (Familia 1, 3, 14 y 16).

En la familia 1 (*Figura 4 y 5*), los tres sujetos (LC1.01, LC1.02, LC1.03) presentan homocigosidad del alelo menor del SNP rs1012861 (gen TGFB3), rs10850110 (gen MYO1H) y del SNP rs1997992 (gen RUNX2). Además, la totalidad de los sujetos presentan homocigosidad del alelo mayor para el SNP rs1495643 (gen BMP3) y para el SNP rs593307 (gen FGF10). Teniendo en cuenta las limitaciones por falta de información genética de la totalidad de los sujetos de las familias, se ha podido observar que los SNPs anteriormente mencionados han sido transmitido de una forma autosómica dominante en

las 3^o generaciones de la familia. Con respecto a la clusterización, LC1.01 ha sido clusterizada como C4 y LC1.02 y LC1.03 como C3.

En la familia 3 (*Figura 4 y 5*), los tres sujetos (LC3.11, LC3.10, LC3.09) presentan homocigosidad del alelo menor del SNP rs1012861 (gen TGFB3) que, a falta de información de los progenitores de LC3.10, se puede asumir una transmisión de una manera autosómica dominante entre las 3^o generaciones. Dos (LC3.10 y LC3.09) presentan homocigosidad del alelo menor del SNP rs10850110 (gen MYO1H) y del SNP rs593307 (gen FGF10) transmitido de forma autosómica dominante mientras que el otro (LC3.11) presenta heterocigosidad. Con respecto al SNP rs1997992 (gen RUNX2) y al SNP rs593307 (gen FGF10), LC3.10 y LC3.09 presentan homocigosidad del alelo mayor y LC3.11 heterocigosidad. Por otro lado, LC3.10 y LC3.09 presentan heterocigosidad del SNP rs1495643 (gen BMP3) y LC3.11 presenta homocigosidad del alelo mayor. Estos hallazgos concuerdan con que LC3.09 y LC3.10 han sido clusterizados en C4 a diferencia de LC3.11 que es C3.

En la Familia 14 (*Figura 4 y 5*), dos sujetos de los tres estudiados y afectados de clase III presentan homocigosidad del alelo menor (LC14.52 y LC14.53) y el tercero presenta heterocigosidad (LC14.51) del SNP rs1012861 (gen TGFB3). Esta homocigosidad ha sido detectada en sujetos de la 1^o y 2^o generación. Sin embargo, la totalidad de los sujetos presentan heterocigosidad para el SNP rs10850110 (gen MYO1H). Con respecto al SNP rs1997992 (gen RUNX2), LC14.53 y LC14.51 han mostrado heterocigosidad y LC14.52 homocigosidad del alelo menor a diferencia que en el SNP rs1495643 (gen BMP3) donde la totalidad de los sujetos han mostrado heterocigosidad y homocigosidad del alelo mayor para SNP rs593307 (gen FGF10).

Por último, en la Familia 16 (*Figura 4 y 5*), los cuatro sujetos (LC16.59, LC16.60, LC16.61 y LC16.62) presentan homocigosidad del alelo menor del SNP rs1012861 (gen TGFB3). Se ha observado su transmisión de manera autosómica dominante. Todos excepto LC16.61 (que presenta homocigosidad del alelo menor), presentan homocigosidad del alelo mayor del SNP rs10850110 (gen MYO1H) al igual que con el SNP rs1495643 (gen BMP3) donde todos excepto LC16.60 (que presenta heterocigosidad) presentan homocigosidad del alelo mayor. Contrariamente ocurre con

el SNP rs593307 (gen FGF10) donde la totalidad de los sujetos presentan heterocigosidad menos LC16.60 que presenta homocigosidad del alelo mayor. Con respecto al SNP rs1997992 (gen RUNX2), LC16.59 y LC16.2 presentan heterocigosidad, LC16.61 homocigosidad del alelo mayor y LC16.60 del alelo menor.

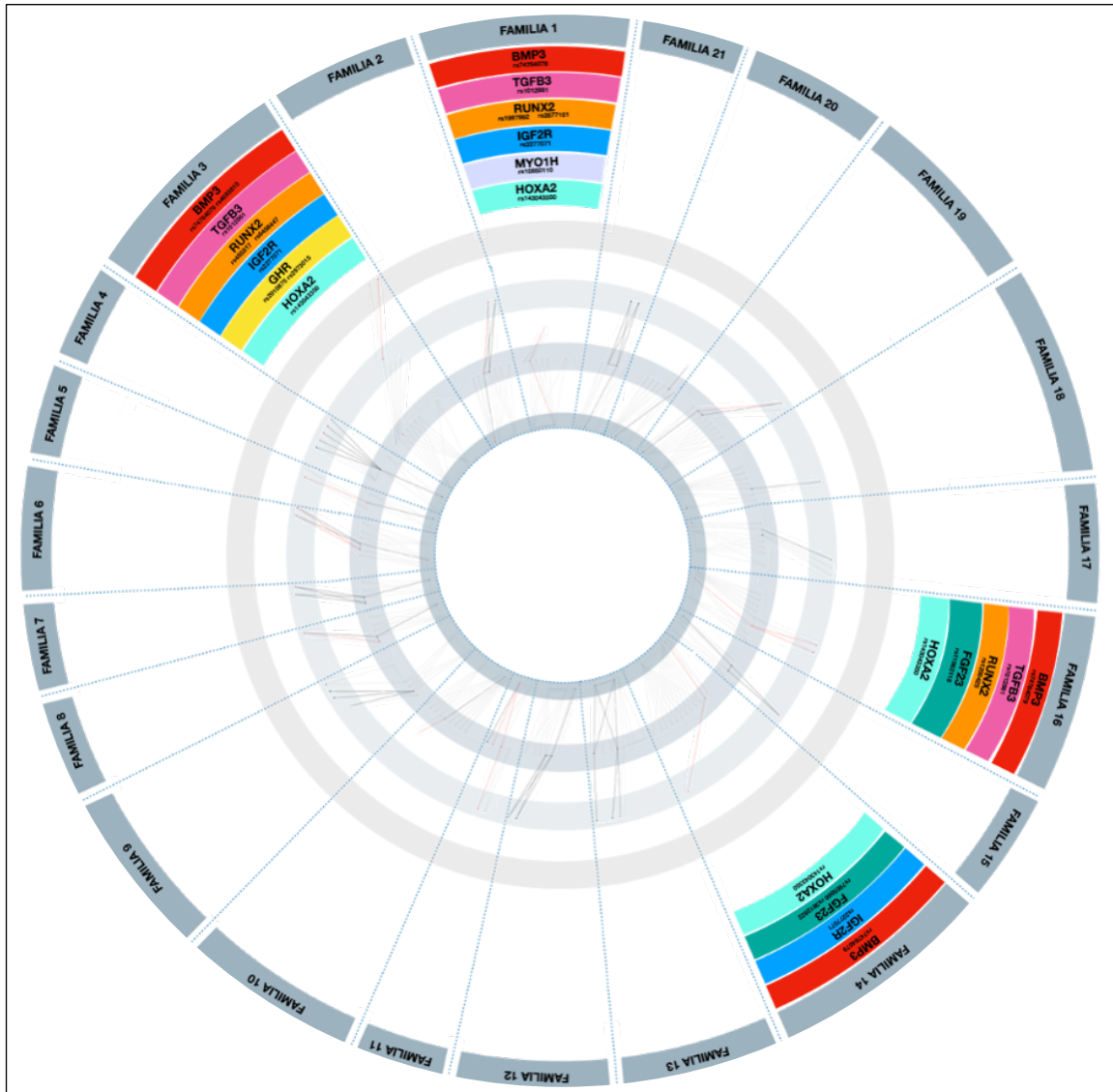


FIGURA 4. Resumen de la configuración de los pedigrís de las 21 familias incluidas en el estudio. Las distintas generaciones se han representado mediante anillos concéntricos, comenzando desde la primera generación en el centro y las sucesivas hacia fuera. En las familias donde la totalidad de los sujetos analizados son afectados - 1, 3, 14 y 16- se han destacado aquellos SNPs en los que se han identificado homocigosidad del alelo menor en la totalidad de los sujetos afectados.

DISCUSIÓN

1. DISCUSIÓN

La complejidad en la planificación del tratamiento de las maloclusiones esqueléticas de clase III reside, entre otros, en el limitado conocimiento de su heterogénea etiología [67] junto con la incógnita a la hora de predecir el patrón de crecimiento mandibular [37]. La posición sagitalmente avanzada de la mandíbula con respecto al maxilar está influida por factores tanto genéticos -considerado un rasgo poligénico- como epigenéticos [25]. Sin embargo, su segregación familiar apoya la hipótesis de que la herencia desempeña un papel sustancial en su etiología [29], por lo que debe considerarse en el diagnóstico con el objetivo de obtener los mejores resultados clínicos.

Sin descartar los efectos propios de los genes en la aparición y progresión de la clase III, la influencia genotipo-fenotipo también tiene importantes implicaciones y, por tanto, debe tenerse en cuenta. Existen varias investigaciones [68, 70] inmersas en la comprensión de cómo el genotipo puede ser desencadenado por diversos factores -genéticos y epigenéticos- que conducen a cambios permanentes en la expresión génica y, en consecuencia, a la aparición de múltiples fenotipos [71] -conocido como plasticidad fenotípica, común en humanos y animales [72]. Frazier-Bowers y cols. [11] analizaron una población colombiana predominantemente caracterizada por deficiencia maxilar mientras que Yamaguchi y cols [10] y nuestro estudio analizaron una población coreana, japonesa y española que presentaban un mayor porcentaje de clase III esquelética de causa mandibular (C4).

A la hora de establecer un buen diagnóstico y un correcto plan de tratamiento, tanto la estabilidad a largo plazo como el momento idóneo de tratamiento son conceptos determinantes. Existen diversos estudios [44, 73, 74] que han valorado el beneficio y la justificación de un tratamiento temprano de la clase III. Mandall y cols. [73] concluyó que el 36% de los pacientes que recibieron tratamiento temprano con máscara facial requirieron intervenciones quirúrgicas debido a crecimiento mandibular retardado junto con un patrón de crecimiento continuado de clase III. Tomar una decisión basada en el perfil genético del paciente permitiría una predicción precisa del crecimiento craneofacial permitiendo establecer un protocolo clínico certero y estable buscando el menor coste biológico, temporal y económico.

Hoy en día, el análisis de ligamiento es una técnica utilizada para el estudio de múltiples enfermedades [17, 22], entre las cuales se encuentra la maloclusión esquelética de clase III [9, 10, 12, 23, 25, 24]. Buscando la identificación de regiones cromosómicas transmitidas entre familiares afectados, en los últimos años se han llevado a cabo varios análisis de ligamiento [9, 10, 12, 23, 25, 24] permitiendo la identificación de patrones hereditarios y por lo consiguiente, mejorando el conocimiento etiológico y de desarrollo de las enfermedades. Sin embargo, a pesar de la gran implicación de la genética en el desarrollo de la clase III esquelética, los genes vinculados y su patrón de herencia es un campo todavía por consolidar [25, 56].

Estudios previos han contribuido a suplir carencias identificando varias regiones cromosómicas candidatas de albergar genes susceptibles a desarrollar la maloclusión de clase III [6, 56]. Ciertos loci cromosómicos -en un total de 53 genes- asociados a prognatismo mandibular (PM) se han encontrado presentes en familias con descendencia afectada de Clase III esquelética [6, 9, 10, 11, 24, 26, 75].

Entre familias coreanas y japonesas, se han mostrado resultados susceptibles de vinculación a la clase III esquelética en 3 loci cromosómicos (1p36, 6q25, 19p13.2) [10]. A pesar de la gran diferencia étnica, como característica común a nuestro estudio en población española, se ha observado la presencia de homocigosidad del alelo menor del SNP rs2277071 del gen IGF2R (6q25.3) en 34 sujetos no afectados y 36 afectados segregado, en el mayor porcentaje de los casos, de una forma autosómica dominante. Se ha identificado la implicación del gen IGF2R en el desarrollo cartilaginoso y óseo produciendo -en caso de valores elevados- variaciones en las dimensiones craneofaciales alterando la morfología de ambos maxilares. Concretamente, el SNP rs2277071 se ha asociado a variaciones en las medidas lineales sagitales del maxilar (Ptm-A) como se puede observar en el 31.2% de los sujetos que han expresado el fenotipo con una clase III de causa mixta con ligera retrusión maxilar [10, 55].

Además, se ha identificado una región adicional en el cromosoma 12 (12q13.13 y 12q23) entre familias colombianas además de otros loci cromosómicos (1p22.1, 3q26.2 y 11q22) [11] compartiendo vinculación al cromosoma 1 con la población asiática [5]; y en el

cromosoma 4 (4p16.1) y 14 (14q24.3-31.2: TGF β 3 y LTBP2 como genes candidatos) ligados a prognatismo mandibular en individuos chinos [24, 26]. Estos loci observados en población colombiana (12q13.13 -rs2249492) [6], china y Hans (14q24.3 -rs2205181 y rs1012861) [24, 26]- han sido analizados entre la muestra de población española por su relevancia en el desarrollo de la maloclusión sagital de clase III.

El gen TGF β 3 (14q24.3 -rs2205181 y rs1012861) -perteneciente a la familia TGF β - es considerado un potencial gen influyente en el desarrollo mandibular por su relación con la matriz de maduración mineral [24,26]. Asociado a prognatismo mandibular, se ha observado homocigosidad del alelo menor del SNP rs1012861 en varios sujetos españoles no afectados y afectados de clase III esquelética de causa mixta y mandibular (*Figura 6*) segregado -a falta de información genética de ciertos relativos- de una forma autosómica dominante con penetrancia incompleta ya que en ocho familias (Familia 2, 11, 12, 13, 14, 18, 19) se ha observado heterocigosidad del SNP rs1012861 en sujetos afectados y no afectados.

Por otro lado, COL1A1 (12q13.13) junto con otros tres genes -FGFR2 (10q26), MATN1 y MYO1H (12q24.11)- se ha identificado por igual en pacientes caucásicos, colombianos, chinos Han y coreanos afectados de clase II y III esquelética [11, 56, 57]. Su presencia en estas dos maloclusiones esqueléticas puede sugerir implicaciones claves en el crecimiento sagital craneofacial [67]. Ciertos estudios GWAS publicados [55, 67, 75, 76], han expuesto SNPs -entre los cuales se encuentran rs2249492 (COL2A1), rs11200014 (FGFR2), rs2162540 (FGFR2), rs10850110 (MYO1H) - presentes en ambas maloclusiones involucrados en la morfogénesis craneofacial y el desarrollo óseo y cartilaginoso pudiendo comportarse como factores predisponentes [75].

Se han obtenido resultados semejantes entre los sujetos de familias españolas analizados (*Tabla 4 y 5, Figura 4 y 5, Anexo 10*). La homocigosidad del alelo menor del SNP rs2249492 (COL1A1) [58, 59, 60] se ha observado en 9 sujetos de cuatro familias diferentes (Familia 4, 7, 8 y 19) entre los cuales 3 sujetos presentan un diagnóstico positivo de clase II esquelética – ANB>3°- (LC4.12, LC7.30, LC19.77) y otros tres de clase III esquelética -ANB<1°- (LC4.17, LC7.55, LC19.73). Teniendo en cuenta las limitaciones por ausencia de información genética de la totalidad de las familias, se puede asumir la presencia del

gen COL1A1 en sujetos con clase II y III esquelética y su heredabilidad entre sujetos de origen español. Su identificación tiene importante relevancia en el diagnóstico de la clase III ya que actúa como gen codificante de la proteína formadora de colágeno tipo I localizado en el periostio de la mandíbula, el pericondrio del cartílago de Meckel, el cartílago del cóndilo mandibular y el pericondrio, periostio y el cuello óseo del cartílago de la base craneal [60]. En consecuencia, mutaciones en dicho gen han sido observadas en casos de hipoplasia del tercio medio facial, anomalías craneofaciales como micrognatia y maloclusiones esqueléticas y dentales [58, 59] lo que explica el desarrollo de clase III de causa maxilar (C2) del sujeto LC4.17.

Asimismo, cabe destacar la implicación de los genes FGFR2 y FGF10 en el desarrollo de maloclusiones esqueléticas en el plano sagital observado entre población asiática [77]. Influyen en la osificación tanto endocondral como intramembranosa de los huesos por lo que mutaciones en estos genes han sido relacionados con hipoplasia/retrognacia maxilar [9] debido a su implicación en la craneosinostosis - *FGFR2 (rs11200014)* - [78] o por actuar como regulador de la formación del cartílago de Meckel - *FGF10 (rs593307)* - durante la etapa temprana de la morfogénesis mandibular [79].

A parte de la población asiática [77], estos genes también han sido asociados entre la población española de nuestro estudio (*Tabla 4, 5, Figura 6, Anexo 10*). Con respecto a FGFR2, se ha identificado homocigosidad del alelo menor en un total de 39 sujetos de 17 familias diferentes. Entre estas familias, se ha observado heredado de una manera autosómica dominante en dos de ellas (Familia 6 y 12), donde la totalidad de sujetos analizados genéticamente presentaban homocigosidad del alelo menor del SNP rs11200014 y han sido diagnosticados de clase III o clase II esquelética. Por otro lado, la homocigosidad del alelo menor del SNP rs593307 (gen FGF10) ha sido el único identificada solo entre sujetos afectados – un sujeto masculino (LC15.56) y otro femenino (LC10.37). Su no presencia entre sujetos no afectados puede significar que actúa como alelo de riesgo.

Por último, el gen MYO1H (12q24.11) [56, 57], codificante de la proteína *MYO1H* – necesaria para la motilidad muscular [80] – también se ha visto asociado a prognatismo mandibular. Por ello, cualquier alteración en dicho gen que implique una alteración en la

función muscular puede influir en el crecimiento mandibular apoyando la hipótesis de la matriz funcional de Moss [81] basada en que “el crecimiento esquelético ocurre en respuesta a un aumento de las necesidades funcionales mediada por su matriz muscular subyacente”. Frazier-Bower y cols. [11] y Yamaguchi y cols [10] sugirieron loci cromosómicos de interés en el cromosoma 12 que podrían albergar genes asociados a prognatismo mandibular. Partiendo de dicha afirmación, Tassopoulou-Fishell y cols [56], identificaron por primera vez la asociación entre el polimorfismo rs10850110 del gen *MYO1H* (12q24.11) y el riesgo aumentado de desarrollar clase III esquelética con prognatismo mandibular en sujetos del Oeste de Pensilvania [56] que posteriormente fue replicado en población hindú [57]. Esta asociación se ha observado también entre la población española de nuestro estudio (*Tabla 4 y 5, Figura 4 y 5, Anexo 10*) transmitido de forma autosómica dominante en 6 familias (Familia 1, 2, 4, 7, 12 y 21) entre las cuales también se han observado los genes *FGFR2* y *COL1A1*.

Los tres genes que mayor penetrancia (*Tabla 4 y 5, Figura 4 y 5*) han mostrado son *BMP3* (4q21.21) con un 67% para el SNP rs1495643, *RUNX2* (6p21) con un 61% para el SNP rs1997992 y el gen *FGF10* (5p12) con un 100% para el SNP rs593307.

La homocigosidad del alelo menor para SNP rs1495643 (*BMP3*) se ha observado en tres personas de diferentes familias (LC8.32, LC9.34 y LC11.40). Dos de estas, han expresado el fenotipo dando lugar a una clase III de causa mixta con ligera retrusión maxilar (LC9.34) y una clase III maxilar con birretrusión (LC11.40). Esto se debe a que el gen *BMP3* codifica la proteína morfogenética ósea 3 -encargada de inducir la formación ósea y cartilaginosa [25]- y ya se ha asociado a hipoplasia maxilar entre la población caucásica [25]. Coincidente con estos hallazgos, el sujeto LC11.40 también ha presentado homocigosidad del alelo menor del SNP rs11200014 (*FGFR2*). Por ello, tanto este como el rs1495643 (*BMP3*) podría asociarse a hipoplasia maxilar entre los sujetos españoles estudiados.

Debido a la gran variedad etiológica y de loci cromosómicos asociados a clase III esquelética, lo mencionado anteriormente podría explicar únicamente un pequeño porcentaje del mapa genético -todavía por investigar- del rasgo de clase III [6].

Con el propósito central de identificar el patrón hereditario, este estudio se realizó exclusivamente entre familias de origen español aumentando la homogeneidad étnica. La selección de las familias se basó en la presencia de la clase III en, al menos, un individuo de las tres generaciones. Una vez identificado los cromosomas candidatos de albergar genes asociados a clase III, el siguiente paso es conocer su segregación a través de las generaciones.

De acuerdo con la literatura publicada hasta la fecha [6, 9, 10, 12, 23, 25, 24, 55], se han identificado diferentes patrones de herencia. El análisis de nuestros datos apoya un patrón de herencia autosómico-dominante con penetrancia incompleta para la mayoría de los genes estudiados, concordante con los resultados de diferentes estudios [4, 5, 7, 15, 35, 43, 45, 82]. El principal ejemplo es la familia real Habsburgo en la cual se han identificado fenotipos de clase III esquelética en 23 generaciones sucesivas haciéndose llamar “The Habsburg jaw”. Si bien, se debe tener en cuenta la consanguinidad común de la época favoreciendo su aparición [53].

Para la muestra estudiada, el fenotipo de clase III ha sido heredado con un patrón autosómico dominante con penetrancia incompleta en 10 familias respaldando los resultados obtenidos por Rao y cols [6] entre población china, Perillo y cols entre población italiana [25] y Nikopensius y cols entre población estona [29]. Por ejemplo, dentro de la familia II, la sujeto LC2.08 con un ANB de 3. 8° es madre de LC2.07 (ANB -3. 6°) cuyo hijo también presenta clase III (ANB -0. 6°). Sin embargo, hay 3 familias que respaldan el patrón de herencia autosómica dominante con penetrancia completa (Familia XI, XIV y XVI) respaldando los resultados obtenidos en población mediterránea (Líbano/Siria) de Genno y cols [23] y de Guan y cols [27] cols en población china.

El tamaño insuficiente de las familias, de la descendencia afectada o la incapacidad de conseguir información genética de todos los familiares es una limitación en los análisis de ligamiento [21]. Por ello, en el presente estudio hemos intentado incluir un número suficientemente significativo de familias (21) y sujetos (90) para confirmar la fuerza de asociación encontrada. No hubo necesidad de diferenciaciones internacionales debido a la mínima estratificación genética dentro de los españoles [84, 85]. Se han identificado

cuatro familias donde la totalidad de individuos estudiados presentan clase III esquelética (Familia 1, 3, 14 y 16) (*Figura 4*).

La gran variabilidad fenotípica dificulta la determinación de las bases genéticas de esta maloclusión [26]. El estudio llevado a cabo por Frazier-Bowers y cols [11] identificaron una mayor prevalencia de déficit maxilar entre los afectados de las familias hispanas a diferencia de Yamaguchi y cols [10] donde se centraron en el estudio de individuos coreanos y japoneses diagnosticados de clase III de causa mandibular. En la población española estudiada, el clúster más frecuente ha sido el C4 representando una clase III esquelética de causa mandibular por lo que debe de tenerse en cuenta a la hora de analizar los resultados.

La familia 1 es una de las familias donde la totalidad de los sujetos analizados- sujetos (LC1.01, LC1.02, LC1.03)- presentan clase III esquelética. En el análisis genético, se pudo observar- en los tres individuos- homocigosidad del alelo menor del SNP rs1012861 (gen TGFB3) y rs1085011 (gen MYO1H) cuya asociación fenotípica es- para ambos- el prognatismo mandibular y del SNP rs1997992 (gen RUNX2) asociado con la craneosinostosis, formación ósea ectópica y defectos en las extremidades, homocigosidad del alelo mayor para el SNP rs1495643 (gen BMP3) cuya asociación fenotípica es la hipoplasia maxilar y para el SNP rs593307 (gen FGF10). Teniendo en cuenta las limitaciones anteriormente descritas, en la familia I se puede observar un patrón de herencia autosómico dominante para los cinco SNPs descritos. Los hallazgos observados respaldan las características esqueléticas de los sujetos analizados donde, tanto LC1.01 y LC1.02 clusterizados como C3 (clase III esquelética de causa mixta con disminución del tamaño mandibular) como LC1.03 clusterizado como C4 (clase III esquelética de causa mandibular con disminución de la altura facial inferior).

Con respecto al SNP rs1012861 (gen TGFB3), en la familia 3 (*Figura 6*) ocurre lo mismo que para la familia I. Sin embargo, no se observa el mismo patrón para el resto de SNPs. Dos (LC3.10 y LC3.09) presentan homocigosidad del alelo menor del SNP rs1085011 (gen MYO1H) y del SNP rs593307 (gen FGF10) mientras que el otro (LC3.11) presenta heterocigosidad. Con respecto al SNP rs1997992 (gen RUNX2) y al SNP rs593307 (gen FGF10), LC3.10 y LC3.09 presentan homocigosidad del alelo mayor y LC3.11

heterocigosidad. Por otro lado, LC3.10 y LC3.09 presentan heterocigosidad del SNP rs1495643 (gen BMP3) y LC3.11 presenta homocigosidad del alelo mayor. En esta familia podemos observar que los sujetos madre (LC3.10)-hija (LC3.09) presentan un perfil genético idéntico para los SNPs estudiados respaldados por presentar una clase III esquelética con las mismas características (C4-clase III de causa mandibular). Difieren únicamente con el sujeto LC1.03 (también clusterizado como C4) en que presentan homocigosidad del alelo mayor, en vez de menor, para SNP rs1495643 (gen BMP3) y rs1997992 (gen RUNX2) ambos asociados a hipoplasia maxilar.

En la familia 14 (*Figura 6*), es en la única en la que se puede observar el mismo clúster (C4) presente en los sujetos afectados de las tres generaciones. A nivel genético, dos sujetos (LC14.52 y LC14.53) presentan homocigosidad del alelo menor -coincidiendo con LC1.03, LC3.09, LC3.10, LC16.59, LC16.60, LC16.61 y LC16.62- y el tercero presenta heterocigosidad (LC14.51) del SNP rs1012861 (gen TGFB3). Sin embargo, la totalidad de los sujetos presentan heterocigosidad para el SNP rs10850110 (gen MYO1H) -la cual se ha identificado tanto en sujetos afectados como no afectados y en un mayor porcentaje -igualado- en pacientes C3 y C4. Con respecto al SNP rs1997992 (gen RUNX2), LC14.53 y LC14.51 han mostrado heterocigosidad- a diferencia de los sujetos de las familias anteriores- y LC14.52 homocigosidad del alelo menor -como los sujetos de la familia I- a diferencia que en el SNP rs1495643 (gen BMP3) donde la totalidad de los sujetos han mostrado heterocigosidad y homocigosidad del alelo mayor para SNP rs593307 (gen FGF10).

Por último, en la familia 16 (*Figura 6*), los cuatro sujetos diagnosticados de clase III esquelética de causa mixta (LC16.59, LC16.60, LC16.61 y LC16.62) presentan homocigosidad del alelo menor del SNP rs1012861. Este gen -TGFB3- se encuentra asociado a prognatismo mandibular se ha observado en sujetos C1, C4 y C3 e igual que en la familia I en esta familia se ha transmitido de una manera autosómica dominante.

Como se ha descrito anteriormente, la maloclusión de clase III engloba una diversidad de fenotipos dentofaciales [32, 33] influidos directamente por el genotipo, lo que apoya una vez más, la complejidad de esta afección. Por ello, no sólo deben estudiarse los genes

directamente relacionados con el desarrollo mandibular, sino también todas las interacciones que influyen en su expresión, como se ha mostrado anteriormente.

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta las limitaciones presentes en el estudio por falta de información genética de la totalidad de los sujetos conformantes de las familias estudiadas, se puede observar que:

- Al igual que en familias coreanas y japonesas [10], se ha observado la presencia de homocigosidad del alelo menor del SNP rs2277071 (IGF2R, 6q25.3) en sujetos españoles afectados de clase III esquelética.
- En común con la población china y Hans [24, 26], se ha identificado homocigosidad del alelo menor de los SNPs rs2205181 y rs1012861 (14q24.3) en varios sujetos españoles no afectados y afectados de clase III esquelética de causa mixta o mandibular.
- Se puede asumir la presencia de homocigosidad del alelo menor del SNP rs2249492 (COL1A1), *rs11200014 (FGFR2)*, *rs10850110 (MYOIH)* por igual en sujetos españoles con clase II y III esquelética respaldando los resultados observados en poblaciones colombianas, caucásicas, hindús, oeste de Pensilvania, japonesa, china y Hans [6, 10, 11, 56, 57, 58, 59, 60, 77].
- El fenotipo de clase III ha sido heredado con un patrón autosómico dominante con penetrancia incompleta entre familias de origen español.
- Los tres genes con mayor penetrancia han sido: BMP3 (4q21.21- SNP rs1495643) - 67% - RUNX2 (6p21- SNP rs1997992) -61%- y el gen FGF10 (5p12- SNP rs593307) -100%.
- El clúster más frecuente ha sido el C4 - clase III esquelética de causa mandibular- correspondiendo a un 39,13% de la muestra.
- No se ha podido establecer una relación directa entre los diferentes biomarcadores genéticos putativos y los subgrupos fenotípicos de la maloclusión de clase III.

Con el objetivo final de conseguir un diagnóstico precoz anticipando, detectando y tratando aquellos casos de desarrollo severo de la maloclusión, los resultados obtenidos permiten comenzar a esclarecer la predisposición genética al desarrollo de la clase III esquelética entre familias españolas con individuos afectados.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Claussnitzer M, Cho JH, Collins R, et al. A brief history of human disease genetics. *Nature*. 2020;577(7789):179-189. doi:10.1038/s41586-019-1879-7.
2. McGuire AL, Gabriel S, Tishkoff SA, et al. The road ahead in genetics and genomics. *Nat Rev Genet*. 2020;21(10):581-596. doi:10.1038/s41576-020-0272-6.
3. Gusella, J. F. & MacDonald, M. E. Huntington's disease and repeating trinucleotides. *N. Engl. J. Med.* 330, 1450–1451 (1994).
4. Boycott, K. M. et al. International cooperation to enable the diagnosis of all rare genetic diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 100, 695–705 (2017).
5. Visscher PM, Hill WG, Wray NR. Heritability in the genomics era--concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet*. 2008;9(4):255-266. doi:10.1038/nrg2322.
6. Rao C, Guan B, Luo D, et al. Identification of pathogenic variants of ERLEC1 in individuals with Class III malocclusion by exome sequencing. *Hum Mutat*. 2020;41(8):1435-1446. doi:10.1002/humu.24054.
7. Kale B, Buyukcavus MH. Comparison of three-dimensional soft-tissue evaluations between skeletal and pseudo-class III malocclusions. *Sci Rep*. 2020;10(1):14717. Published 2020 Sep 7. doi:10.1038/s41598-020-71772-7.
8. Cenzato N, Nobili A, Maspero C. Prevalence of Dental Malocclusions in Different Geographical Areas: Scoping Review. *Dent J (Basel)*. 2021;9(10):117. Published 2021 Oct 11. doi:10.3390/dj9100117.
9. Cruz RM, Hartsfield JK Jr, Falcão-Alencar G, et al. Exclusion of Class III malocclusion candidate loci in Brazilian families. *J Dent Res*. 2011;90(10):1202-1205. doi:10.1177/0022034511416668.
10. Yamaguchi T, Park SB, Narita A, Maki K, Inoue I. Genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism in Korean and Japanese patients. *J Dent Res*. 2005;84(3):255-259. doi:10.1177/154405910508400309.
11. Frazier-Bowers S, Rincon-Rodriguez 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(1):56-60. doi:10.1177/0022034508327817.
12. Dehesa-Santos A, Iber-Diaz P, Iglesias-Linares A. Genetic factors contributing to skeletal class III malocclusion: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2021;25(4):1587-1612. doi:10.1007/s00784-020-03731-5.
13. Chang HP, Tseng YC, Chang HF (2006). Treatment of mandibular prognathism. *J Formos Med Assoc* 105:781-790.
14. Peacock ZS, Klein KP, Mulliken JB, Kaban LB. The Habsburg Jaw-re-examined. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(9):2263-2269. doi:10.1002/ajmg.a.36639
15. Proffit WR. 2003. The development of dentofacial deformity: Influences and etiologic factors. In: Proffit WR, White RP, Sarver DM, editors. Contemporary treatment of dentofacial deformity, 1st edition. St. Louis, MO: Mosby.
16. Hodge GP. 1977. A medical history of the Spanish Habsburgs. As traced in portraits. *JAMA* 238:1169–1174.

17. Kuipers AL, Wojczynski MK, Barinas-Mitchell E, et al. Genome-wide linkage analysis of carotid artery traits in exceptionally long-lived families. *Atherosclerosis*. 2019;291:19-26.
18. Everest E, Ahangari M, Uygunoglu U, et al. Investigating the role of common and rare variants in multiplex multiple sclerosis families reveals an increased burden of common risk variation. *Sci Rep*. 2022;12(1):16984. Published 2022 Oct 10. doi:10.1038/s41598-022-21484-x.
19. Xiao L, Wei F, Liang F, et al. TSC22D2 identified as a candidate susceptibility gene of multi-cancer pedigree using genome-wide linkage analysis and whole-exome sequencing. *Carcinogenesis*. 2019;40(7):819-827. doi:10.1093/carcin/bgz095.
20. Choi YJ, Ohn JH, Kim N, et al. Family-based exome sequencing combined with linkage analyses identifies rare susceptibility variants of MUC4 for gastric cancer. *PLoS One*. 2020;15(7):e0236197. Published 2020 Jul 23.
21. Wallander K, Liu W, von Holst S, et al. Genetic analyses supporting colorectal, gastric, and prostate cancer syndromes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(11):775-782. doi:10.1002/gcc.22786
22. Yin X, Chan CPY, Seow A, Yau WP, Seow WJ. Association between family history and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Sci Rep*. 2021;11(1):21862. Published 2021 Nov 8. doi:10.1038/s41598-021-00929-9
23. Genno PG, Nemer GM, Zein Eddine SB, Macari AT, Ghafari JG. Three novel genes tied to mandibular prognathism in eastern Mediterranean families. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2019;156(1):104-112.e3. doi:10.1016/j.ajodo.2018.08.020.
24. Li Q, Zhang F, Li X, Chen F. Genome scan for locus involved in mandibular prognathism in pedigrees from China. *PLoS One* 2010;5:e12678.
25. Perillo L, Monsurrò A, Bonci E, Torella A, Mutarelli M, Nigro V. Genetic association of ARHGAP21 gene variant with mandibular prognathism. *J Dent Res*. 2015;94(4):569-576. doi:10.1177/0022034515572190.
26. Chen F, Li Q, Gu M, Li X, Yu J, Zhang YB. Identification of a Mutation in FGF23 Involved in Mandibular Prognathism. *Sci Rep*. 2015;5:11250.
27. Guan X, Song Y, Ott J, Zhang Y, Li C, Xin T, et al. The ADAMTS1 Gene Is Associated with Familial Mandibular Prognathism. *Journal of dental research*. 2015;94(9):1196-201.
28. Kajii TS, Oka A, Saito F, Mitsui J, Iida J. Whole-exome sequencing in a Japanese pedigree implicates a rare non-synonymous single-nucleotide variant in BEST3 as a candidate for mandibular prognathism. *Bone*. 2019;122:193-8.
29. Nikopensius T, Saag M, Jagomagi T, Annilo T, Kals M, Kivistik PA, et al. A missense mutation in DUSP6 is associated with Class III malocclusion. *Journal of dental research*. 2013;92(10):893-8.
30. Nowrin SA, Alam MK, Basri R. Genetic effect and prevalence of class iii malocclusion in different population: An overview. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2015;6(2):B910-B8.
31. Flaquer A, Strauch K. A comparison of different linkage statistics in small to moderate sized pedigrees with complex diseases. *BMC Res Notes*. 2012;5:411.

32. de Frutos-Valle L, Martín C, Alarcón JA, Palma-Fernández JC, Iglesias-Linares A. Subclustering in Skeletal Class III Phenotypes of Different Ethnic Origins: A Systematic Review. *J Evid Based Dent Pract.* 2019;19(1):34-52. doi:10.1016/j.jebdp.2018.09.002
33. Frutos-Valle L, Martín C, Alarcón JA, Palma-Fernández JC, Ortega R, Iglesias-Linares A. Novel Sub-Clustering of Class III Skeletal Malocclusion Phenotypes in a Southern European Population Based on Proportional Measurements. *J Clin Med.* 2020;9(9):3048. Published 2020 Sep 22. doi:10.3390/jcm9093048
34. Li C, Cai Y, Chen S, Chen F. Classification and characterization of class III malocclusion in Chinese individuals. *Head Face Med.* 2016;12(1):31. Published 2016 Nov 7. doi:10.1186/s13005-016-0127-8
35. Amini, F.; Mashayekhi, Z.; Rahimi, H.; Morad, G. Craniofacial morphologic parameters in a Persian population: An anthropometric study. *J. Craniofac. Surg.* 2014, 25, 1874–1881.
36. Zacharopoulos, G.V.; Manios, A.; Kau, C.H.; Velagrakis, G.; Tzanakakis, G.N.; de Bree, E. Anthropometric Analysis of the Face. *J. Craniofac. Surg.* 2016, 27, 71–75. Li
37. Celebi, A.A.; Kau, C.H.; Femiano, F.; Bucci, L.; Perillo, L. A Three-Dimensional Anthropometric Evaluation of Facial Morphology. *J. Craniofac. Surg.* 2018, 29, 304–308.
38. Lipiec, K.; Ryniewicz, W.I.; Groch, M.; Wiczorek, A.; Loster, J.E. The Evaluation of Anthropometric Measurements of Young Polish Women’s Faces. *J. Craniofac. Surg.* 2019, 30, 709–712
39. Eslami S, Faber J, Fateh A, Sheikholaemmeh F, Grassia V, Jamilian A. Treatment decision in adult patients with class III malocclusion: surgery versus orthodontics. *Prog Orthod.* 2018;19(1):28. Published 2018 Aug 2. doi:10.1186/s40510-018-0218-0.
40. Stellzig-Eisenhauer A, Lux CJ, Schuster G. Treatment decision in adult patients with class III malocclusion: orthodontic therapy or orthognathic surgery? *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2002;122:27–37.
41. Rabie AB, Wong RW, Min GU. Treatment in borderline class III malocclusion: orthodontic camouflage (extraction) versus orthognathic surgery. *Open Dent J.* 2008;2:38–48.
42. Raymond JL, Matern O, Grollemund B, Bacon W. Treatment of Class III malocclusion: the key role of the occlusal plane. *Prog Orthod.* 2010;11(1):53-61. doi:10.1016/j.pio.2010.04.012.
43. Simoes WA. Occlusal plane: a clinical evaluation. *J Clin Pediatr Dent* 1995;19(2):75–81.
44. DiBiase, A., Seehra, J., Papageorgiou, S. *et al.* Do we get better outcomes from early treatment of Class III discrepancies?. *Br Dent J* 233, 197–201 (2022).
45. Ott J, Kamatani Y, Lathrop M. Family-based designs for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet.* 2011;12(7):465-474. Published 2011 Jun 1. doi:10.1038/nrg2989

46. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(5):356–69.
47. Ott J, Wang J, Leal SM. Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet.* 2015;16(5):275-284. doi:10.1038/nrg3908
48. Zhu X, Feng T, Li Y, Lu Q, Elston RC. Detecting rare variants for complex traits using family and unrelated data. *Genet Epidemiol.* 2010;34(2):171-187. doi:10.1002/gepi.20449
49. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM: Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009, 461:747–753.
50. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191-2194. doi:10.1001/jama.2013.281053.
51. Hardy, D. , Cubas, Y. and Orellana, M. (2012) Prevalence of angle class III malocclusion: A systematic review and meta-analysis. *Open Journal of Epidemiology*, 2, 75-82.
52. Yu HJ, Cho SR, Kim MJ, Kim WH, Kim JW, Choi J. Automated Skeletal Classification with Lateral Cephalometry Based on Artificial Intelligence. *J Dent Res.* 2020;99(3):249-256. doi:10.1177/0022034520901715
53. Plaza SP, Reimpell A, Silva J, Montoya D. Relationship between skeletal Class II and Class III malocclusions with vertical skeletal pattern. *Dental Press J Orthod.* 2019. July-Aug;24(4):63-72.
54. Davis MR, Summers KM (2012) Structure and function of the mammalian fibrillin gene family: implications for human connective tissue diseases. *Mol Genet Metab* 107(4):635–647.
55. Cunha, A.; Nelson-Filho, P.; Marañón-Vásquez, G.A.; Ramos, A.G.D.C.; Dantas, B.; Sebastiani, A.M.; Silvério, F.; Omori, M.A.; Rodrigues, A.S.; Teixeira, E.C.; et al. Genetic variants in ACTN3 and MYO1H are associated with sagittal and vertical craniofacial skeletal patterns. *Arch. Oral Biol.* 2019, 97, 85–90.
56. Tassopoulou-Fishell, M., Deeley, K., Harvey, E. M., Sciote, J., & Vieira, A. R. (2012). Genetic variation in myosin 1H contributes to mandibular prognathism. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 141(1), 51–59.
57. Atteeri A, Neela PK, Mamillapalli PK, et al. Analysis of MYO1H Gene Polymorphism in Skeletal Class-III Malocclusion Due to Mandibular Prognathism. *Glob Med Genet.* 2021;8(4):156-161. Published 2021 Jun 25.
58. Jung, H., Rim, Y. A., Park, N., Nam, Y., & Ju, J. H. (2021). Restoration of Osteogenesis by CRISPR/Cas9 genome editing of the mutated COL1A1 gene in Osteogenesis Imperfecta. *Journal of Clinical Medicine*, 10(14), 3141
59. da Fontoura, C. S. G., Miller, S. F., Wehby, G. L., Amendt, B. A., Holton, N. E., Southard, T. E., Allareddy, V., & Moreno Uribe, L. M. (2015). Candidate gene

- analyses of skeletal variation in malocclusion. *Journal of Dental Research*, 94(7), 913–920.
60. Shibata S, Sakamoto Y, Baba O, Qin C, Murakami G, Cho BH. 2013. An immunohistochemical study of matrix proteins in the craniofacial cartilage in midterm human fetuses. *Eur J Histochem*. 57(4):e39.
 61. Maeno T, Moriishi T, Yoshida CA, Komori H, Kanatani N, Izumi S, Takaoka K, Komori T. 2011. Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects. *Bone*. 49(4):673–682.
 62. Cruz, C. V., Mattos, C. T., Maia, J. C., Granjeiro, J. M., Reis, M. F., Mucha, J. N., ... Vieira, A. R. (2017). Genetic polymorphisms underlying the skeletal class III phenotype. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 151(4), 700–707.
 63. Zhang Y, Blackwell EL, McKnight MT, Knutsen GR, Vu WT, Ruest LB. 2012. Specific inactivation of Twist1 in the mandibular arch neural crest cells affects the development of the ramus and reveals interactions with hand2. *Dev Dyn*. 241(5):924940
 64. Ashley, S.E., Meyer, B.A., Ellis, J.A., Martino, D.J. Candidate Gene Testing in Clinical Cohort Studies with Multiplexed Genotyping and Mass Spectrometry. *J. Vis. Exp.* (136), e57601, doi:10.3791/57601 (2018).
 65. Shrout, P.E. & Fleiss, J.L: Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol. Bull.* 86, 420-428 (1979).
 66. Souza Galvao, M.C., Sato, J.R. & Edvaldo Capobianco Coelho, E.C. Dahlberg formula: a novel approach for its evaluation. *Dental Press J. Orthod.* 17, 115-124 (2012).
 67. Gershter E, Li C, Ha P, et al. Genes and Pathways Associated with Skeletal Sagittal Malocclusions: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):13037. Published 2021 Dec 2. doi:10.3390/ijms222313037
 68. Fukushima K, Pollock DD. Detecting macroevolutionary genotype-phenotype associations using error-corrected rates of protein convergence. *Nat Ecol Evol.* 2023;7(1):155-170. doi:10.1038/s41559-022-01932-7
 69. Muto Y, Sasaki H, Sumitomo M, et al. Genotype-phenotype correlation of renal lesions in the tuberous sclerosis complex. *Hum Genome Var.* 2022;9(1):5. Published 2022 Feb 10. doi:10.1038/s41439-022-00181-1
 70. Gibson JT, Huang M, Shenelli Croos Dabrera M, et al. Genotype-phenotype correlations for COL4A3-COL4A5 variants resulting in Gly substitutions in Alport syndrome. *Sci Rep.* 2022;12(1):2722. Published 2022 Feb 17. doi:10.1038/s41598-022-06525-9
 71. White JD, Indencleef K, Naqvi S, et al. Insights into the genetic architecture of the human face. *Nat Genet.* 2021;53(1):45-53. doi:10.1038/s41588-020-00741-7
 72. Duncan EJ, Cunningham CB, Dearden PK. Phenotypic Plasticity: What Has DNA Methylation Got to Do with It? *Insects.* 2022;13(2):110. Published 2022 Jan 19. doi:10.3390/insects13020110

73. Anne Mandall N, Cousley R, DiBiase A, Dyer F, Littlewood S, Mattick R, et al. Is early Class III protraction facemask treatment effective? A multicentre, randomized, controlled trial: 3-year follow-up. *J Orthod* 2012;39:176-85.
74. Blagitz MN, Almeida GA, Normando D. Factors associated with the stability of compensatory orthodontic treatment of Class III malocclusion in the permanent dentition. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2020;158(5):e63-e72. doi:10.1016/j.ajodo.2020.06.030
75. Milosevic O, Nikolic N, Carkic J, et al. Single nucleotide polymorphisms MYO1H 1001 C>T SNP (rs3825393) is a strong risk factor for mandibular prognathism [published online ahead of print, 2022 Aug 14]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2022;S0889-5406(22)00469-3. doi:10.1016/j.ajodo.2021.09.016
76. Jiang, Q.; Mei, L.; Zou, Y.; Ding, Q.; Cannon, R.; Chen, H.; Li, H. Genetic Polymorphisms in FGFR2 Underlie Skeletal Malocclusion. *J. Dent. Res.* 2019, 98, 1340–1347.
77. Xiong X, Li S, Cai Y, Chen F. Targeted sequencing in FGF/FGFR genes and association analysis of variants for mandibular prognathism. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(25):e7240.
78. Piccione M, Antona V, Niceta M, et al. Q289P mutation in the FGFR2 gene: first report in a patient with type I Pfeiffer syndrome. *Eur J Pediatr* 2009;168:1135–9.
79. Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. 2011. Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats. *Dev Biol.* 350(2):337–347.
80. Rowlerson A, Raoul G, Daniel Y, Close J, Maurage CA, Ferri J, Sciote JJ. Fiber-type differences in masseter muscle associated with different facial morphologies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005; 127:37–46.
81. Moss ML. The functional matrix hypothesis revisited. 1. The role of mechanotransduction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;112: 8-11.
82. Kantaputra PN, Pruksametanan A, Phondee N, et al. ADAMTSL1 and mandibular prognathism. *Clin Genet.* 2019;95(4):507-515.
83. Wolff G, Wienker TF, Sander H (1993). On the genetics of mandibular prognathism: analysis of large European noble families. *J Med Genet* 30:112-116.
84. Gayán J, Galan JJ, González-Pérez A, et al. Genetic structure of the Spanish population. *BMC Genomics.* 2010;11:326. Published 2010 May 25. doi:10.1186/1471-2164-11-326
85. Bycroft C, Fernandez-Rozadilla C, Ruiz-Ponte C, et al. Patterns of genetic differentiation and the footprints of historical migrations in the Iberian Peninsula. *Nat Commun.* 2019;10(1):551. Published 2019 Feb 1.

ANEXOS

1. ANEXOS

ANEXO 1: Aprobación del comité ético



Dictamen Protocolo Favorable

C.I. 23/043-E

09 de marzo de 2023

Dra. Mar García Arenillas
Presidenta del CEIm Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA

- Que el CEIm Hospital Clínico San Carlos en reunión de Comisión Permanente, acta 3.2/23, ha evaluado la respuesta a las aclaraciones solicitadas con anterioridad al estudio:

Título: "BIOMARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS CON LOS FENOTIPOS ESQUELÉTICOS MALOCLUSIVOS DE CLASE III: UN ESTUDIO A GENOMA COMPLETO"

Investigador principal: **ALEJANDRO IGLESIAS LINARES. Facultad de Odontología U.C.M.**
Código Interno: **23/043-E**

Tipo Documento	Versión
Hoja Información de Paciente - Menores	Versión febrero 2023
Hoja Información de Paciente - Adultos	Versión febrero 2023
Protocolo	Versión febrero 2023

- Que en este estudio:
 - 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.
 - Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
 - La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
 - El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.
 - Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa legal aplicable en función de las características del estudio.
- Que este Comité ha decidido emitir un **DICTAMEN FAVORABLE**.
- Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente – Real Decreto 1090/2015 – para que la decisión del citado CEIm sea válida.
- Que el CEIm Hospital Clínico San Carlos tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm Hospital Clínico San Carlos es la indicada a continuación, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el proyecto o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del proyecto.

ANEXO 2: Consentimiento informado



DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

A usted y/o a su hijo(a) se le está pidiendo participar en un estudio que busca identificar biomarcadores genéticos asociados con distintos subgrupos fenotípicos de la maloclusión esquelética de clase III, realizado en la Escuela de Doctorado perteneciente a la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. Para participar en este estudio, usted debe conocer cuáles son los riesgos y beneficios para tomar una decisión informada. Este proceso se llama consentimiento informado.

El/la doctor(a) de usted/ de su niño(a) le dará información sobre el estudio y los posibles riesgos y beneficios de su participación. Una vez que usted sepa de lo que se trata el estudio, y si usted/su niño(a) accede a participar, se le pedirá que firme este formulario de consentimiento.

Es importante que usted sepa lo siguiente:

- La participación de usted/su niño(a) es voluntaria
- Usted y/o su hijo(a) puede elegir no participar en este estudio
- Usted y/o su hijo(a) puede dejar el estudio en cualquier momento sin perder los beneficios que a usted/su niño(a) de otra manera corresponden
- Si usted y/o su hijo(a) elige dejar el estudio en cualquier momento, no perjudicará el cuidado médico futuro suyo/de su niño(a) ni la participación en estudios futuros

D./Dña. _____ de _____ años con DNI no. _____, manifiesta que ha sido informado/a sobre los beneficios que podría suponer la utilización de sus datos clínicos almacenados en la base de datos y radiografías ya realizadas previamente para la realización del estudio ortodóncico y almacenadas en la base de datos de los centros participantes; así como la toma de una muestra de saliva y su posterior análisis genómico, para cubrir los objetivos del proyecto de investigación titulado "*Biomarcadores genéticos asociados con los fenotipos esqueléticos maloclusivos de clase III: un estudio a genoma completo*" con el fin de mejorar tratamiento de la maloclusión esquelética de la clase III.

He sido informado/a de que los datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero totalmente confidencial que deberá estar sometido/a y con las garantías de la Ley Orgánica 3/2018.

Tomo ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta toma de muestra tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

En _____ a _____, de _____ del 20

Fdo _____ D/Dña _____

La información que utilizaremos para realizar este estudio esta específicamente relacionada con el tratamiento de ortodoncia iniciado en usted y/o su hijo(a). Emplearemos la radiografía lateral de cráneo realizada antes de iniciar el tratamiento de ortodoncia y se deberá de realizar una radiografía lateral de cráneo a aquellas personas incluidas en el estudio y que no cuenten con dichas radiografías. Así mismo, también se recogerá una muestra salival, la cual será sometida a un análisis genómico posterior. La información que se obtenga de estas radiografías y muestra salival se utilizará para identificar los genes relacionados con el fenotipo de la maloclusión esquelética de clase III.

Lugar de realización del estudio

La información obtenida será almacenada y analizada en la Universidad Complutense de Madrid.

Procedimientos a los que se debe de someter

Toma de muestra salival: Se le pedirá a usted y/o su hijo(a) que escupa saliva en un kit diseñado para la autorrecolección salival, durante 2-5 minutos aproximadamente.

Radiografía lateral de cráneo: En las personas sometidas a tratamiento de ortodoncia, se empleará la radiografía lateral de cráneo realizada antes de iniciar el tratamiento de ortodoncia. Aquellas personas que no dispongan de radiografías laterales de cráneo deberán de realizarse dicha radiografía.

Riesgos y beneficios del estudio

Al emplear la radiografía lateral de cráneo que formaba parte del estudio inicial ortodóncico, usted y/o su hijo(a) no se verá sometido a ningún riesgo asociado a este estudio. Por otra parte, si usted debe de realizarse una radiografía lateral los riesgos son prácticamente nulos, ya que la dosis es mínima y se lleva a cabo siguiendo las normas de protección.

Usted y/o su hijo NO recibirá directamente un beneficio por su participación en este estudio. Sin embargo, los datos proporcionados serán de gran utilidad para la mejora de las estrategias diagnósticas y el tratamiento de esta enfermedad.

Manejo de la información personal

Su información personal y/o la de su hijo(a) será manejada de forma confidencial, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 3/2018 de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

Le solicitaremos información sobre su edad (en el momento de la toma de la radiografía), raza y sexo y/o la de su hijo(a). Los datos relacionados con nombre, dirección o cualquier información de contacto no serán necesarios para el objetivo de este estudio.

Ningún dato referente a la información personal brindada será publicado. No obstante, ha de conocer que, en determinados casos, por ley, se debe de publicar información recopilada en el estudio, por lo que no se puede garantizar su privacidad absoluta. Sin embargo, haremos todo lo posible para mantenerla de forma privada.

Tanto el investigador principal como los demás miembros de la investigación necesitarán acceder a la información personal proporcionada. Esta información puede ser cedida a miembros del comité ético, autoridades provinciales y nacionales de la salud si así lo solicitasen.

Siguiendo la normativa vigente de la Ley de Investigación Biomédica 14/2007 y el Real Decreto 1716/2011, todas las muestras salivales serán numeradas con su nombre o el de su

hijo(a) codificado, de forma que no sea reconocible su identidad. El análisis de esta será realizado en el Centro Nacional de Genotipado por una persona ajena al proceso de reclutamiento.

Una vez finalizado este estudio su información personal y/o la de su hijo(a) será almacenada de forma segura. En la Universidad Complutense de Madrid se almacena esta información hasta 5 años después de haber concluido el estudio. Si existiese un sobrante de muestra salival, se procederá a almacenarla en la Genoteca de los laboratorios de la facultad de Odontología. Dicho almacenamiento, será opcional, pudiendo negarse a este.

Aclaraciones

- La participación de usted y/o la de su hijo(a) en este estudio es completamente voluntaria.
- Si usted y/o su hijo(a) decide participar, puede retirarse en el momento que lo desee, pudiendo informar o no de las razones de su decisión. La cual será respetada en su integridad.
- En el transcurso del estudio usted podrá aportar información actualizada sobre sí mismo al investigador responsable.
- Usted y/o su hijo(a) puede dejar el estudio en cualquier momento sin perder los beneficios que a usted/su niño(a) de otra manera corresponden.
- Si usted y/o su hijo(a) elige dejar el estudio en cualquier momento, no perjudicará el cuidado médico futuro suyo/de su niño(a) ni la participación en estudios futuros.
- El conocimiento de la información obtenida será opcional para usted y/o su hijo(a).
- Si ha comprendido claramente este documento y no presenta dudas ni preguntas acerca de su participación, puede firmar a continuación:

Yo, _____ (y si procede, D/Dña _____ como madre, padre o tutor), he leído y comprendido la información anteriormente expuesta y mis preguntas han sido respondidas mediante un lenguaje claro y sencillo. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en este estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia de este consentimiento.

Participante o madre/padre/tutor:

Nombre _____ Firma

Investigador principal:

Nombre _____ Firma

Fecha:.....

ANEXO 4: Tabla resumen de los datos epidemiológicos y diagnósticos de la muestra.

SUJETO	FAMILIA	GENERACIÓN	SEXO (F/M)	EDAD (AÑOS)	NO AFECTO (0) / AFECTO (1)
LC1.01	1	2	F	66	0
LC1.02	1	3	F	39	1
LC1.03	1	1	F	84	1
LC2.04	2	3	M	10	1
LC2.05	2	2	F	38	0
LC2.06	2	3	F	6	0
LC2.07	2	2	M	41	1
LC2.08	2	1	F	68	0
LC3.09	3	3	F	23	1
LC3.10	3	2	F	62	1
LC3.11	3	1	F	77	1
LC4.12	4	2	F	49	0
LC4.13	4	1	F	77	0
LC4.15	4	3	F	19	1
LC4.16	4	3	F	16	1
LC4.17	4	3	F	17	1
LC4.18	4	3	M	20	1
LC4.19	4	3	M	12	0
LC5.20	5	3	F	19	1
LC5.21	5	2	F	43	0
LC5.22	5	1	F	70	0
LC6.23	6	3	M	20	1
LC6.24	6	3	M	18	1
LC6.25	6	2	F	50	0
LC6.26	6	1	F	90	0
LC6.27	6	2	F	56	1
LC7.28	7	3	F	19	1
LC7.29	7	2	F	52	0
LC7.30	7	1	F	77	0
LC7.55	7	3	F	16	1
LC7.85	7	2	M	48	0
LC8.31	8	3	M	18	1
LC8.32	8	2	F	51	0
LC8.33	8	1	F	78	0
LC8.72	8	2	M	50	0
LC9.34	9	3	F	14	1
LC9.35	9	2	F	51	0
LC9.36	9	1	F	81	0
LC9.14	9	2	F	56	0
LC9.74	9	2	F	53	0
LC9.86	9	2	F	48	0
LC10.37	10	3	F	26	1
LC10.38	10	2	F	45	1
LC10.39	10	1	F	66	0
LC11.40	11	2	M	49	1
LC11.41	11	1	F	86	1
LC11.42	11	3	F	19	0
LC11.50	11	2	F	53	0
LC11.81	11	2	F	60	0
LC12.43	12	3	F	22	1
LC12.44	12	2	F	57	0
LC12.45	12	1	F	80	0
LC12.54	12	2	M	57	0
LC12.71	12	3	F	24	0
LC13.46	13	3	M	19	1
LC13.47	13	1	F	76	0
LC13.48	13	2	F	51	0
LC13.49	13	3	F	15	0
LC13.82	13	2	F	47	0
LC13.83	13	2	F	52	0
LC13.84	13	1	M	80	0
LC14.51	14	3	F	15	1
LC14.52	14	2	F	53	1
LC14.53	14	1	F	78	0
LC15.56	15	3	M	24	1
LC15.57	15	1	M	91	0
LC15.58	15	2	M	62	0
LC15.63	15	2	M	62	0
LC16.59	16	2	F	51	1
LC16.60	16	3	F	14	0
LC16.61	16	3	M	16	0
LC16.62	16	1	M	78	1
LC17.64	17	3	M	19	1
LC17.65	17	2	F	56	0
LC17.66	17	1	M	85	1
LC17.67	17	1	F	86	0
LC18.68	18	3	M	29	1
LC18.69	18	2	F	54	0
LC18.70	18	1	F	78	0
LC19.73	19	3	F	15	1
LC19.75	19	2	F	41	0
LC19.76	19	2	M	44	0
LC19.77	19	1	F	69	0
LC20.78	20	3	M	20	1
LC20.79	20	2	F	52	0
LC20.80	20	1	F	77	0
LC21.86	21	2	F	55	0
LC21.87	21	2	M	58	1
LC21.88	21	3	F	18	0
LC21.89	21	3	F	23	0
LC21.90	21	1	M	88	0

ANEXO 5: Excel con todos los registros de la muestra.

<https://drive.google.com/drive/folders/1aF3h6A0f6I4k4R5psK28IKSwb6iI1o6S?usp=sharing>

ANEXO 6: Variables cefalométricas usadas para el diagnóstico y subclasificación de los sujetos [18-Frutos-Valle: novel-Subclustering, 33-Frutos-Valle: Subclustering 2020].

SKELETAL ANGULAR		Value	SD	
	FH - SN (°)	6	4,0	Angle formed by Frankfurt plane (FH) and Sella (S) - Nasion (N) plane
	SNA (°)	82	3,5	Angle formed by Sella (S), Nasion (N) and point A (A)
	SNB (°)	80,9	3,4	Angle formed by Sella (S), Nasion (N) and point B (B)
	ANB (°)	1,6	1,5	Angle formed by Nasion (N), point A (A) and point B (B)
	SND (°)	80,0	3,0	Angle formed by Sella (S), Nasion (N) and point D (D)
	Y-Axis (SGn-SN) (°)	67,0	5,5	Angle formed by Sella (S) - Gnasion (Gn) plane and Sella (S) - Nasion (N) plane
	SN - GoGn (°)	32,9	5,2	Angle formed by Sella (S) - Nasion (N) plane and Gonion (Go) - Gnasion (Gn) plane
	Cranio-Mx Base/SN-Palatal Plane (°)	7,3	3,5	Angle formed by Sella (S) - Nasion (N) plane and palatal plane
	Occ Plane to SN (°)	14,4	2,5	Angle formed by occlusal plane and Sella (S) - Nasion (N) plane
	Occ Plane to FH (°)	6,8	5,0	Angle formed by occlusal plane and Frankfort plane (FH)
	Facial Axis-Ricketts (NaBa-PtGn) (°)	90,0	3,0	Angle formed by Nasion (N) - Basion (Ba) plane and Pterigoid (Pt) - Gnasion (Gn) plane
	FMA (MP-FH) (°)	27,0	6,0	Angle of mandibular plane. Angle formed by mandibular plane (MP) and Frankfort plane (FH)
	Lower Face Height (ANS-Xi-Pm) (°)	47,0	4,0	Angle formed by the anterior nasal spine (ANS), Xi point and suprapogonion (Pm)
	Facial Angle (FH-NPo) (°)	88,0	3,0	Angle formed by Frankfort plane (FH) and Nasion (N) - Pogonion (Pg) plane
	N-A-Pg (°)	2,6	5,1	Angle formed by Nasion (N), point A (A) and Pogonion (Pg)
	Facial Taper (°)	68,0	3,5	Angle formed by the mandibular plane and facial plane
	Gonial/Jaw Angle (Ar-Go-Me) (°)	123,3	6,7	Angle formed by the Articulare (Ar), Gonion (Go) and Menton (Me)
	Upper Gonial Angle (Ar-Go-Na) (°)	52,6	7,0	Angle formed by the Articulare (Ar), Gonion (Go) and Nasion (N)
	Lower Gonial Angle (Na-Go-Me) (°)	71,1	6,0	Angle formed by the Nasion (N), Gonion (Go) and Menton (Me)
	Articular Angle (°)	140,7	6,0	Angle formed by Sella (S), Articulare (Ar) and Gonion (Go)
	Saddle/Sella Angle (SN-Ar) (°)	124,0	5,0	Angle formed by the Sella(S), Nasion (Na) and Articulare (Ar)
	Superior Angle SN-AB (°)	N/A	N/A	Angle formed by Sella (S) - Nasion (N) plane and point A (A) - point B (B) plane
	Rp-FH (°)	88,7	6,2	Angle formed by ramus plane (Rp) and Frankfort plane (FH)
SKELETAL LINEAR				
	Anterior Cranial Base (SN) (mm)	74,9	3,0	Distance between Sella (S) and Nasion (N)
	Anterior Face Height (NaMe) (mm)	126,5	5,0	Distance between Nasion (N) and Menton (Me)
	Upper Face Height (N-ANS) (mm)	50,0	2,5	Distance between Nasion (N) and Anterior Nasal Spine (ANS)

	Lower Face Height (ANS-Me) (mm)	65,0	4,5	Distance between Anterior Nasal Spine (ANS) and Menton (Me)
	Posterior Cranial Base (S-Ar) (mm)	34,6	4,0	Distance between Sella (S) and Articulare (Ar)
	Posterior Face Height (SGo) (mm)	81,0	5,0	Distance between Sella (S) and Gonion (Go)
	Ramus Height (Ar-Go) (mm)	47,6	4,5	Distance between Articular (Ar) and Gonion (Go)
	Co-Go (mm)	55,0	3,0	Distance between Condilion (Co) and Gonion (Go)
	Convexity (A-NPo) (mm)	1,0	2,0	Distance from point A (A) to Nasion (N)-Pogonion (Pg) line
	Maxillary Skeletal (A-Na Perp) (mm)	0,4	2,3	Distance from point A (A) to the line perpendicular to Frankfort plane via Nasion (N perp)
	Midface Length (Co-A) (mm)	91,0	4,3	Distance between Condilion (Co) and point A (A)
	Ar - A (mm)	93,1	4,5	Distance between Articulare (Ar) and point A (A)
	Maxillary length (ANS-PNS) (mm)	51,6	4,3	Distance between Anterior Nasal Spine (ANS) and Posterior Nasal Spine (PNS)
	Pog - NB (mm)	2,3	1,7	Distance between Pogonion (Pg) to Nasion (N) - point B (B) line
	Mand, Skeletal (Pg-Na Perp) (mm)	-1,8	4,5	Distance between point B (B) to the line perpendicular to the Frankfort plane via Nasion (N perp)
	Mandibular Body Length (Go-Gn)(mm)	74,3	4,4	Distance between Gonion (Go) and Gnation (Gn)
	Length of Mand Base (Go-Pg)(mm)	73,0	3,0	Distance between Gonion (Go) and Pogonion (Pg)
	Mandibular length (Co-Gn)(mm)	120,0	5,3	Distance between the Condilion (Co) and Gnation (Gn)
	Co-B1 Total mand (mm)	N/A	N/A	Distance between Condilion (Co) and point B (B)
	Ar - Gn (mm)	119,0	5,8	Distance between Articular point (Ar) and Gnation (Gn)
	Basal Width (mm)	N/A	N/A	Horizontal distance of the symphysis at point B (B) level
	Mx/Md diff (Co-Gn - Co-A)(mm)	29,3	3,3	Difference between the Condilion (Co) - Gnation (Gn) distance and the Condilion (Co) - point A (A) distance
	Wits Appraisal (mm)	-1,0	1,0	Distance between point A and point B projected in the occlusal plane
SKELETAL PROPORTIONAL				
	P-A Face Height (S-Go/N-Me) (%)	65,0	4,0	Proportion existing between Sella (S) - Gonion (Go) distance and the Nasion (N) and Menton (Me) distance
	PFH:AFH (%)	60,0	1,0	Ratio of Posterior Facial Height (PFH) to Anterior Facial Height (AFH)
	S-Ar/Ar-Go (%)	75,0	5,0	Ratio of posterior cranial base (S-Ar) to ramus height (Ar-Go)
	UFH (N-ANS/(N-ANS+ANS-Me)) (%)	43,0	100,0	Proportion of upper facial height
	LFH/TFH (ANS-Me:N-Me) (%)	55,0	3,0	Ratio of Lower Facial Height (LFH) to Total Facial Height (TFH)
	Face Ht Ratio (N-ANS/ANS-Me) (%)	0,8	0,1	Total Facial Height Ratio
	SN/GoMe (%)	100,0	10,0	Proportion between Sella (S) - Nasion (N) line and Gonion (Go) - Menton (Me) line.
	ANS-PNS/Me-Go (%)	N/A	N/A	Ratio of maxillary length (ANS-PNS) to mandibular length (Me-Go)

ANEXO 7: 76 puntos cefalométricos: 30 localizados en estructuras esqueléticas, 24 dentales, 15 en tejidos blandos, 4 en estructuras de las vías aéreas, 1 en una estructura muscular y 2 de calibración.

TEJIDOS BLANDOS
S.T. Glabella
S.T. Nasion
Bridge of nose
Tip of nose
Subnasale
S.T. A-point
Upper Lip
Stomion superius
Stomion inferius
Lower lip
S.T. B-point
S.T. Pogonion
S.T. Gnathion
Soft Tissue Menton
Throat point
ESTRUCTURAS DENTALES
L6 Root
U6 Occlusal
L6 Occlusal
U1 Labial gingival border
U1 Tip
U1 Root
U1 Lingual gingival border
Upper first bicuspid (U4)
Lower first bicuspid (L4)
L1 Labial gingival border
L1 tip
L1 root
L1 Lingual gingival border
UMP- upper molar point
Distal U6
Mesial U6
Distal L6
Mesial L6
L7 Occlusal
Distal U7
Mesial U7
Distal L7
Mesial L7
U7 Occlusal

ESTRUCTURAS ESQUELÉTICAS
Porion
Orbitale
PT point
Sella
Nasion
Basion
Distal aspect of the condyle
Condylion
BI
BI2
A point
ANS
PNS
FNS- frontonasal suture at nasal
RH-rhinion
PRO-prosthion
B point
Pogonion
Anatomical Gnathion
Menton
Center of symphysis (D)
Gonion
Ramus point
Mid ramus (R1)
R2
Sigmoid notch (R3)
R4
Articulare
C2 Superior posterior
C2 Inferior posterior

GENERAL
Ruler point 1
Ruler point 2
ESTRUCTURAS DE LAS VÍAS AÉREAS
Airway post. upper
Airway post. lower
Airway ant. upper
Airway ant. lower
ESTRUCTURA MUSCULAR
Hyoid

ANEXO 8:

Proceso de Subclustering (4 clústers) [18]



● Cluster 1



● Cluster 2



● Cluster 3



● Cluster 4

Proceso de Subclustering (6 clústers) [33]



Cluster 1



Cluster 2



Cluster 3



Cluster 4



Cluster 5



Cluster 6

ANEXO 9: Coeficiente de correlación interclase interexaminador e intraexaminador respectivamente (CCI).

Coeficiente de correlación intraclase

	Correlación intraclase ^b	Intervalo de confianza al 95%		Prueba F con valor ...	
		Límite inferior	Límite superior	Valor	gl1
Medidas únicas	,970 ^a	,957	,980	682,827	53
Medidas promedio	,998 ^c	,998	,999	682,827	53

Coeficiente de correlación intraclase

	Correlación intraclase ^b	Intervalo de confianza al 95%		Prueba F con valor ...	
		Límite inferior	Límite superior	Valor	gl1
Medidas únicas	,975 ^a	,965	,984	819,443	53
Medidas promedio	,999 ^c	,998	,999	819,443	53

ANEXO 10: Pedigrees.

https://drive.google.com/drive/folders/1aF3h6A0f6I4k4R5psK281KSwb6iI1o6S?usp=s_haring