



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Especialidad en Ortodoncia

“VALIDACIÓN DE LOS GENES IGF1 Y VEGFA, SNP’S rs3730198 Y rs374253522 COMO MARCADORES GENETICOS PARA LA PRESENCIA DE MALOCCLUSION CLASE III EN LA POBLACION EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO.”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Especialidad en Ortodoncia

Presenta:

L.O. GABRIELA MARTÍNEZ LÓPEZ

Dirigido por:

DR. MIGUEL FRANCISCO JAVIER LLORET RIVAS

Co-dirigido por:

DR. ALEJANDRO LLORET SANDOVAL

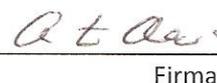
Dr. Miguel Francisco Javier Lloret Rivas
Presidente


Firma

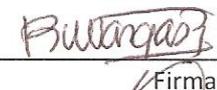
Dr. Alejandro Lloret Sandoval
Secretario


Firma

Dr. en C. Aidé Terán Alcocer
Vocal


Firma

C.D.E.O. Rosa María Vargas Zepeda
Suplente


Firma

C.D.E.O. Elisa Rebeca Ascencio Rentería
Suplente


Firma

Dr. Javier Ávila Morales
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio 2016

RESUMEN

Introducción: La genómica, encargada del mapeo, secuenciación y análisis de los genomas, ha facilitado la identificación y comprensión de la función de los genes; permitiendo así estudiar su relación con las enfermedades, buscando entenderlas, diagnosticarlas, tratarlas e incluso prevenirlas. Se busca hacer uso de esta disciplina para esclarecer la etiología de la maloclusión clase III, la cual es considerada como la maloclusión con mayor necesidad de tratamiento y más complejo. **Objetivo:** Este estudio busca la validación de los genes IGF1 y VEGFA, SNP's rs3730198 y rs374253522, como marcadores genéticos para la maloclusión clase III, previamente reportados como factores influyentes en su etiología (prognatismo) (Hajjar et al. 2003; Rabie et al. 2002) en poblaciones heterogéneas genéticamente, por lo que se busca validarlos en la población mexicana, cuyo trasfondo genético es mixto. **Metodología:** Se realizó un estudio de tipo observacional, descriptivo, analítico. La población de estudio se seleccionó de pacientes que acudieron a consulta diagnosticados clínicamente con maloclusión clase III de enero a septiembre del 2015 y una población control, residentes de Querétaro, formando un total de 33 triadas familiares. Después de aplicar un cuestionario para obtención de los datos sociodemográficos, se obtuvo consentimiento informado y se realizó la recolección de muestras epiteliales, de las cuales se extrajo ADN, y se logró formar un banco genético para ambos grupos. Se realizó la selección de SNP's por gen, posteriormente una amplificación de la zona de interés por PCR y un análisis por endonucleasa de restricción. **Resultados:** Obtención del banco genético por triadas, de población control y de pacientes diagnosticados clínicamente con maloclusión clase III, residentes de Querétaro. Se realizó la validación de los Polimorfismos de Nucleótidos Simples (SNP's) rs3730198 del gen IGF1 y rs374253522 del gen VEGFA en la población control, los cuales presentan una distribución alélica homogénea, siendo esta = 1.0 para el alelo T y 0 para el alelo C en el SNP rs3730198 del gen IGF1 y para el SNP rs374253522 del gen VEGFA se reportó una frecuencia = 1.0 para el alelo G y 0 para A. Debido a la homogeneidad en sus frecuencias alélicas, estos no pueden ser utilizados como marcadores de asociación genética, ya que no cumplen con la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg, motivo por el cual no se continuo con el análisis de las muestras de pacientes con maloclusión clase III. **Conclusiones:** Los datos presentados sientan un precedente en cuanto a estudios de asociación genética relacionados a maloclusión clase III, ya que eran inexistentes para la población mexicana, y servirán como punto de partida para la realización de posteriores investigaciones, ayudando a tratar de esclarecer su etiología.

(Palabras clave: Maloclusión clase III, Gen IGF1, Gen VEGFA, SNP rs3730198, SNP rs374253522).

SUMMARY

Introduction: Genomics, in charge of mapping, sequencing and analysis of genomes has facilitated the identification and understanding of the function of genes; thus allowing study their relationship to diseases, seeking to understand, diagnose, treat and even prevent them. It seeks to make use of this discipline to clarify the etiology of Class III malocclusion, which is considered the malocclusion most in need of treatment and more complex. **Objective:** Validate the genes IGF1 and VEGFA SNP's rs3730198 y rs374253522 as genetic markers for class III malocclusion in Querétaro residents, previously reported as influencing factors in its etiology (Hajjar et al 2003; Rabie et al. 2002) in genetically heterogeneous populations, which seeks to validate in the Mexican population, whose genetic background is mixed. **Methodology:** An observational, descriptive and analytical study was conducted. The study group was selected of the patients who were clinically diagnosed with class III malocclusion from January to September of 2015 and a control group conformed by Querétaro residents, making a total of 33 family triads. After the registration of general data, obtained by the informed consent and had made the recollection of the epithelial examples, of which were extracted the DNA; a genetic bank of both groups was created, the SNPs were chosen for each one of the genes. Later, a PCR amplification of the interest zone was conducted and also an analysis by restriction endonuclease was performed. **Results:** A gene bank by triads, of the clinically diagnosed with class III malocclusion people and the control group was created. Validation of Single Nucleotide Polimorfism (SNP) rs3730198 of gene IGF1 and rs374253522 of gene VEGFA in the control group was made, which presented and homogeneity allelic distribution, been = 1.0 for allele T and 0 for allele C on SNP rs3730198 of gene IGF1, and for SNP rs374253522 of gene VEGFA was reported an allelic frequency = 1.0 for allele G and 0 for allele A. Because of the homogeneity of the allelic frequency, they can't be used as genetic associated markers; they don't comply with the Hardy-Weinberg principle, reason why we couldn't continue with the analysis of the patients group. **Conclusions:** The data presented on this study is just the beginning of the genetic associated studies related to class III malocclusion, they will serve as a reference for further studies, helping to find the etiology of these pathology.

(Keys Words: Class II malocclusion, Gene IGF1, Gene VEGFA, SNP rs3730198, SNP rs374253522).

**A mi familia, en especial a mi mamá, por todo su apoyo;
a Rafael por siempre acompañarme y ayudarme a salir adelante,
y a Ponchito por siempre desvelarse conmigo.**

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mi familia por todo su apoyo durante todo este tiempo, a mi mamá, papá y hermana.

A Rafael por siempre ayudarme, escucharme y darme ánimos.

A mis amigos por su compañía a lo largo de esta etapa, en especial a Jimena y Blanca por brindarme una amistad inigualable.

A todos los doctores que nos guiaron en este camino, compartiendo sus conocimientos.

A la Universidad por darnos la oportunidad de seguir creciendo, al igual que al programa Foper y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todo su apoyo.

INDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCION.....	8
	JUSTIFICACION.....	9
	OBJETIVO GENERAL.....	9
	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	9
II.	REVISION DE LA LITERATURA.....	11
GENOMA HUMANO.....		11
	<i>POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEOTIDO.....</i>	<i>12</i>
	<i>MARCADOR GENETICO.....</i>	<i>14</i>
	<i>POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCION.....</i>	<i>15</i>
	<i>ENZIMAS DE RESTRICCION.....</i>	<i>16</i>
	<i>FACTORES DE CRECIMIENTO.....</i>	<i>17</i>
	FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF1).....	18
	FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGFA).....	19
	<i>ESTUDIOS DE ASOCIACION GENETICA.....</i>	<i>21</i>
III.	MALOCLUSION CLASE III.....	23
	<i>ETIOLOGIA.....</i>	<i>23</i>
	<i>PREVALENCIA.....</i>	<i>25</i>
	<i>DIAGNOSTICO.....</i>	<i>26</i>
	<i>TRATAMIENTO.....</i>	<i>28</i>
IV.	MATERIAL Y METODO.....	30
	3.1 DESCRIPCION DE LAS MUESTRAS EXPERIMENTALES.....	30
	CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	30
	CRITERIOS DE INCLUSION.....	30
	CRITERIOS DE EXCLUSION.....	31
	CRITERIOS DE ELIMINACION.....	31
	3.2 METODOS, TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCION DE MUESTRAS.....	31
	EXTRACCION DEL ADN.....	32
	PROCESO DE SELECCIÓN DEL SNP.....	33
	AMPLIFICACION POR PCR EN LA ZONA DE INTERES.....	34
	ANALISIS POR RESTRICCION.....	34
V.	RESULTADOS.....	36
VI.	DISCUSION.....	38
VII.	CONCLUSIONES.....	41
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	42

INDICE DE TABLAS E IMÁGENES

TABLA III.1 LOS SNP'S Y LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN SELECCIONADAS PARA CADA GEN.....35

TABLA IV.1 FRECUENCIAS ALÉLICAS ENCONTRADAS DEL SNP PARA CADA GEN ESTUDIADO EN LA POBLACIÓN CONTROL QUERETANA...36

IMAGEN IV. 1 IMAGEN REPRESENTATIVA DEL PRODUCTO DE PCR Y DE LA DIGESTIÓN POR ENDONUCLEASA TSPRI DE LA ZONA QUE CONTIENE EL SNP RS3730198 DEL GEN IGF1 DE 3 MUESTRAS, DONDE SE OBTUVO UN FRAGMENTO DE 1000 BASES NITROGENADAS; EN ESTE CASO SE OBSERVA QUE LAS MUESTRAS FUERON DIGERIDAS POR LA ENDONUCLEASA.....37

IMAGEN IV. 2 IMAGEN REPRESENTATIVA DEL PRODUCTO DE PCR Y DE LA DIGESTIÓN POR ENDONUCLEASA TSPRI DE LA ZONA QUE CONTIENE EL SNP RS374253522 DEL GEN VEGFA DE 3 MUESTRAS, DONDE SE OBTUVO UN FRAGMENTO DE 200 BASES NITROGENADAS; EN ESTE CASO SE OBSERVA QUE LAS MUESTRAS NO FUERON DIGERIDOS POR LA ENDONUCLEASA..... 37

TABLA V.1 DATOS COMPARATIVOS DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DEL SNP RS3730198 DEL GEN IGF1 OBTENIDOS EN HAPMAP MEX Y EN ESTA INVESTIGACIÓN..... 39

TABLA V.2 DATOS COMPARATIVOS DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DEL SNP RS374253522 DEL GEN VEGFA OBTENIDOS EN THE EXOME AGGREGATION CONSORTIUM (EXAC) Y EN ESTA INVESTIGACIÓN..... 40

I. INTRODUCCION

La genómica, visualizada como una disciplina científica encargada del mapeo, secuenciación y análisis de los genomas, ha facilitado la identificación y comprensión de las formas de organización y función de los genes de los organismos, lo cual ha generado un amplio conocimiento de la estructura y la función de los genomas.

La Medicina Genómica, que es la aplicación del conocimiento del genoma humano a la práctica de la Medicina, tiene como campo de acción identificar dichas variaciones; abre una nueva perspectiva para entender los procesos biológicos de salud y enfermedad e influye de manera directa acerca de cómo percibir las distintas afecciones.

Las variaciones del genoma y su relación con la enfermedad son claves muy importantes para entender, diagnosticar, tratar y quizá incluso prevenir algunas enfermedades. De esta manera, la medicina genómica permitirá la creación de una nueva y mejor práctica clínica, más predictiva y personalizada.

El estudio propuesto busca realizar la validación de los genes IGF1 y VEGFA como marcadores genéticos, dichos genes han sido previamente reportados en la literatura como factores influyentes en la etiología de la maloclusión clase III (prognatismo) (Hajjar et al. 2003; Rabie et al. 2002) en poblaciones heterogéneas genéticamente, motivo por el cual se desean validar en la población mexicana, que a diferencia de las ya estudiadas previamente, cuenta con un trasfondo genético mixto.

Este estudio busca establecer los principios para la generación de una base de datos genéticos confiable, aun inexistente para nuestra población.

Dentro de la clasificación de maloclusiones, la clase III es la de menor prevalencia, pero se le considera la maloclusión con mayor necesidad de tratamiento y, más complejo, ya que suele requerir no solo de un enfoque ortodóncico, sino además, suele ir acompañado de un enfoque quirúrgico, cuando no es tratada tempranamente.

JUSTIFICACION

En la actualidad la genómica y la medicina genómica con herramientas útiles que deben ser utilizadas para entender todos los procesos biológicos y la composición del genoma humano, así como las patologías que lo afectan. Se debe tratar de esclarecer la etiología, el diagnóstico, tratamiento y primordialmente propiciar la prevención de cada una de ellas, para mejorar la salud de la población.

El campo de la odontología, en específico la ortodoncia, no debe rezagarse en este aspecto, es por ello que es de primordial importancia aplicar estas herramientas en nuestra área.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere que las maloclusiones ocupan el tercer lugar como problema de salud oral, y aun cuando la mayoría de las enfermedades bucales y, en particular las maloclusiones, no ponen en riesgo la vida del paciente, son consideradas problemas de salud pública debido a su alta prevalencia.

En la actualidad se considera que la maloclusión clase III tiene una etiología multifactorial, como resultado de la interacción entre los factores ambientales y de herencia. Es por ello que se busca esclarecer el papel que la herencia y la genética juegan en esta patología.

OBJETIVO GENERAL

Validar los genes IGF1 y VEGFA, SNP's rs3730198 y rs374253522 como marcadores genéticos para la presencia de maloclusión clase III en la población de la ciudad de Querétaro.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterización de la población de estudio.
- Conocer y validar la heterogeneidad de los marcadores genéticos para el gen IGF1 para la presencia de maloclusión clase III en la población de la ciudad de Querétaro.

- Conocer y validar la heterogeneidad de los marcadores genéticos para el gen VEGFA para la presencia de maloclusión clase III en la población de la ciudad de Querétaro.
- Determinar la presencia y frecuencia de los marcadores genéticos para el gen IGF1 para la presencia de maloclusión clase III en la población de la ciudad de Querétaro.
- Determinar la presencia y frecuencia de los marcadores genéticos para el gen VEGFA para la presencia de maloclusión clase III en la población de la ciudad de Querétaro.

II. REVISION DE LITERATURA

GENOMA HUMANO

A fines de la década del '80 nace el Proyecto Genoma Humano con la finalidad de obtener la cartografía completa del genoma humano, y poder así estudiar las secuencias de nucleótidos. Gracias a estos estudios, se están descifrando las bases de nuestra herencia y, estos se vuelcan rápidamente en diversas direcciones; una de ellas, el diagnóstico y la causa de las enfermedades genéticas y multifactoriales. (Bergel, 1998).

El genoma de un organismo es todo el material genético o ADN que está organizado en paquetes de información o genes. Los genes tienen la información codificada para la síntesis de proteínas, las proteínas son las moléculas que dan las características morfológicas o estructurales a los organismos, esto es: qué apariencia tienen, qué funciones realizan y qué grado de especialización poseen, es decir, codifican los fenotipos (presentación clínica o expresión de un gen, factores ambientales o ambos). (Griffiths, 1999; Sánchez, 2002; Sevilla, 2007; Perci, 2010).

El material genético consiste en un tipo particular de moléculas denominadas genéricamente ácidos nucleicos (desoxirribonucleico ADN y ribonucleico ARN). (Sánchez, 2002).

El ADN es un ácido nucleico formado por nucleótidos, cada uno de ellos formado por tres elementos: un azúcar, la desoxirribosa; un grupo fosfato y una base nitrogenada. Existen cuatro bases nitrogenadas que pueden conformar al ADN: Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G); que unidas entre sí forman hélices. La secuencia de bases colocadas con una disposición única y con la capacidad de transmitir información dentro de la célula para sintetizar una proteína o para promover una función, es lo que operativamente constituye un gen. (Griffiths, 1999; Sánchez, 2002; Perci, 2010).

El gen es la unidad fundamental de la herencia; son las unidades de información y se agrupan o compactan dentro de unas estructuras celulares denominadas cromosomas. (Perci, 2010).

Se estima que el genoma humano puede contener aproximadamente 3 billones de pares de bases y todas estas moléculas están contenidas dentro de 23 pares de cromosoma en cada célula del cuerpo humano, normalmente. (Sevilla, 2007).

Múltiples enfermedades tienen un componente genético, ya sea heredado o como respuesta del organismo a factores ambientales; por lo tanto se consideran desordenes multifactoriales (Sánchez, 2002; Sevilla, 2007).

Las variaciones genéticas en este tipo de enfermedades pueden tener un rol protector o patogénico en la expresión de la enfermedad, es decir, juegan algún rol en la susceptibilidad. (Hirschhorn, 2005; Sevilla, 2007).

Los resultados derivados del proyecto del genoma humano han permitido identificar errores o cambios en los genes originales, que son la causa o que contribuyen a la enfermedad. El objetivo final de la medicina basada en la información genética, es desarrollar nuevas formas de tratar o curar e, idealmente, prevenir enfermedades. (Sánchez, 2002; Perci, 2010).

POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEOTIDO (SNPs)

Se refiere al genoma humano como una secuencia única de nucleótidos, pero realmente existen múltiples variaciones en esta secuencia. Las diferencias entre individuos se deben mayormente a mutaciones o alternativas de una sola base en la cadena, conocidas como SNPs (Single Nucleotide Polimorphism). Son polimorfismos de un solo nucleótido y se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma. (Wang, 2005; Sevilla, 2007; Chorley, 2008; Ramírez, 2013).

El uso de SNPs es una herramienta poderosa para el análisis genético, que permite descubrir la asociación entre el loci y los sitios específicos en el genoma, en muchas enfermedades. (Bentley, 2000).

Los SNPs son las mutaciones más comunes, representan aproximadamente el 90% de todas las variaciones, se estima que ocurren cada 100-300 pares de bases. (Sevilla, 2007; Chorley, 2008; Ramírez, 2013).

En cuanto al efecto que producen, las hay de varios tipos:

- Las *missense mutations* (cambio de sentido) son las que producen la transcripción de un aminoácido alternativo, debido al cambio que se produce en la secuencia de 3 bases o codón que codifica tal aminoácido.
- Las *nonsense mutations* (sin sentido) son más deletéreas, ya que cambian el codón de transcripción por un stop codon; el cual causa la terminación de la transcripción de la proteína, en vez de un nuevo aminoácido.
- Otra mutación es la *frameshift mutation* (cambio de marco), la cual cambia el marco de lectura del gen y lleva generalmente a un stop codon prematuro. (Sevilla, 2007; Chorley, 2008; Ramírez, 2013).

En términos del efecto funcional:

- Las *silent mutations* (silenciosas) producen el reemplazo de una base por otra que resulta en un codón que codifica el mismo aminoácido.
- Así mismo, las mutaciones pueden no cambiar el fenotipo si el cambio de aminoácido en la proteína no genera cambios significativos en la función de la misma (*conservative mutations*).
- Sin embargo, las *nonconservative mutations* reemplazan un aminoácido por uno muy diferente y es más probable que afecten el fenotipo. (Sevilla, 2007; Ramírez, 2013).

Las mutaciones pueden causar enfermedad por varios mecanismos. El más frecuente es la pérdida de función. En este caso, la mutación puede cambiar el fenotipo por disminución de la actividad funcional de la proteína que codifica dicho gen; aunque también se pueden presentar mutaciones que causen la enfermedad a través de la ganancia de función. (Sevilla, 2007).

Las mutaciones que se encuentran en el 98,5% del genoma no-codificante, no afectan el fenotipo; pero las que se sitúan en sitios regulatorios, pueden ser importantes en la etiología de las enfermedades. (Ramírez, 2013).

Las mutaciones regulatorias actúan alterando la expresión de un gen, llevando a la inhibición de la expresión o a la expresión inesperada en un tejido

donde debería ser silente, o finalmente a un cambio en el timing de expresión. (Ramírez, 2013).

Actualmente se han descrito más de 10 millones de SNP, aunque se ha estimado que existen aproximadamente 20 millones de ellos (Sevilla, 2007; Ramírez, 2013).

Los SNP que tienen implicaciones funcionales sobre los niveles de expresión génica se denominan SNP reguladores (rSNP), mientras que los que alteran la traducción de los ARN mensajeros (ARNm), el corte y empalme, la eficiencia para potenciar o inhibir el corte y empalme, la estabilidad de los ARNm y la función de las proteínas (sin alterar su estructura) se denominan SNP ARN estructurales (srSNP). (Johnson, 2008; Sadee, 2009, 2011; Ramírez, 2013).

MARCADOR GENÉTICO

Un marcador genético es un gen o posición en el genoma que existe en dos o más alelos distinguibles y cuya herencia puede ser, por lo tanto, seguida a través de un cruce genético, permitiendo mapear la posición de un gen a determinar. (Sevilla, 2007). Se definen como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente utilizada en el análisis genético (Rieger, 1982) o como cualquier medio para identificar cualquier locus específico en un cromosoma. (Gale, 1994).

Se puede utilizar como marcador el efecto de un gen fácilmente observable en los individuos, metabolitos característicos de bajo peso molecular, proteínas que puedan extraerse y observarse con facilidad tras un fraccionamiento mediante electroforesis, o segmentos de DNA que puede obtenerse e identificarse por toda una serie de técnicas moleculares. (Pérez de la Vega, 1993).

Para ser informativo un marcador debe estar presente en formas alélicas alternativas en los individuos en estudio, y para una mayor utilidad es

necesario saber dónde se localiza en un cromosoma específico. (Pérez de la Vega, 1993, 1997).

Los polimorfismos como los SNPs y los microsatélites son ejemplos de marcadores genéticos. (Sevilla, 2007).

Los marcadores de uso generalizado pueden clasificarse en función de la técnica empleada para la obtención de los segmentos discretos de DNA: aquellos que se obtienen tras la fragmentación del genoma correspondiente con endonucleasas de restricción (restrictasas), y aquellos que se obtienen por amplificación selectiva de secuencias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction). (Pérez de la Vega, 1997).

POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

Los polimorfismos obtenidos mediante restrictasas son conocidos como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphisms). En este caso los fragmentos discretos de DNA generados por una restrictasa son separados por electroforesis en gel, visualizándose selectivamente determinados fragmentos mediante la hibridación con sondas marcadas. (Pérez de la Vega, 1997).

El nivel de polimorfismo, y también la naturaleza del propio marcador, determina su utilidad en función del conjunto de organismos a estudiar. (Claros, 2001).

Esta técnica detecta las diferencias en longitud de segmentos de DNA y la pérdida o ganancia de dianas para una restrictasa. Los cambios en la movilidad electroforética de un fragmento de DNA generados por una restrictasa indican diferencias en la longitud del fragmento debidas a inserciones o deleciones. Los cambios en el número de fragmentos junto con la aparición de otros indican la pérdida o ganancia de dianas de restricción para tal enzima causadas generalmente por la sustitución de bases en la diana. (Claros, 2001).

Es decir, la técnica consiste en cortar DNA genómico extraído de una muestra de tejido con una endonucleasa de restricción. Muestras del DNA de cada individuo pueden ser cortadas con diferentes enzimas y analizadas separadamente. Los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis en gel, normalmente de agarosa. (Pérez de la Vega, 1997).

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

La tecnología del ADN recombinante fue uno de los principales factores que contribuyeron al rápido progreso del conocimiento sobre la expresión de genes, la base de esta técnica es la capacidad de manipular moléculas de DNA en el tubo de ensayo. A su vez, esto depende de disponer de enzimas purificadas, con actividades conocidas, que pueden ser controladas y que, por lo tanto, pueden emplearse para efectuar cambios específicos en las moléculas de DNA que se están manipulando. (Gómez, 2008).

Las enzimas son proteínas cuya acción biológica consiste en la catálisis de las reacciones del metabolismo, las cuales transcurrirían muy lentamente sin su intervención. (Montero, 1997).

Dentro de estas enzimas se encuentran las nucleasas que degradan las moléculas de DNA rompiendo los enlaces fosfodiéster entre nucleótidos ubicados en los extremos de dos moléculas diferentes o en los dos extremos de una misma molécula. Las endonucleasas de restricción permiten cortar las moléculas de DNA en posiciones definidas. (Brown, 2007).

Una endonucleasa de restricción es una enzima que se une a una molécula de DNA en una secuencia específica y corta la doble cadena en esa secuencia o cerca de ella. Dada la especificidad de la secuencia, es posible predecir las posiciones de los cortes dentro de una molécula de DNA, asumiendo que se conoce la secuencia de DNA, lo que permite escindir segmentos definidos de una molécula más grande. (Brown, 2007; Gómez, 2008; Lamont, 2015).

Hay tres tipos de endonucleasas de restricción. Los tipos I y III no permiten ejercer ningún control estricto sobre la posición del corte respecto de la secuencia específica de la molécula de ADN reconocida por la enzima. Las enzimas de tipo II no presentan esta desventaja, porque el corte siempre ocurre en el mismo lugar, dentro de la secuencia de reconocimiento o muy cerca de ella. Por lo tanto genera una serie reproducible de fragmentos cuyas secuencias son predecibles si se conoce la secuencia de la molécula de ADN diana. (Lamont, 2015).

Tras el tratamiento con una endonucleasa de restricción, se pueden examinar los fragmentos de DNA resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa para determinar su tamaño. Si el DNA inicial es una molécula relativamente corta y se producen veinte fragmentos o menos después de la restricción, suele ser posible seleccionar una concentración de agarosa que permita visualizar cada fragmento con una banda distinta en el gel. Si el DNA inicial es largo y, por ende, da origen a numerosos fragmentos tras la digestión con una enzima de restricción, entonces, con cualquier concentración de agarosa que se utilice, el gel puede mostrar solo un frotis de DNA, pues hay fragmentos de todas las longitudes posibles que se fusionan juntos. Este es el resultado habitual cuando se corta el DNA genómico con una enzima de restricción. (Brown, 2007).

Si se conoce la secuencia del DNA inicial, es posible predecir las secuencias y, por ende, los tamaños de los fragmentos resultantes del tratamiento con una enzima de restricción particular. Después, se puede identificar la banda de un fragmento deseado, cortarla del gel y purificar el DNA. Aunque no se conozca su tamaño, se puede identificar un fragmento que contiene un gen u otro segmento de DNA de interés mediante la técnica denominada hibridación Southern, siempre que se conozcan o se pueda predecir parte de la secuencia dentro del fragmento. (Brown, 2007).

FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento corresponden a un conjunto de moléculas de naturaleza proteica y/o péptidos biorreguladores cuya funcionalidad fundamental radica en el control del ciclo celular regulando el desarrollo de las

distintas etapas de éste, llevando finalmente a las células a enfrentar el mecanismo mitótico y de este modo generar la proliferación celular. (Carpenter, 1990; Cornejo, 2011). Sin embargo, estas moléculas orgánicas participan también estimulando tanto la diferenciación como la migración celular. (Cornejo, 2011).

Son secretados por varios tipos de células relacionadas directamente con la regulación de la proliferación y diferenciación celular y por el incremento de la proliferación celular, susceptibilidad alterada a la apoptosis y modificaciones en la morfología celular, aunque fueron inicialmente postulados como mediadores circulantes de las acciones de la hormona del crecimiento y como factores semejantes a la insulina. (Lenz, 2007).

Los factores de crecimiento están relacionados con sistemas complejos que incluyen factores estructurales y funcionales, sus receptores y, en muchos casos, proteínas de unión o proteoglicanos. (Lenz, 2007).

FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF1)

IGF1 (Insuline-Like Growth Factor 1) es un gen codificante de proteínas. Antiguamente se le denominaba somatomedina. La IGF-1 fue definida por primera vez en 1987 por un equipo de investigadores británicos y franceses. (Puche, 2013).

El gen del IGF1 ha sido localizado en el brazo largo del cromosoma 12 en la banda 23; contiene al menos 5 exones codificantes y expresa una proteína de 70 aminoácidos. (Moreno, 1996).

Se denominan así gracias a las hormonas peptídicas cuya estructura química es parecida a la de la insulina. Se encuentran en diferentes tejidos, en mayor proporción en el hígado, corazón, riñón, bazo, cerebro y músculo liso; y en menor proporción circulando en el sistema vascular o por fluidos extracelulares transportado por unos complejos con proteínas específicas de unión. (Ibero, 2002; Zoids, 2011).

Son secretadas por el hígado con el estímulo de la hormona del crecimiento (GH), y se transportan a través de la vía sanguínea del cuerpo humano. El 90% del IGF-I circulante es de origen hepático. (Ibero, 2002; Zoids, 2011).

Son sintetizados por una gran variedad de células, incluidos el hueso y el cartílago. Esta hormona actúa sobre el crecimiento del cartílago de conjunción de los huesos largos. (Ibero, 2002; Zoids, 2011).

IGF-I circula en la sangre unida a sus proteínas transportadoras (IGFBP) e interactúa con receptores específicos en los órganos diana tales como músculo, hueso, intestino y testículos. Actúa en los tejidos uniéndose a un receptor específico situado en la membrana de las células. Este receptor es muy parecido al receptor de la insulina, y puede interactuar con otros receptores como el de la insulina o el de IGF-II, pero con mucha menor afinidad. Mientras que la insulina tiene efectos endocrinos predominantemente sobre el hígado, tejido adiposo y músculo, IGF-I tiene efectos paracrinos, endocrinos y autocrinos en casi todos los órganos incluyendo el sistema inmune. (Jones, 1995; Blomsma, 1997).

El efecto fundamental del IGF1 es el de promover la división celular, así como la formación de la matriz en el cartílago. Es responsable de parte de las acciones de la GH. Desde el punto de vista metabólico, provoca hipoglucemia e incrementa el flujo plasmático renal y el ritmo de filtración glomerular. (Moreno, 1996; Zoids, 2011).

La concentración de IGF-I en suero depende de la secreción de GH, edad, sexo y estado nutricional. En esencia, el IGF-I es un factor anabolizante o factor de crecimiento. En el metabolismo proteico reduce la proteólisis y estimula la síntesis proteica cuando la oferta de aminoácidos es adecuada. (Conchillo, 2007; Moreno, 1996).

FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGFA)

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA), es una proteína señalizadora, Es un potente factor angiogénico, implicado en la vasculogénesis (formación de novo del sistema circulatorio embrionario) y en

la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). (Kim, 2007; Robbins, 2009; Pacheco, 2014; Yi, 2016).

El VEGFA fue identificado en los años 80's como un factor de permeabilidad vascular (VPF) y como un factor de crecimiento específico de células endoteliales vasculares codificado por el gen VEGFA. La principal función del sistema VEGFA es controlar la formación de nuevos vasos sanguíneos y la protección de células endoteliales y de la granulosa. (Rosales, 2012).

El gen del VEGFA está localizado en el cromosoma 6p21.3 y está constituido por ocho exones y siete intrones. (González, 2004; Kim, 2007; Vidaurreta, 2010; Yi, 2016). Se trata de un gen muy polimórfico en el que se han descrito al menos 15 SNP. Algunos de los polimorfismos descritos en este gen (-2578C > A, -1154G > A, -634G > C y +936C > T) han sido asociados a variaciones en la producción de proteína. (González, 2004; Vidaurreta, 2010).

Juega un importante papel en la regulación de la angiogénesis mediante la promoción de crecimiento de células vasculares endoteliales, migración y formación de lumen. (Yi, 2016). Es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular. (Duffy, 2000; Robbins, 2009).

También es capaz de inducir un cambio proinflamatorio, observado en los procesos de inflamación crónica, que incluyen acumulación de leucocitos, deposición de colágeno y remodelación de los vasos sanguíneos. (Yi, 2016).

Las acciones del VEGFA han sido estudiadas en las células del endotelio vascular, aunque también tiene efectos sobre otros tipos celulares; se expresa en numerosas células no endoteliales, incluyendo células tumorales, macrófagos, plaquetas, queratinocitos y células renales. (Duffy, 2000; Robbins, 2009).

Las actividades de VEGFA no se limitan al sistema vascular, juega un papel importante en las funciones fisiológicas normales, tales como la formación de hueso, hematopoyesis, sanación de heridas y el desarrollo. (Duffy, 2000; Robbins, 2009).

VEGFA es producido por los condrocitos hipertróficos en la placa de crecimiento, donde coordina a la matriz extracelular, provoca la remodelación de la angiogénesis y formación ósea; además juega un papel central en la hematopoyesis. Se expresa en la médula ósea y en la estimulación de citoquinas de las células madres hematopoyéticas. (Duffy, 2000).

Algunos tipos celulares que liberan VEGFA son tumorales, folículo-estelares de la pituitaria anterior, musculo liso, vascular y miocardio, mesangiales, monocitos, fibroblastos, queratinocitos, osteoblastos y astrocitos. (Caramelo, 1998).

La expresión del gen VEGFA está regulada por una variedad de factores de crecimiento (similar a la insulina, de crecimiento epitelial, de crecimiento tisular beta), citoquinas, hormonas e hipoxia, (Kim, 2007) productos avanzados de glicosilacion, interleuquina 1 y 6, radicales libres de O₂, adenomas y metales de transición. (Caramelo, 1998).

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA

Las dos principales metodologías usadas para mapear las variantes genéticas que influyen el riesgo de enfermedad son los estudios de linkage disequilibrium y los estudios de asociación. (Sevilla, 2007).

Los estudios de asociación genética buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo. Buscan relacionar un marcador genético particular con una enfermedad a través de una población. (Cardon, 2001; Carlson, 2004; Cheh, 2005; Hirschhorn, 2002, 2005; Kwok, 2001; Lohmueller, 2003; Sevilla, 2007; Tabor, 2002; Wang, 2005).

Estos están siendo utilizados para descubrir el componente genético que subyace a las enfermedades comunes de alta prevalencia. (Sevilla, 2007).

Habitualmente, se utilizan como marcadores genéticos a los polimorfismos simples puntuales (SNPs), que son utilizados para el mapeo y ubicación de los verdaderos sitios relevantes. (Sevilla, 2007).

Cuando se planea un estudio de asociación genética, se consideran cuatro componentes: (Sevilla, 2007).

- a- *Selección del fenotipo.*
- b- *Enrolamiento* (diseño del estudio): los individuos pueden ser elegidos en base a su fenotipo o como miembros de una cohorte.
- c- *Selección de marcadores genéticos:* requeridos para genotipificar. Pueden ser marcadores individuales, o que abarquen genes, regiones de cromosomas o en última instancia, el genoma entero. Los SNPs son la forma más frecuente de polimorfismo en el genoma, y por lo tanto serán la vasta mayoría de los marcadores en un estudio de mapeo del genoma total.

Existen dos acercamientos para establecer la relación entre variantes genéticas y riesgo de enfermedad: el estudio de “SNP candidato” y la “asociación indirecta”.

El estudio de “SNP candidato” es un test directo de asociación entre una variante putativa funcional y el riesgo de enfermedad. En este caso, se establece un gen candidato de antemano en base a estudios previos o evidencia experimental biológica.

Por su parte, la “asociación indirecta” consiste en testear un mapa denso de SNPs para la asociación con la enfermedad.

Los marcadores son elegidos basados en 4 criterios: 1) la probabilidad previa de ser funcionales, 2) la correlación con potenciales variantes causales, 3) ser variaciones de tipo missense (que producen la transcripción de un aminoácido alternativo) detectadas por secuenciamiento del ADN y 4) debido a consideraciones tecnológicas.

- d- *Métodos de análisis de asociación:* para testear la asociación entre el genotipo y el fenotipo.

MALOCCLUSION CLASE III

De los distintos tipos de maloclusiones, la maloclusión clase III es posiblemente la más estudiada desde el punto de vista genético. A comparación de las clases I y II, la clase III es la menos común, pero es en la que se hace mayor referencia a un componente etiológico hereditario. (Frazier-Bowers, 2009).

Las maloclusiones son habitualmente variaciones clínicamente significativas de la fluctuación normal del crecimiento y morfología; resultado de una alteración en posición, tamaño y forma de los maxilares, su relación con los dientes y con otras estructuras faciales. (Barahona, 2006; Avalos, 2014).

ETIOLOGIA

Se considera que tienen una etiología multifactorial, siendo las dos causas principales:

1) Factores hereditarios o genéticos. (Klempner, 2003; Barahona, 2006; Hernández, 2010; Alarcón, 2011; Tomaszewska, 2013; Avalos, 2014).

2) Factores ambientales: trauma, agentes físicos, hábitos y enfermedades. (Klempner, 2003; Barahona, 2006; Hernández, 2010; Alarcón, 2011; Tomaszewska, 2013; Avalos, 2014).

Es frecuente que sean el resultado de una compleja interacción entre varios factores que influyen en el crecimiento y desarrollo, y no siempre es posible describir un factor etiológico específico. (Avalos, 2014).

La etiología de la Maloclusión clase III es multifactorial, por un lado la herencia desempeña un importante papel en el desarrollo de ésta, siendo señalada por autores como Markowitz, como una transmisión poligénica no ligada al sexo. (Da Silva, 2005; Ramírez, 2010).

Históricamente el ejemplo más famoso de marca genética en seres humanos que se transmitió a través de muchas generaciones, es el pedigrí de la mandíbula en la familia Habsburgo de la monarquía Húngaro/Austriaca, el cual

se transmitió como un rasgo autosómico dominante y fue descrita en 1937 por Strohmayer. (Strohmayer, 1937, Da Silva, 2005; Quintero, 2007).

Debido a la evidencia que apoya el hecho de que las estructuras craneofaciales están bajo un control genético y son significativas en el desarrollo craneofacial, se les debe considerar en la etiología de la maloclusión. (Da Silva, 2005).

La influencia de la herencia en la aparición de esta displasia ha sido ampliamente reportada; los estudios de la relación craneofacial en gemelos han suministrado información útil concerniente al papel de la herencia en la maloclusión. Esto fue comprobado en un estudio realizado por Markowitz, sobre 15 parejas de gemelos y 7 de mellizos: en los gemelos 14 coincidían con maloclusión Clase III y en los mellizos sólo una pareja presentó la maloclusión. (Da Silva, 2005).

Tomaszewska refiere que se considera al prognatismo como un defecto autosómico dominante con penetración incompleta o autosómica recesiva; así como la existencia de mutaciones y polimorfismos responsables del prognatismo mandibular, apoyando así la teoría de herencia poligénica, como etiología del prognatismo. (Tomaszewska, 2013).

Estos reportes, aunados a otros estudios de asociación genética hechos tanto en gemelos mono y dicigóticos (Shulze y Weize, 1965) donde se encontró que el prognatismo ocurre hasta 6 veces más en gemelos monocigotos, que gemelos dicigotos (Tomaszewska, 2013); así como el estudio realizado por Litton et al. en 1970, donde se estudiaron las familias de 51 individuos con maloclusión clase III y se encontró que esta se presentaba en el 13% de los parientes consanguíneos, se concluye la existencia de una relación con la herencia en la descendencia y los hermanos, en una cifra mayor en relación a otras maloclusiones, apuntando a un origen poligénico de la patología (Litton et al., 1970; Da Silva, 2005; Watanabe et al., 2005); aunque existen también reportes que relacionan este padecimiento con factores ambientales. (Stiles y Luke, 1953; Kraus et al. 1959; Mossey, 1999).

También se ha establecido ampliamente que muchas alteraciones craneofaciales no son desórdenes monogénicos sino que son una combinación de la interacción de muchos genes con el ambiente, es decir poligénica. Cada maloclusión tiene su aspecto distintivo de la relación genética/ambiente, la dificultad está en la determinación de la contribución precisa para cuantificar el efecto de cada una. En todo caso, si el patrón genético influye más que el ambiente, el pronóstico ortodóncico será menos favorable. (Da Silva, 2005).

Estudios de análisis de linaje (“linkage analysis”) (Yamaguchi et al. 2005; Frazier-Bowers et al. 2009) y de asociación genética (GWAS) en varias poblaciones a nivel mundial han revelado genes que se encuentran asociados a la susceptibilidad de padecer esta condición. Entre ellos se encuentran: IGF1 (Hajjar et al. 2003) y VEGFA (Rabie et al. 2002). El estudio de la función de estos genes y su contribución a la maloclusión clase III está en curso y seguramente permitirá el esclarecimiento de los procesos biológicos involucrados en este fenotipo.

PREVALENCIA

La prevalencia de esta maloclusión se ha reportado con gran variación, dependiendo del nivel de homogeneidad en el trasfondo genético de las poblaciones estudiadas.

En poblaciones caucásicas se ha reportado una prevalencia del 0.48% hasta un 5% (Emrich, 1965; Da Silva, 2005; Quintero, 2007; Frazier-Bowers, 2009; Ramírez, 2010; Tomaszewska, 2013).

En las poblaciones asiáticas la frecuencia es mucho mayor, 4-13% (Da Silva, 2005; Quintero, 2007; Tomaszewska, 2013); reportándose un 10% en la población japonesa (Nakashima et al. 1986) y del 4.9 al 8.1% en poblaciones de origen chino (Zhang et al. 1991).

En Europa se reportó una frecuencia de entre 1.5% a 5.3% (Quintero, 2007; Ramírez, 2010).

Se ha encontrado que este índice se ha incrementado en América central, reportándose una frecuencia del 8.3% en una población de mexicanos-americanos (Da Silva, 2005; Ramírez, 2010); en Venezuela, Saturno (1978) reportó una prevalencia de 4.2% y Betancourt (1986) un 1.3% (Da Silva, 2005); mientras que Medina en el 2010, reportó un 15.03% (Gutiérrez, 2015). Así mismo, se han reportado las frecuencias de países como Brasil con un 17% en el 2011 y Costa Rica con un 14.35% en el 2012. (Gutiérrez, 2015).

En nuestro país las frecuencias reportadas han variado, encontrado un 27.4% en Puebla en el 2000 (Gutiérrez, 2015), 35.85% en Monterrey en el 2008 (Gutiérrez, 2015), 17.6% en el 2009 en la Cd. de México (Gutiérrez, 2015), y un 9.6% reportado por Tokunaga en la UNAM en el 2011 (Gutiérrez, 2015); en Hermosillo, Sonora la frecuencia reportada es del 14.5% en el 2013 por Villasana (Gutiérrez, 2015); Talley reporta un 13.3% en un estudio realizado en la UNAM en el 2007 (Talley, 2007).

La frecuencia puede aumentar notablemente en zonas geográficas aisladas en las que abunda la consanguinidad. (Da Silva, 2005).

DIAGNOSTICO

Para los ortodoncistas, las displasias más difíciles de tratar son las clases III, lo que pudiera ser debido a interferencias oclusales funcionales o a discrepancias esqueléticas entre ambos maxilares, ya sea desde el punto de vista terapéutico, como en el aspecto de pronóstico, pudiéndose encontrar en dentición mixta, decidua tardía y permanente. (Pachecho, 2001; Klempner, 2003; Hernández, 2010).

CLASE III

La maloclusion clase III presenta heterogeneidad clínica y puede encontrarse asociado con variantes morfológicas dentales y esqueléticas.

Angle en 1899 realizó la primera clasificación de las maloclusiones, describiendo la Clase III como la



posición mesial del primer molar inferior con respecto a la cúspide mesiovestibular del primer molar superior. (Ustrell, 2002).

Actualmente han aparecido muchas otras clasificaciones donde ya no se tiene en cuenta únicamente esta referencia; se describe la Clase III como una combinación de cambios dentoalveolares y esqueléticos en los tres planos del espacio: transversal, vertical y sagital. (Espinar, 2011).

Las maloclusiones pueden ser debidas a causas dentoalveolares, esqueléticas o una combinación de ambas. (Espinar, 2011).

Los individuos con maloclusiones clase III tienen un componente tanto esquelético como dentoalveolar, y puede ser causadas por: (Hernández, 2006; Nardoni, 2015).

- Una retrusión maxilar y una mandíbula normal.
- Un maxilar normal y prognatismo.
- Una combinación de ambos, retrusión del maxilar y prognatismo.

En la literatura se han reportado casos en donde la causa mayoritaria de este padecimiento es de origen óseo, resultado de un prognatismo. (Staudt y Killiardis, 2009).

Moyers introdujo el concepto de “Síndrome de Clase III”, donde añadió a la clasificación de Angle aspectos como la discrepancia de la longitud de arcada, problemas esqueléticos u óseos, disfunciones musculares, problemas dentarios (mordidas cruzadas, anteriores o posteriores, con o sin compensación dentaria) y perfil facial del paciente, donde destaca el aplanamiento de la cresta malar, deficiencia del tercio medio facial o la prominencia del labio inferior. (Espinar, 2011).

El diagnóstico de una maloclusión clase III puede ser realizado con el uso de la cefalometría de STEINER (Hernández, 2010) basándose en la medición de las siguientes angulaciones:

- Ángulo SNA: si se encuentra por debajo de la norma (82°), podemos encontrar una retrusión maxilar y la mandíbula en norma.

- Ángulo SNB: si excede de la norma (80°), indica prognatismo.
- Ángulo ANB: nos indica la relación existente entre los dos maxilares, teniendo como norma 2° .
- Ángulo SND: las medidas mayores a la norma (76°) indican prognatismo.

Las características cefalométricas que presentan los pacientes clase III son: ángulo SNA disminuido, base maxilar corta, ángulo SNB aumentado y base mandibular larga, ángulo ANB de cero o negativo; base craneal anterior corta y base craneal posterior larga, ángulo gonial obtuso. (Arias, 2002; Romero, 2010).

Clínicamente, los pacientes presentan una alteración estética de perfil cóncavo mayor a 175° , mordida cruzada anterior o contacto borde a borde, una depresión de la región infra orbital (pómulos aplanados), reborde orbitario hipoplásico (globo ocular por delante más de 4mm), tercio medio disminuido, el labio superior puede ser corto o retruido y resalta el labio inferior y barbilla que da un aspecto de agresividad al gesto facial, desbalance entre el surco nasal y submentoniana, aplanamiento del surco mandibular, y la ubicación mesial del primer molar mandibular en relación con el primer molar maxilar, además de, la protrusión del incisivo superior y retrusión del incisivo inferior (Warren, 1990; Arnett, 1993; Czarnecki T, 1993; Proffit y Fields, 2000; Tahnmina, 2000; Mendez, 2001; Arias, 2002; Klempner, 2003; Romero, 2010).

TRATAMIENTO

El tratamiento para la maloclusión clase III dependerá de la presentación clínica de esta, la edad del paciente y el grado de severidad con que se presente.

El tratamiento para un paciente adulto con maloclusión clase III esquelética, requiere descompensación dentoalveolar y procedimientos combinados de ortodoncia y cirugía, con el propósito de lograr una oclusión normal y mejorar la estética facial. (Andrade, 2013).

Aproximadamente el 4% de la población tiene una deformidad dentofacial que requiere tratamiento ortodóncico-quirúrgico para corregirla,

siendo una de las indicaciones más comunes las clases III esqueléticas severas, en pacientes que ya no están en crecimiento. ((Mas-Gáslac, 2011; Andrade, 2013).

La mayoría de las personas con maloclusiones clase III tienen problemas dentoalveolares y esqueléticos y solo la minoría de casos podrían ser tratados solo con ortodoncia. Los pacientes con discrepancias clase III esqueléticas severas, frecuentemente son tratados con cirugía ortognática maxilar, mandibular o bimaxilar en combinación con tratamiento ortodóncico. (Barahona, 2006; Andrade, 2013; Avalos, 2014).

III. MATERIAL Y METODO

3.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS EXPERIMENTALES.

Se realizó un estudio de tipo observacional, descriptivo, analítico.

La población estudiada se seleccionó de los pacientes que acudieron a consulta a los posgrados de Ortodoncia y Odontopediatría de la Clínica Odontológica “Benjamín Moreno Pérez” de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, y fueron diagnosticados clínicamente con maloclusion clase III, del periodo de enero a septiembre del 2015; así como una población control, residentes de la ciudad de Querétaro, formando un total de 33 triadas familiares (madre, padre e hijo, o hermano en caso de no encontrarse alguno de los padres), quienes aceptaron formar parte de la investigación y firmaron el consentimiento informado.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

-CRITERIOS DE INCLUSION

Los participantes fueron seleccionados basándose en los siguientes criterios:

POBLACIÓN CONTROL:

- Obtención del consentimiento informado, en caso de ser menor, autorizado por el padre o tutor.
- Individuos no diagnosticados clínicamente con maloclusión clase III.
- Individuos cuyos familiares directos aceptaron participar y no fueron diagnosticados con maloclusión clase III.

PACIENTES CON MALOCLUSION CLASE III:

- Obtención del consentimiento informado, en caso de ser menor, autorizado por el padre o tutor.

- Pacientes diagnosticados clínicamente con maloclusión clase III, basándose en la clase esquelética según el análisis cefalométrico de Steiner y/o la clase molar de Angle.
- Pacientes cuyos familiares directos aceptaron participar.

-CRITERIOS DE EXCLUSION

POBLACIÓN CONTROL:

- Individuos mal diagnosticados clínicamente.

PACIENTES CON MALOCLUSION CLASE III:

- Pacientes mal diagnosticados clínicamente.
- Pacientes con maloclusión clase III asociada a algún síndrome.

-CRITERIOS DE ELIMINACION

- Individuos que decidan no colaborar, no firmen el consentimiento informado o no se presenten a la toma de muestra.
- Individuos que se ser necesario, no se pueda repetir la toma de muestra epitelial.
- Individuos en quienes no se haya podido obtener una muestra de ADN de buena calidad.
- Individuos en quienes que presenten anomalías cromosómicas en el locus de interés.

3.2 MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

1. Se obtuvo la autorización del paciente, padre o tutor, para formar parte de la investigación mediante la firma del consentimiento informado.

2. Se revisó el expediente clínico de los pacientes diagnosticados con maloclusión clase III, que acudieron a la clínica odontológica “Benjamín Moreno Pérez” de la FMUAQ en el período de enero a septiembre de 2015.

3. Se solicitó al paciente y/o familiar responder un cuestionario, que sirvió como registro de las variables sociodemográficas de los participantes.

4. Se recolectó la muestra de epitelio bucal de cada participante mediante el siguiente método modificado de Aidar M y Line S, 2007:

- Se solicitó a cada paciente realizar cepillado dental, y durante una hora, no consumir alimentos ni bebidas, así como no tener contacto oral con alguna otra persona.
- Una vez transcurrida la hora, se solicitó a los participantes colocar una solución de 5ml de sucralosa al 3% contenido en un tubo de ensaye estéril a temperatura ambiente en la cavidad oral, sin tragarlo, realizar enjuagues vigorosos durante un minuto.
- Transcurrido el minuto se depositó la muestra en el mismo tubo de ensaye, agregándosele 3ml de TNE (17mM Tris/HCl (pH 8.0), 50mM NaCl y 7 mM de EDTA) diluida en una solución al 66% de etanol.

5. Una vez obtenidas las muestras, se procesaron para la obtención del ADN, mediante el siguiente método modificado de Aidar M y Line S, 2007:

EXTRACCION DEL ADN

- Se realizó centrifugación de las muestras epiteliales obtenidas durante 10 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se lavó y resuspendió el pelet en 1ml de una solución de TNE.
- Se centrifugó nuevamente a 2000 rpm por durante 5 minutos y, nuevamente se eliminó el sobrenadante.
- El pelet se vortexeo durante 15 segundos y se agregaron 1.3ml de solución de Lisis (10mM Tris (pH 8.0), 5% SDS, 5mM EDTA) y 10µl de proteinasa K (20mg/ml).

- La mezcla se vortexeó por 15 segundos a velocidad máxima, seguida por una incubación de 12 horas a 55°C.
- Después de la incubación, se transfirieron 700ul a un tubo eppendorf de 1.5ml conteniendo 250 ul de Acetato de Amonio 8M/1mM EDTA.
- Se mezcló en vortex a máxima velocidad por 5 segundos.
- Se centrifugó en microfuga a máxima velocidad por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Posteriormente se transfirieron 800 ul del sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 540 ul de Isopropanol. Mezclando 20 veces por inversión.
- Se precipito a -80°C por mínimo una hora.
- Se centrifugó en microfuga refrigerada a 4°C a máxima velocidad por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante.
- Se agregó 1ml de etanol 70% frio a -20°C. centrifugnado en microfuga refrigerada a 4°C a máxima velocidad por 10 minutos.
- Se decantó el sobrenadante y se secó el exceso de etanol en toallas absorbentes limpias. Se dejó secar al aire por 15 minutos.
- Se resuspendió el DNA en 100ul de TE.
- Se midió la concentración de DNA en nanodrop en las siguientes diluciones 1:25, 1:50 y 1:100.

Se creó un banco genético de ambos grupos, control y de pacientes diagnosticados clínicamente con maloclusión clase III, con las muestras obtenidas.

PROCESO DE SELECCIÓN DE SNP

Se realizó una búsqueda de polimorfismos únicos de nucleótidos (SNP's) contenidos en los genes de interés mediante la información obtenida en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Los SNP's contenidos en dichos genes fueron seleccionados como marcadores moleculares de acuerdo a los siguientes criterios:

- Que causen un cambio en el marco de lectura.
- No tengan un efecto en el marco de lectura.

- Se encuentren localizados en zonas regulatorias (i.e splicing, 3'UTR, 5'UTR).

Se seleccionaron aquellos SNP's que causan la creación o deleción de un sitio reconocido por endonucleasas de restricción. Este análisis se hizo mediante el programa *nebcutter*, disponible en el sitio <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>.

AMPLIFICACION POR PCR DE LA ZONA DE INTERES

Una vez seleccionados los SNP's, se diseñó un par de "primers" para amplificar la zona alrededor del SNP (un par de primers por SNP) mediante la técnica de PCR ("Polimerase Chain Reaction" o Reacción en Cadena de la Polimerasa), la cual es una técnica que permite amplificar secuencias específicas de ADN multiplicando el número de copias que se pueden obtener de un fragmento de ADN.

Se utilizó como templado el ADN colectado de muestras controles. El diseño de estos primers se realizó mediante el programa Primer3 del Massachusetts Institute of Technology, localizado en el sitio http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi. Una vez diseñados, se ordenó su síntesis a la compañía IDT technologies.

La longitud del fragmento a amplificarse se seleccionó gracias a:

- 1) La presencia de sitios óptimos para el diseño de los primers.
- 2) El número de veces que aparezca el sitio de restricción en la totalidad del fragmento respecto al producido por el SNP. En cada caso se optimizaron independientemente las condiciones para la amplificación de cada uno de los SNP's escogidos.

ANALISIS POR RESTRICCIÓN

El mapeo mediante RFLP (polimorfismos que afectan la longitud de un fragmento mediante restricción enzimática) es una técnica utilizada para identificar diferencias en secuencias homólogas de ADN que pueden ser

detectadas por la presencia de fragmentos de distinto tamaño después de una reacción de restricción con endonucleasas específicas.

Tabla III.1 Los SNP y las endonucleasas de restricción seleccionadas para cada gen.

Gen	SNP	Cambio	Enzima	
GEN IGF1	rs3730198	C/T	Ninguno	TspRI
GEN VEGFA	rs374253522	A/G	R [Arg] ⇒ Q [Gln]	TspRI

IV. RESULTADOS

El presente estudio analizó la frecuencia alélica del SNP rs3730198 del gen IGF1 y del SNP rs374253522 del gen VEGFA en 33 familias queretanas seleccionadas de la población queretana, por triadas, para validar la frecuencia de estos alelos, únicamente en el grupo control.

Después de aplicar un cuestionario para obtención de datos sociodemográficos, obtener el consentimiento informado y realizar la recolección de la muestra epitelial de la cual se extrajo el ADN, se realizó la selección de SNP's para cada gen y posteriormente una amplificación de la zona de interés por PCR y un análisis por endonucleasa de restricción se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla IV.1 Frecuencias alélicas encontradas del SNP para cada gen estudiado en la población control queretana.

SNP	GEN	Tipo de cambio	Cambio alélico	Cambio de AA	Alelo 1	Alelo 2	Endonucleasa	Secuencia de corte	Alelo encontrado = 1.0
rs3730198	IGF1	utr variante 3 prima	utr variante 3 prima	Ninguno	C	T	TspRI	CASTG	T
rs374253522	VEGFA	Missense	CGG ⇒ CAG	R [Arg] ⇒ Q [Gln]	A	G	TspRI	CASTG	G

Imagen IV. 1 Imagen representativa del producto de PCR y de la digestión por endonucleasa TspRI de la zona que contiene el SNP rs3730198 del gen IGF1 de 3 muestras, donde se obtuvo un fragmento de 1000 bases nitrogenadas; en este caso se observa que las muestras fueron digeridas por la endonucleasa.

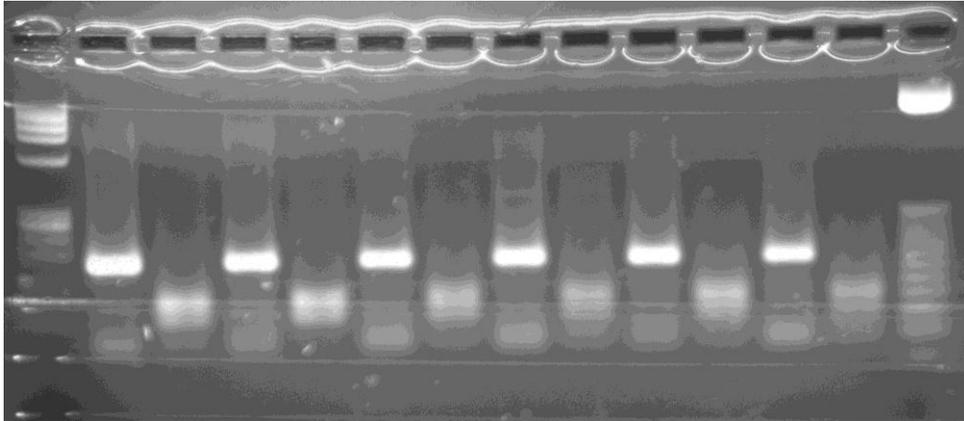
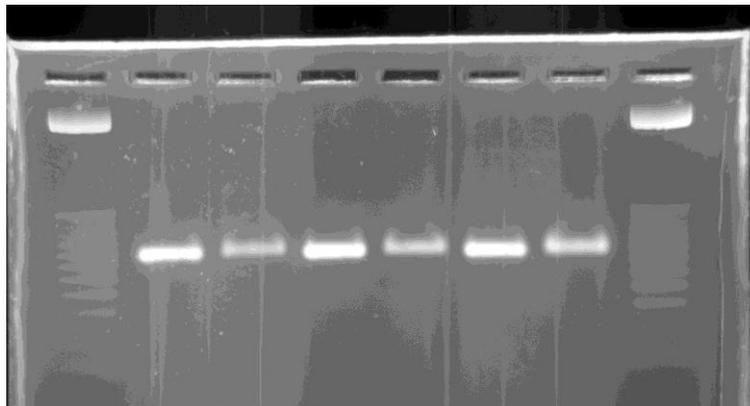


Imagen IV. 2 Imagen representativa del producto de PCR y de la digestión por endonucleasa TspRI de la zona que contiene el SNP rs374253522 del gen VEGFA de 3 muestras, donde se obtuvo un fragmento de 200 bases nitrogenadas; en este caso se observa que las muestras no fueron digeridos por la endonucleasa.



V. DISCUSIÓN.

Frazier-Bowers et al. reportaron un estudio de análisis de linaje realizado en 4 familias hispanas con integrantes portadores del fenotipo clase III, donde se usaron 500 microsatélites como marcadores. El pedigrí y los análisis de linaje revelaron que el fenotipo clase III (principalmente por deficiencia maxilar) se hereda de forma autosómica dominante, ubicado a los locus 1p22.1, 3q26.2, 11q22, 12q13.13, y 12q23 y a los genes IGF1, HOXC y COL2A1, ubicados en la región 12q23, como los de interés, al igual que para esta investigación. (Frazier-Bowers, 2009, Xue, 2010).

Rao y Guo refieren igualmente el loci 12q23 como uno de los sitios de interés en los estudios de linaje relacionados a este fenotipo. (Rao, 2001; Frazier-Bowers, 2009).

Baker, Woods y Sutter coinciden al considerar a IGF1 como un gen con interés biológico, localizado en la región 12q23, en relación al tamaño del cuerpo mandibular, tanto en humanos, como en ratones. (Frazier-Bowers, 2009).

El proyecto Internacional HapMap, el cual tiene como objetivo crear un mapa de haplotipos del genoma humano refiere información coincidente con la obtenida en esta investigación, encontrándose una frecuencia alélica similar para el SNP rs3730198 del gen IGF1.

Los datos referentes a la población mexicana, fueron obtenidos durante la realización de la fase III de este proyecto, realizada en 1,301 muestras tomadas de 11 poblaciones. Se seleccionó un grupo de personas con ascendencia mexicana que radica en la ciudad de Los Angeles, California.

Aunque el estudio no se realizó en una población residente dentro de nuestro país, se aseguró que todos tuvieran ascendencia mexicana, y es hasta el día de hoy, el único estudio que reporta datos referentes a la distribución alélica del SNP rs3730198 del gen IGF1 en nuestra población.

Se analizaron 100 muestras de ADN, obtenidas de muestras sanguíneas recolectadas por triadas familiares (padre, madre e hijo). Todos los

participantes “padres” afirmaron que al menos 3 de los 4 abuelos habían nacido en México.

Tabla V.1 Datos comparativos de la frecuencia alélica del SNP rs3730198 del gen IGF1 obtenidos en HapMap MEX y en esta investigación.

Investigación	Número de muestras	Frecuencias alélicas	
HapMap MEX	100	C = 0.09000000	T = 0.91000003
Actual investigación	99	C = 0	T = 1.0

Brighthton, Gerber y Folkman coinciden al referir que el crecimiento, reparación y remodelación ósea son eventos biológicos que dependen de la angiogénesis. Se ha demostrado una relación funcional entre las células endoteliales y los osteoblastos durante la osteogénesis y se considera al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA) como un mediador importante de los procesos angiogénicos involucrados en la fisiología ósea. (Rabie, 2002).

VEGFA estimula las células endoteliales para secretar factores de crecimiento y citoquinas que influyen en la diferenciación de células mesenquimales que participan en la osteogénesis. (Triffitt, 1998).

Tomaszewska refiere que VEGFA tiene un rol esencial en la diferenciación de los condrocitos, por lo cual se considera un potencial marcador en la investigación de las causas genéticas de la maloclusión clase III (prognatismo mandibular). (Tomaszewska, 2013).

Actualmente no se encuentran estudios que refieran la distribución alélica para el SNP rs374253522 del gen VEGFA para la población mexicana, por lo que se considera que la información obtenida en este estudio es un punto de partida importante para la realización de estudios posteriores.

La frecuencia alélica reportada para dicho SNP en el estudio realizado por The Exome Aggregation Consortium (ExAC) donde se analizaron a 60,706 individuos con diversidad étnica, incluidos 5,789 individuos con ascendencia latina, es coincidente con la reportada en el presente estudio.

Tabla V.2 Datos comparativos de la frecuencia alélica del SNP rs374253522 del gen VEGFA obtenidos en The Exome Aggregation Consortium (ExAC) y en esta investigación.

Investigación	Número de muestras	Frecuencias alélicas	
The Exome Aggregation Consortium (ExAC)	60, 706 de los cuales 5, 789 (latinos)	A = 0.00000824	G = 0.99999177
Actual investigación	99	A = 0	G = 1.0

VI. CONCLUSIONES

Los productos obtenidos gracias a esta investigación son:

La creación de un banco genético por triadas, de población control y de pacientes diagnosticados clínicamente con maloclusión clase III residentes del estado de Querétaro; el cual era inexistente antes de comenzar con este estudio.

Así mismo se realizó la validación de los Polimorfismos de Nucleótidos Simples rs3730198 del gen IGF1 y rs374253522 del gen VEGFA en la población control residente del estado de Querétaro.

Se reportaron las frecuencias alélicas para cada Polimorfismo de Nucleótido Simple para la población control, información inexistente previamente.

Los resultados obtenidos muestran que los Polimorfismos de Nucleótido Simple rs3730198 para el gen IGF1 y rs374253522 para el gen VEGFA presentan homogeneidad en sus frecuencias alélicas, motivo por el cual no pueden ser utilizados como marcadores de asociación genética, ya que no cumplen con la ley del equilibrio de Hardy – Weinberg y no se prosiguió a realizar el mismo análisis en muestras de pacientes diagnosticados con maloclusión clase III.

Los datos obtenidos durante la presente investigación sientan un precedente en cuanto a estudios de asociación genética de la maloclusión clase III, ya que se obtuvieron datos inexistentes para la población mexicana, que servirán como punto de partida para la realización de posteriores investigaciones y ayudarán a tratar de esclarecer la etiología de dicha patología.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Aidar M, Line S. A simple and cost-effective protocol for DNA insolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007 18(2): 148-152.
2. Alarcón RT, Gutiérrez G, Soldevilla LC. Corrección de una maloclusión de clase III con disyunción y máscara facial en una paciente adolescente. *Congreso Ortodoncia 2011*;1(1):38-43.
3. Andrade J, Gurrola B, Casasa A. Maloclusión clase III esquelética: tratamiento, ortodóncico-quirúrgico con osteotomía maxilar, genioplastia mandibular y reducción del mentón. *Revista latinoamericana de ortodoncia y odontopediatría.* 2013. 1-23.
4. Arias L, Rodríguez, Casasa A. Corrección quirúrgica y ortodóncica. *Revista Dentista y Paciente.* 2002; 10(115).
5. Arnett GW, Bergman RT. Facial heys to orthodontic diagnosis and treatment planning. Part I. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1993; 103:299-312.
6. Avalos GM, Paz AN. Maloclusión clase III. *Revista Tamé.* 2014; 3 (8): 279-282.
7. Barahona JB, Benavides J. Principales análisis cefalométricos utilizados para el diagnóstico ortodóncico. *Revista científica odontológica.* 2006;2(1):5-27.
8. Bentley DR. The human Genome Project – An Overview. *Med Res Rev,* 20, No. 3, 189-196, 2000.
9. Bergel SD. La declaración universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humano. *Cuadernos de Bioética* 1998/2^a. 1998. 387-405.
10. Blomsma MC, De Knegt RJ, Dullaart RPF. Insulin-like growth factor-1 in liver cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 27: 1133-8.
11. Brown T. *Genomas.* Ed. Médica Panamericana. 3° ed. Madrid, España. 2007. Cap. 2 Estudio del AND. 33-66.
12. Caramelo C et al. Papel del factor de crecimiento vascular (VEGF) en la respuesta proliferativa endotelial. *Nefrología.* 1998. 18(1): 112-114.
13. Cardon LR, Bell JI.. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2001;2(2):91-9.
14. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature* 2004;429:446-452.
15. Carpenter G, Cohen S. Epidermal Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry.* 1990; 265(14): 7709-7712.
16. Cheh CN, Hirschhorn J. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutation Research* 2005;573(1-2):54- 69.
17. Chorley BN, Wang X, Campbell MR et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing thecnologies. *Mutant Res.* 2008; 659(1-2): 147–157.

18. Claros MG, Avila C, Canovas M. Biología aplicada: diseño experimental y análisis de datos. Septem ediciones. 2001
19. Conchillo M, Prieto J, Quiroga J. Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) y cirrosis hepática. Rev. Esp. Enferm. 2007; 99(3): 156-164.
20. Cornejo R. Epidermal Growth Factor and Mammary Epithelial Differentiation. Int. J. Morphol., 2011. 29(3): 821-824.
21. Czarnecki T, Ram S, Currier F. Perception of balanced facial profile. Am J Orthod Dentofac Orthop 2000.
22. Da Silva L. "Consideraciones Generales en el Diagnóstico y tratamiento de las Maloclusiones Clase III" Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatria. 2005; 1-17.
23. Díaz V. El genoma humano: una mirada del futuro hacia el presente. Derecho y cultura. 2002. 81-86.
24. Duffy AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. Madame Curie Bioscience Database. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000.
25. Emrich RE, Brodie AG, Blayney JR. Prevalence of class I, class II, and class III malocclusions (Angle) in an urban population; an epidemiological study. J Dent Res 1965;44:947-53.
26. Espinar E. et al. Tratamiento temprano de las Clases III. Rev Esp Ortod. 2011; 41: 79-89.
27. 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;88:56-60.
28. Gale, MD. Genetic markers, maps and wheat breeding. J. R. Agríc. Soc. Engl. 1994, 155:162-176.
29. Griffiths A. Genética moderna, Editorial McGraw Hill – Interamericana, 1999.
30. Gómez JA, Huete JA. Bioprospección de enzimas de restricción en bacterias de suelos y ambientes volcánicos de Nicaragua. Encuentro 2008 XL(81) 70-87.
31. González FR, Castilla MA, Álvarez MV. Papel del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la protección de las células endoteliales. Nefrología. Vol. XXIV(I). 2004. 6-7.
32. Gutiérrez JF, Reyes YS, López C, Rojas AR. Frecuencias de maloclusiones dentales en la clínica de la especialidad de ortodoncia de la Universidad Autónoma de Nayarit. Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatria. 2015: 1-8.
33. Hajjar D, Santos MF, Kimura ET. Propulsive appliance stimulates the synthesis of insulin-like growth factors I and II in the mandibular condylar cartilage of young rats. Arch Oral Biol 2003;48:635-42.
34. Hernández JA, Soto L. La máscara facial de protracción en el tratamiento temprano de la Maloclusión Clase III. Revista Estomatología, 2006; 14 (2): 6-11.
35. Hernández VM, Villegas JL, Pascu EB. Terapia con mascara facial. Virtual Journal of Orthodontics 2010; 7 (1): 2-10.

36. Hirschhorn JN. Genetic Approach to Studying Common Disease and Complex Traits. *Pediatric Research* 2005;57(5 Part 2):74R-77R
37. Hirschhorn et al. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002;4(2):45-61.
38. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet.* 2005;6(2):95-108.
39. Ibero I, Castro J, Bascones A. Factores de crecimiento y periodoncia. Una revisión bibliográfica actualizada. *Av Periodon Implantol.* 2002 ; 14(3) :115-128.
40. Johnson et al. Polymorphisms affecting gene transcription and mRNA processing in pharmacogenetic candidate genes: detection through allelic expression imbalance in human target tissues. *Pharmacogenet Genomics.* 2008 September; 18(9): 781–791.
41. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34.
42. Kim et al. VEGFA SNPs in AML. *British Journal of Haematology.* 2007; 140: 71-79.
43. Klempner LS. Early Orthopedic Class III treatment with a modified tandem appliance. *JCO* 2003; 37(4).
44. Kraus BS, Wise WJ, Frei RH. Heredity and the craniofacial complex. *Am J Orthod* 1959;45:172–217.
45. Kwok PY. Genomics. Genetic association by whole-genome analysis? *Science.* 2001;294(5547):1669-70.
46. Lamont R, Hajishengallis G, Jenkinson H. Microbiología e inmunología oral. Manual moderno 1º ed. México, D. F. 2015. Cap. 7 Genética y biología molecular de los microorganismos orales.
47. Lazarín J, Quiroz J, Ortiz F, García S. Estudio piloto: Medidas mandibulares en población infantil Mexicana de 8 años de edad, residente en la ciudad de México. *Revista Odontológica Mexicana.* 2010; 14 (2): 78- 84.
48. Lenz M, Ramírez G, Uribe L. Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (igf-1) en la regulación de la función ovárica. *Biosalud.* 2007; 6: 149-159.
49. Li Q, Zhang F, Li X, Chen F. Genome scan for locus involved in mandibular prognathism in pedigrees from China. *PLoS ONE.* 2010; 5(9): e1 2678.
50. Li Q, Zhang F, Li X, Chen F. The Identification of a novel locus for mandibular prognathism in the Han Chinese population. *J Dent Res.* 2011; 90(1): 53-57.
51. Litton SF, Ackermann LV, Isaacson RJ, Shapiro BL. A genetic study of Class III malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1970;58:565–77.
52. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Metaanalysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003;33(2):177-182.
53. Martínez-Ezquerro JD, Herrera LA. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología* 1 (2006): 83-96.

54. Mas-Gáslac FW, Soldevilla LC, Estrada VC. Tratamiento orto-quirúrgico de una deformidad dentofacial clase III. Congreso Ortodoncia 2011;1(1):32-7.
55. McGuire AL, Beskow LM. Informed consent in genomics and genetic research. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010;11:361-81.
56. Méndez, Pereira, Torres. Maloclusiones clase III. *Revista Dentista y Paciente.* 2011; 10(113).
57. Montero, C. Manual de técnicas de histoquímica básica. Editorial universitaria potosina. Cap. 16 Introducción de la histoquímica de las enzimas. 114-121.
58. Montiel M. Frecuencia de maloclusiones y su asociación con hábitos perniciosos en una población de niños mexicanos de 6 a 12 años de edad. *Revista ADM* 2004; LXI (6): 209-14.
59. Moreno E, Treguerres JA. Retrasos del crecimiento. Ed. Diaz de Santos. 2° ed. Madrid 1996. Cap. 5 Somatomedinas (IGFs) y sus proteínas transportadoras. 61-72.
60. Mossey PA. The heritability of malocclusion: part 2. The influence of genetics in malocclusion. *Br J Orthod* 1999;26:195–203.
61. Nakasima A, Ichinose M, Nakata S. Genetic and environmental factors in the development of so-called pseudo-and true mesiocclusions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1986;90: 106–16.
62. Nardoni DN, Siqueira DF, Cardoso MA, Capelozza L. Cephalometric variables used to predict the success of interceptive treatment with rapid maxillary expansion and face mask. A longitudinal study. *Dental Press J Orthod.* 2015; 20 (1): 85-96.
63. Pacheco J, Huerta D, Acosta O. Polimorfismo en el gen del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y su asociación con la preeclampsia. *An Fac med.* 2014;75(2):119-23.
64. Pacheco M, Rodríguez R, Casasa A. Corrección de una maloclusión clase III con ortopedia y ortodoncia. *Revista Dentista y Paciente* 2001; 10(113).
65. Pérez de la Vega, M. Biochemical characterization of populations. En 'Plant Breeding: Principles and Prospects'. M. D. Hayward, N. O. Bosemark & I. Romagosa Eds. Chapman & Hall. London. 1994. pp 184-200.
66. Pérez de la Vega, M. Organización y evolución del genoma eucariota. Marcadores moleculares. 3° Simposio Científico en Biología Celular y Molecular, 1997. 267-276.
67. Pierce. Genética. Un enfoque conceptual. 3° edición. Editorial Médica Panamericana S. A. Madrid, España 2010. Cap. 1 Introducción a la genética. 1-15
68. Pierce. Genética. Un enfoque conceptual. 3° edición. Editorial Médica Panamericana S. A. Madrid, España 2010. Cap. 10 DNA: la naturaleza química de los genes. 267-284.
69. Proffit WR, Fields HW. Contemporary Orthodontics, 3rd edn. St. Louis: The C.V. Mosby Co; 2000.

70. Puche JE. Mecanismos de las acciones neuroprotectoras inducidas por Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) en animales con deficiencia de esta hormona. Efectos de la administración exógena de IGF1. Madrid 2013. 1-65.
71. Quintero Y. Relación esquelética clase III con factor genético predominante. Reporte de un caso. Reporte CES Odontología. 2007; 20(2): 43-50.
72. Rabie AB, Shum L, Chayanupatkul A. VEGF and bone formation in the glenoid fossa during forward mandibular positioning. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2002;122:202–9.
73. Rabie AB, Tang GH, Xiong H, Hagg U. PTHrP regulates chondrocyte maturation in condylar cartilage. J Dent Res 2003;82: 627–31.
74. Ramírez J, Bulnes R, Guzmán R, Torres J, Priego H. Características y alteraciones de la oclusión en la dentición primaria en preescolares de 3 a 6 años en Tabasco, México. Odontología Pediátrica. 2011; 10 (1): 6-12.
75. Ramírez J, Muñoz C, Gallegos A, Rueda M A. Maloclusión clase III. Salud en Tabasco. 2010; 16(2-3): 944-950.
76. Ramírez J, Vargas G, Tovilla C, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. Gaceta Médica de México. 2013;149:220-8.
77. Rao DC, Gu C. False positives and false negatives in genome scans. Adv Genet 2001; 42:487-498.
78. Rieger, R., A. Michealis & M. M. Green 1982. Diccionario de Genética y Cito genética Clásica y Molecular. Alhambra, Madrid.
79. Robbins S, Cotran R, Kumar V. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Elsevier Saunders 8° ed., Philadelphia, 2009. Ch3-Tissue Renewal, Regeneration and Repair.
80. Romero BI, Estrada A. Máscara facial de pro tracción como tratamiento de maloclusiones clase III (reporte de caso clínico). Revista latinoamericana de ortodoncia y odontopediatría. 2010 1-12.
81. Rosales AM, Guzmán A. Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 2012, 3(1) 89-111.
82. Sadee W. Measuring cis-acting regulatory variants genome-wide: new insights into expression genetics and disease susceptibility. Genome Med. 2009;1:116.
83. Sadee W, Wang D, Papp AC, et al. Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. 2011;89:355-65.
84. Schulze C, Weise W. Zur Vererbung der Progenie. Fortschr Kieferorthop 1965;26:213–29.
85. Serna M, Meza S. La oclusión en niños con dentición primaria de la Ciudad de México. Revista ADM. 2005; LXII (2): 45-51.
86. Sevilla SD. Metodología de los estudios de asociación genética. Rev Insuf Cardíaca 2007; (Vol 2) 3:111-114.
87. Sevilla SD. Introducción a los estudios genómicos en insuficiencia cardíaca. Rev Insuf Cardíaca 2007;2;2: 70-72.

88. Staudt CB, Killiardis S. Different skeletal types underlying Class III malocclusion in a random population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;136:715–21.
89. Stiles KA, Luke JE. The inheritance of malocclusion due to mandibular prognathism. *J Hered* 1953;44:241–5.
90. Strohmayr, W. Die Vereburg des Hapsburger Familientypus. *Nova Acta Leopoldina*. 1937; 5, 219-296.
91. Taboada O, Torres A, Cazares C, Orozco L. Prevalencia de maloclusiones y trastornos del habla en una población preescolar del oriente de la Ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2011; 68(6):431-7.
92. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002;3(5):391-397.
93. Tahmina K, Tanaka E, Tanne K. Craniofacial morphology in orthodontically treated patients of Class III malocclusion with stable and unstable treatment outcomes. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2000; 117: 681-690.
94. Talley M, Katagiri M, Pérez H. Casuística de maloclusiones Clase I, Clase II y Clase III según Angle en el Departamento de Ortodoncia de la UNAM. *Revista Odontológica Mexicana* 2007; 11 (4): 175-80.
95. Triffitt JT, Joyner CJ, Oreffo ROC, Viridi AS. Osteogenesis: bone development from primitive progenitors. *Biochem Soc Trans*. 1998; 26: 21-7.
96. Ustrell J, Duran J. Ortodoncia, Ed. Textos Docents. 2002. España. Universidad de Barcelona.
97. Vidaurreta M, Sánchez R, Veganzones S, et al. Polimorfismos del gen del factor de crecimiento vascular endotelial en pacientes con cáncer colorrectal. *Rev. Esp. Enferm. Dig*. 2010; 102(1): 20-25.
98. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 2005;6(2):109-118.
99. Wang X, Tomso D, Liu X, Bell A. Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):84-90.
100. Warren DW. Keys to treatment plans for class III patients with skeletal discrepancies. *JCO* 1990.
101. Watanabe M, Suda N, Ohyama K. Mandibular prognathism in Japanese families ascertained through orthognathically treated patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005;128:466–70.
102. Xue F, Wong RW, Rabie ABM. Genes, genetics, and Class III malocclusion. *Orthod Craniofac Res*. 2010; 13: 69-74
103. Yamaguchi T, Maki K, Shibasaki Y. Growth hormone receptor gene variant and mandibular height in the normal Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;119:650–3.
104. 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;84:255–9.
105. Yi JP et al. VEGF and disease activity and sinovial lesions in RA. *Med Sci Monit*, 2016; 22: 316-324.
 106. Zhang ZK, Yu GY, Zheng LF. *Practical Stomatology*, 2nd edn. Beijing: People's Health Publishing House; 1991.
 107. Zhou J, Lu Y, Gao XH, Chen YC, Lu JJ, Bai YX et al. The growth hormone receptor gene is associated with mandibular height in the normal Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001;119:650–653.
 108. Zoidis E., Ghirlanda-Keller C., Schmid C. Stimulation of glucose transport in osteoblastic cells by parathyroid hormone and insulin-like growth factor I. *Mol. Cell. Biochem*. 348:33-42(2011).