

TRABALLO FIN DE GRAO:

- A BASE XENÉTICA DA MANDÍBULA HABSBURGO -



LAILA AL-SOUFI NOVO

Curso 2017 - 2018

Grao en Bioloxía - Facultade de Bioloxía

RESUMO DO TRABALLO

Neste traballo abordamos a relación entre a “mandíbula Habsburgo”, un claro exemplo de prognatismo mandibular, e a alta consanguinidade nesta dinastía a través dunha análise multivariante por compoñentes principais. Os datos manexados proveñen do exame clínico de 18 trazos dismórficos indicativos de prognatismo mandibular e deficiencia maxilar en retratos pictóricos de 15 personaxes da dinastía Habsburgo. Atopamos unha asociación positiva estatisticamente significativa entre o prognatismo mandibular e o coeficiente de consanguinidade, indicando unha base xenética recesiva para este trazo. Ademais, este traballo proporciona a primeira evidencia de depresión consanguínea sobre un trazo do rostro humano.

INTRODUCCIÓN

Os Habsburgo foron unha das familias reais europeas máis poderosas, gobernando en Europa dende o século XV ata principios do século XX. Tras o reinado de Carlos I (1500-1558), esta dinastía divídese en dúas ramas: a rama dos Habsburgo austríacos e a rama dos Habsburgo españois, na que se centra este estudo, que gobernou en España ata finais do século XVII [1]. Debido á duración e poder do seu reinado, é unha das dinastías reais mellor documentadas e retratadas, o que nos proporciona relevante información tanto da súa xenealoxía como das súas características faciais. Un dos trazos faciais máis característico, representado habitualmente nos seus retratos, é a súa gran mandíbula inferior, coñecida como a “mandíbula Habsburgo” (*Habsburg Jaw*). Ademais de ser un claro exemplo de prognatismo mandibular, pódense percibir nos retratos da familia outros trazos faciais como o labio inferior evertido, coñecido como o “labio Habsburgo”; o nariz cunha xiba dorsal, coñecido como o “nariz Habsburgo”; unha tendencia a aplanamento da área malar e unha eversión leve dos párpados inferiores [2].

O prognatismo mandibular, un dos trazos xenéticos máis coñecidos do rostro humano, é definido por OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) como a protrusión da mandíbula cun solapamento dos incisivos inferiores cos superiores. A protrusión mandibular, nun sentido amplo, pode deberse tanto a un crecemento excesivo da mandíbula inferior (prognatismo mandibular en sentido estrito) como ser o resultado dunha maxila pouco desenvolta (deficiencia maxilar) ou dunha combinación de ambas deformidades [3]. Neste traballo, consideraremos ambos trazos como causa de prognatismo mandibular, denotando como MP o prognatismo mandibular en sentido estrito, debido a unha hiperplasia mandibular; e como MD a deficiencia maxilar.

A “mandíbula Habsburgo”, tradicionalmente atribuída a unha hiperplasia da mandíbula inferior, podería deberse tanto a un prognatismo mandibular en sentido estrito como a unha deficiencia maxilar, involucrando a gran parte do rostro humano. A súa natureza foi investigada anteriormente usando dende moedas [4] ata retratos [5] para o seu diagnóstico. Un recente estudo, no que se avaliou o grado de MD e de MP en retratos dos reis Habsburgo españois, suxire que a causa primaria deste trazo é MD [5]. Neste estudo, Peacock e colegas tratan a “mandíbula Habsburgo” como un trazo cuantitativo, o que é clave para a súa análise, desenvolvendo uns índices para MD e para MP a partir dunha serie de trazos para ambas deformidades [5]. As análises cefalométricas do prognatismo mandibular de Juana de Austria conclúen tamén que se debe a unha deficiencia maxilar [6,7]. Non obstante, a orixe da “mandíbula Habsburgo”, un dos obxectos deste traballo, continúa sendo un tema controvertido.

O coñecemento da base xenética do prognatismo mandibular, clave para o seu tratamento, é bastante limitado, habendo varios estudos con resultados contraditorios. Este trazo facial presenta unha recurrencia familiar, o que suxire unha etioloxía xenética. Mais, seguramente, o prognatismo mandibular sexa un trazo multifactorial, non soamente determinado por un compoñente xenético, senón tamén por factores ambientais [3,8,9]. A heredabilidade (h^2) estimada deste trazo non é moi alta, variando dende 0,215 a 0,316 [3,8,10], aínda que, nun estudo, obtívose un valor de 0,843 [11]. Varios modelos de herdanza foron suxeridos para o prognatismo mandibular. A maior parte dos estudos de segregación, nos que se tratou o prognatismo mandibular como un trazo cualitativo, suxeriron un modo de herdanza dominante [3,12,13]. Nun destes estudos, onde se propuxo un xen maior dominante con penetrancia incompleta como causa deste trazo, analizáronse 13 familias europeas nobles levando a cabo o diagnóstico a través de retratos [12]. Á mesma conclusión chegaron outros estudos baseados na análise de segregación complexa (CSA) deste trazo que usaron para o seu diagnóstico cefalogramas, fotografías e modelos dentais [3,13]. Pola outra banda, existen estudos de segregación que conclúen que o prognatismo mandibular é un trazo polixénico influenciado por numerosos xenes de efecto menor, descartando unha transmisión mendeliana de xenes maiores para este trazo [8]. Nos últimos anos, leváronse a cabo múltiples estudos de asociación do xenoma completo (GWAS) nos que se busca unha asociación do prognatismo mandibular coa variación en certas rexións do xenoma [14,15,16,17] e que atoparon unha asociación deste trazo con múltiples loci diferentes, respaldando o modelo polixénico.

Debido á maior prevalencia do prognatismo mandibular na dinastía Habsburgo, caracterizada por un alto grado de consanguinidade [18], asúmese habitualmente unha relación deste trazo coa mesma [12], mais nunca foi demostrada empíricamente. Agora ben, a maior frecuencia deste trazo nesta familia tamén podería ser explicada por deriva xenética a causa dun tamaño baixo de poboación efectiva. A política de matrimonios causou que membros tanto da liñaxe española como austríaca dos Habsburgo acadasen altos coeficientes de consanguinidade (F), obtendo uns valores medios da F estimada a partir de pedigrees de $0,1287 \pm 0,0378$ para os Habsburgo españois e de $0,0790 \pm 0,0169$ para os Habsburgo austríacos [18], substancialmente superiores aos esperados na proxenie dun matrimonio de primos irmáns ($F = 0,0625$). En ambas ramas da dinastía, detectouse unha clara depresión consanguínea na supervivencia prerreprodutiva que causou, finalmente, a extinción dos Habsburgo españois a finais do século XVII [18,19,20].

O principal obxectivo deste traballo é esclarecer a posible relación entre a consanguinidade e a “mandíbula Habsburgo”, o que proporcionaría valiosa información sobre a base xenética deste trazo. É ben coñecido que unha das principais consecuencias da consanguinidade é o aumento da homocigosis producindo, por conseguinte, un incremento dos fenotipos recesivos [21]; polo que, unha asociación positiva da “mandíbula Habsburgo” coa consanguinidade, suxeriría unha base xenética recesiva para este trazo. Este resultado non sería compatible cos estudos de segregación anteriormente citados que propoñen un modo de herdanza dominante para este trazo. Neste traballo, a dinastía Habsburgo convírtese nun auténtico “laboratorio humano”, moi útil para o estudo da base xenética deste fenotipo grazas á súa consanguinidade tan variable, con valores do coeficiente de consanguinidade dende 0 ata máis de 0,25 [18].

OBXECTIVOS

Neste traballo, propuxémonos acadar catro obxectivos principais, enumerados a continuación:

1. Investigar a natureza da “mandíbula Habsburgo”. Esclarecer se é debida a un prognatismo mandibular, a unha deficiencia maxilar ou a unha combinación de ambas deformidades.
2. Averiguar se a “mandíbula Habsburgo” está directamente relacionada coa consanguinidade.
3. Estudar a base xenética e o modo de herdanza do prognatismo mandibular (MP) e da deficiencia maxilar (MD).
4. Analizar o posible impacto da consanguinidade sobre o rostro humano.

METODOLOXÍA DO TRABALLO

Co fin de establecer a base xenética de MD e MP, 18 trazos faciais dismórficos (Figura 1) foron diagnosticados en retratos dos Habsburgo españois polo equipo de cirurxiáns maxilofaciais dirixido polo Doutor Florencio Monje do *Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz*. Os personaxes avaliados foron 15 membros da rama española dos Habsburgo, 7 reis e 8 raíñas (Táboa 1), escolléndose, para cada un deles, entre 2 e 6 retratos, dando un total de 66 pinturas. A través destes cadros, avalíouse o grado de MD e MP dos 6 reis que constitúen toda a dinastía Habsburgo española, ademais do pai de Felipe I, o Emperador Maximiliano I. De todas as raíñas desta dinastía foron unicamente eliminadas da análise María I de Inglaterra (1516-1558), muller de Felipe II, xa que non tiveron fillos, e María de Portugal (1527-1545) da que non se atoparon retratos fiables.

Os retratos pictóricos foron escollidos, a diferenza do estudo realizado por Peacock e colegas [5], de maneira minuciosa e en base a unha serie de criterios. Un punto importante á hora de seleccionar os cadros foi a súa fiabilidade, sendo elixidos aqueles nos que constaba que o pintor viu persoalmente á persoa retratada. A maior parte dos cadros escollidos foron pintados por retratistas oficiais da corte como Juan Pantoja de la Cruz (1553-1608) ou Diego Rodríguez de Silva y Velázquez (1559-1660). Polo outro lado, analizáronse unicamente aqueles retratos dos que se dispoñen imaxes de alta calidade. A meirande parte das pinturas foron tomadas dalgúns dos museos máis prestixiosos do mundo como o *Kunsthistorisches Museum* en Viena ou o *Museo Nacional del Prado* en Madrid, o que permite comprobar a autoría de cada un dos cadros.

A análise clínica do grado de deficiencia maxilar (MD) e de prognatismo mandibular (MP), realizouse segundo os criterios establecidos por Peacock e colegas, sendo determinados a partir de 11 e 7 trazos dismórficos respectivamente (Figura 1). Os trazos para a análise de deficiencia maxilar foron: completa visualización do iris inferior sen superposición da pálpebra (MD1); exorbitismo (MD2); aplanamento perialar (MD3); sucros nasolabiais profundos (MD4); base nasal estreita, menor que a distancia intercantal (MD5); xiba nasal (MD6); punta nasal caída (MD7); ángulo nasolabial obtuso (MD8); labio superior fino (MD9); mandíbula superpechada por déficit maxilar vertical (MD10) e labio inferior prominente ou evertido (MD11); mentres que os trazos para o diagnóstico de prognatismo mandibular foron: aumento da distancia tiromental (MP1); tecidos brandos submentais non redundantes, tensos (MP2); ángulo goniaco obtuso, pouco definido (MP3); suco mentolabial plano ou pouco profundo (MP4), ángulo mentón-garganta agudo (MP5);

aumento da profundidade do tercio facial inferior aumentada, da distancia tragion-gnation (MP6) e pogonion 5 mm por diante do meridiano cero de González-Ulloa (MP7).

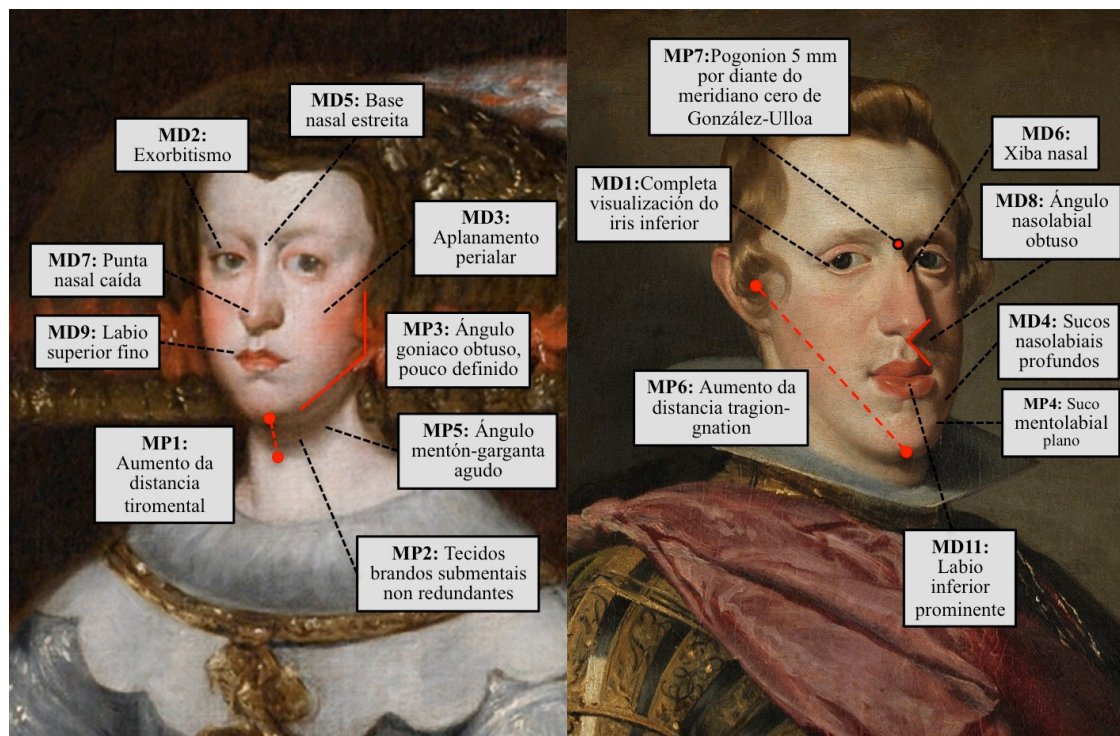


Figura 1. Trazos dismórficos analizados para a determinación de MD e MP indicados en Mariana de Austria e Felipe IV (modificación de imaxes obtidas do *Museo Nacional del Prado*).

Cada un dos 66 retratos pictóricos foi examinado independentemente por 11 cirurxíans maxilofaciais seguindo a metodoloxía de Peacock e colegas. En cada cadro, os cirurxíans examinaron os 18 trazos dismórficos, puntuando cada trazo cun 1 se estaba presente e cun 0 se estaba ausente ou non se podía determinar. Polo tanto, a máxima puntuación para MD é 11 e para MP é 7. Obteremos, para cada membro Habsburgo analizado, un valor total para cada trazo de MD e MP, sendo este a media da puntuación obtida nas distintas pinturas e polos distintos avaliadores (Táboa 1). Para a meirande parte das análises, partiuse do valor de MD e MP axustado ao sexo (MD_{adj} e MP_{adj}) mediante unha regresión lineal (Táboa 1).

Co fin de estudar o posible impacto da consanguinidade sobre o prognatismo mandibular e a deficiencia maxilar, dispoñemos do coeficiente de consanguinidade (F) de todos os membros Habsburgo avaliados (Táboa 1), o cal foi calculado a partir dun pedigree con, polo menos, 7 xeracións completas e na que se relacionaron máis de 6000 individuos [18].

Táboa 1. Coeficiente de consanguinidade (F), grado de deficiencia maxilar (MD) e prognatismo mandibular (MP) dos 15 membros da dinastía Habsburgo estudados. Indícanse tanto os valores de MD e MP brutos como axustados ao sexo (MDadj e MPadj).

Nome	F	MD	MP	MDadj	MPadj
Maximiliano I (1459 - 1519)	0,0003	5,8815	2,2500	1,5017	-1,6291
María de Borgoña (1457 - 1482)	0,0766	1,4962	0,8455	-1,5238	-0,8273
Felipe I (1478 - 1506)	0,0253	2,3000	1,3611	-2,0797	-2,5179
Juana de Castilla (1479 - 1555)	0,0394	3,4576	1,1742	0,4376	-0,4985
Carlos I (1500 - 1558)	0,0375	5,0850	4,9644	0,7053	1,0854
Isabel de Portugal (1503 - 1539)	0,1006	1,9924	1,4462	-1,0276	-0,2265
Felipe II (1527 - 1598)	0,1234	3,2833	4,0030	-1,0964	0,1239
Isabel de Valois (1546 - 1568)	0,0013	1,5864	1,4223	-1,4336	-0,2505
Ana de Austria (1549 - 1580)	0,1064	2,7318	1,8179	-0,2882	0,1452
Felipe III (1578 - 1621)	0,2177	3,1167	4,4116	-1,2631	0,5326
Margarita de Austria (1584 - 1611)	0,1391	6,4394	3,8512	3,4195	2,1785
Felipe IV (1605 - 1665)	0,1145	5,8583	5,2625	1,4786	1,3835
Isabel de Borbón (1602 - 1644)	0,0076	2,8788	1,4455	-0,1412	-0,2273
Mariana de Austria (1634 - 1696)	0,1559	3,5773	1,3789	0,5573	-0,2938
Carlos II (1661 - 1700)	0,2539	5,1333	4,9007	0,7536	1,0216

O efecto da consanguinidade sobre o grado de MD e MP, abordouse mediante unha análise multivariante, en concreto, a través dunha análise de compoñentes principais (PCA). Os trazos faciais humanos, como os avaliados nos distintos personaxes, presentan unha alta correlación xenética [22], sendo moi oportuno aplicar un método multivariante deste estilo. Se estes datos fosen analizados mediante unha análise univariante, as conclusións serían máis limitadas, xa que non se consideran os efectos conxuntos ou as interaccións entre as distintas variables [23].

A PCA permítenos reducir as 11 variables para MD e as 7 variables para MP a un pequeno número de índices chamados compoñentes principais (PCs) que son combinacións lineais das variables orixinais [24,25]. Os distintos PCs non están correlacionados entre si e están ordenados segundo a proporción da variación dos nosos datos orixinais que explican, puidendo quedarnos unicamente con aqueles que expliquen a meirande parte da varianza total. Estes primeiros compoñentes principais elixidos poden relacionarse coa consanguinidade, avaliando desta maneira o efecto global da consanguinidade sobre as distintas variables.

Tal e como indicamos antes, a aplicación dunha análise multivariante é especialmente útil cando as variables orixinais están altamente correlacionadas entre si [23,25]. Canto máis alta sexa a correlación entre as variables, maior vai ser a proporción de varianza explicada polos primeiros PCs e, quedándonos unicamente con estes, conservaremos a maior parte da información. Existen varios procedementos para comprobar a alta correlación das nosas variables. En primeiro lugar, analizamos a matriz de correlación entre as variables para MD e MP. Observamos que todas as variables para MP e para MD están, en maior ou menos medida, altamente correlacionadas entre si, coa maioría dos coeficientes de correlación lineal próximos a 1 ou a -1, especialmente no caso de MP (Táboa 2).

Para comprobar esta alta correlación entre as variables orixinais, levamos a cabo dous tests estatísticos: o contraste de esfericidade de Bartlett e a medida de adecuación muestral de Kaiser, Meyer e Olkin [26]. O test de esfericidade de Bartlett contrasta a hipótese nula da “esfericidade” ou ausencia de correlación, asumindo a normalidade dos datos. Se o valor p obtido é menor ao nivel de significación escollido (0,05), como no caso de MD e MP cun valor p de $1,219 \cdot 10^{-5}$ e $6,293 \cdot 10^{-10}$ respectivamente, podemos rexeitar a hipótese nula e concluír que existe correlación [23]. Pola outra banda, o índice de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) compara os valores das correlacións entre as variables e as súas correlacións parciais. Canto máis próximo a 1 sexa este índice, máis útil vai ser a análise por compoñentes principais dos datos. No noso caso, os valores deste índice son bastante cercanos a 1, especialmente para MP, cun índice de KMO de 0,78.

Táboa 2. Matriz de correlación entre as variables analizadas para MD e MP: indícanse os coeficientes de correlación de Pearson e os niveis de significación (valores p) dos coeficientes de correlación significativos.

	MD1	MD2	MD3	MD4	MD5	MD6	MD7	MD8	MD9	MD10	MD11	MP1	MP2	MP3	MP4	MP5	MP6	MP7
MD1	-	0,401	0,411	0,204	0,244	0,391	0,350	0,339	0,038	0,647	0,704	0,604	-0,116	0,724	0,793	0,341	0,741	0,629
MD2		-	0,451	0,646	0,398	0,674	0,528	0,159	0,508	0,538	0,393	0,484	-0,539	0,472	0,676	0,059	0,482	0,257
MD3			-	0,500	0,862	0,585	0,515	0,042	0,340	0,790	0,469	0,432	-0,414	0,536	0,442	0,082	0,712	0,431
MD4		0,009		-	0,431	0,896	0,305	0,234	0,419	0,520	-0,031	0,320	-0,627	0,248	0,464	-0,127	0,446	0,214
MD5			0,000		-	0,552	0,512	0,018	0,217	0,608	0,412	0,249	-0,196	0,280	0,250	0,141	0,511	0,279
MD6		0,006	0,022	0,000	0,033	-	0,328	0,369	0,417	0,592	0,166	0,474	-0,595	0,402	0,597	0,054	0,600	0,380
MD7		0,043	0,049				-	-0,064	0,517	0,512	0,485	0,265	-0,459	0,254	0,565	0,242	0,351	0,115
MD8								-	-0,323	0,195	0,054	0,241	-0,176	0,328	0,325	0,344	0,427	0,473
MD9							0,049		-	0,416	0,351	0,415	-0,416	0,349	0,340	0,067	0,233	0,151
MD10	0,009	0,039	0,000	0,047	0,016	0,020				-	0,710	0,805	-0,345	0,786	0,722	0,378	0,856	0,767
MD11	0,003									0,003	-	0,698	0,117	0,775	0,644	0,563	0,648	0,690
MP1	0,017									0,000	0,004	-	-0,116	0,827	0,713	0,644	0,817	0,898
MP2		0,038		0,012		0,019							-	-0,053	-0,464	0,397	-0,164	0,096
MP3	0,002		0,039							0,001	0,001	0,000		-	0,684	0,564	0,898	0,868
MP4	0,000	0,006				0,019	0,028			0,002	0,010	0,003		0,005	-	0,335	0,697	0,577
MP5											0,029	0,010		0,029		-	0,574	0,745
MP6	0,002		0,003			0,018				0,000	0,009	0,000		0,000	0,004	0,025	-	0,878
MP7	0,012									0,001	0,004	0,000		0,000	0,024	0,001	0,000	

Tras a análise previa da correlación entre as variables, aplicamos a PCA, partindo da matriz de correlación construída a partir dos nosos datos, en lugar da matriz de covarianza que adoita ser usada ao aportar unha maior información [23,25]. A razón pola que partimos da matriz de correlación é que as distintas variables, aínda que presentan unha mesma unidade de medida, amosan unha varianza moi heteroxénea que se move no rango 0,006 - 0,105 e, polo tanto, pesarian máis na análise aquelas cunha maior variabilidade. Esta diferente variabilidade débese, en parte, ao distinto erro que se comete ao diagnosticar os correspondentes trazos faciais de moi diferente natureza, atopando variables cunha desviación típica 4 veces maior e cunha varianza sobre 20 veces maior que outras. A conversión a unha matriz de correlación equivale a estandarizar as variables orixinais, tendo todas elas media 0 e desviación típica 1 e, polo tanto, o mesmo peso na nosa análise.

Toda a análise estatística dos datos foi levada a cabo co paquete estatístico R (*R Foundation for Statistical Computing 2011*, <http://www.R-project.org>).

RESULTADOS E DISCUSIÓN:

A análise de compoñentes principais (PCA) dos nosos datos realizada a partir da matriz de correlación da nosa mostra resulta nunha serie de compoñentes principais (PCs) ordenados segundo a súa varianza, a cal se corresponde cos autovalores da matriz de correlación [25]. Cada un destes compoñentes principais consiste na combinación lineal das distintas variables, sendo os coeficientes para cada variable os elementos do correspondente autovector.

No programa R dispoñemos de dúas funcións para a PCA dunha determinada mostra [25]. A primeira delas, *prcomp* (), utiliza un método baseado na factorización de matrices chamado descomposición en valores singulares (SVD: *Singular value decomposition*). Polo outro lado, a función *princomp* () baséase no cálculo dos autovalores das matrices de correlación ou covarianza, usando o método denominado descomposición espectral da matriz de covarianza ou correlación (SD: *spectral decomposition of the covariance or correlation matrix*). O resultado da análise mediante estes dous métodos (Táboa 3) diferénciase unicamente no signo dalgúns coeficientes.

Táboa 3. Resultado da análise de compoñentes principais das variables de MD e MP mediante os métodos SVD: descomposición en valores singulares e SD: descomposición espectral da matriz de covarianza ou correlación. Para cada compoñente principal indícase o autovalor, a proporción de varianza explicada (PVE) e os coeficientes para cada variable.

Método	PCs	Autovalor	PVE											
				MD1	MD2	MD3	MD4	MD5	MD6	MD7	MD8	MD9	MD10	MD11
SVD	PC1	5,300	0,482	0,265	0,333	0,362	0,302	0,321	0,346	0,296	0,083	0,238	0,385	0,273
	PC2	1,600	0,145	-0,204	0,150	-0,071	0,505	-0,048	0,430	-0,247	0,368	-0,095	-0,132	-0,515
	PC3	1,543	0,140	-0,483	0,097	0,031	0,150	0,069	0,005	0,193	-0,601	0,513	-0,140	-0,221
SD	PC1	5,300	0,482	-0,265	-0,333	-0,362	-0,302	-0,321	-0,346	-0,296	-0,083	-0,238	-0,385	-0,273
	PC2	1,600	0,145	-0,204	0,150	-0,071	0,505	-0,048	0,430	-0,247	0,368	-0,095	-0,132	-0,515
	PC3	1,543	0,140	0,483	-0,097	-0,031	-0,150	-0,069	-0,005	-0,193	0,601	-0,513	0,140	0,221
				MP1	MP2	MP3	MP4	MP5	MP6	MP7				
SVD	PC1	4,627	0,661	0,436	-0,038	0,432	0,357	0,333	0,435	0,441				
	PC2	1,505	0,215	0,025	-0,780	0,015	0,395	-0,451	0,076	-0,159				
SD	PC1	4,627	0,661	0,436	-0,038	0,432	0,357	0,333	0,435	0,441				
	PC2	1,505	0,215	-0,025	0,780	-0,015	-0,395	0,451	-0,076	0,159				

Tras esta análise exploratoria, na que nos aseguramos de que o resultado mediante estes dous métodos era similar, levamos a cabo o resto da análise a partir da función *prcomp* (), xa que o método no que se basea é o aconsellado na bibliografía [25].

Desta análise obtemos 11 PCs para MD e 7 PCs para MP, cada un deles capaces de explicar unha determinada proporción da variabilidade dos datos orixinais. Destos PCs seleccionamos soamente os primeiros, sendo estes suficientes para explicar a meirande parte da variabilidade total dos datos orixinais. A selección dos PCs pódese levar a cabo mediante a realización dun gráfico de sedimentación ou *scree plot* no que se representa a proporción de varianza explicada (PVE) por cada un dos PCs e selecciónanse aqueles situados por enriba do punto de inflexión da curva (Figura 2), é dicir, os PCs que explican unha porcentaxe da varianza total suficiente [23]. No noso caso, elegimos para as análises posteriores de MD, os tres primeiros compoñentes principais (PC1, PC2 e PC3) que explican, en conxunto, o 76,7% da varianza total (Táboa 3). Da mesma maneira, para MP, seleccionáronse os dous primeiros compoñentes principais (PC1 e PC2) que explican en conxunto o 87,6% da variabilidade total (Táboa 3).

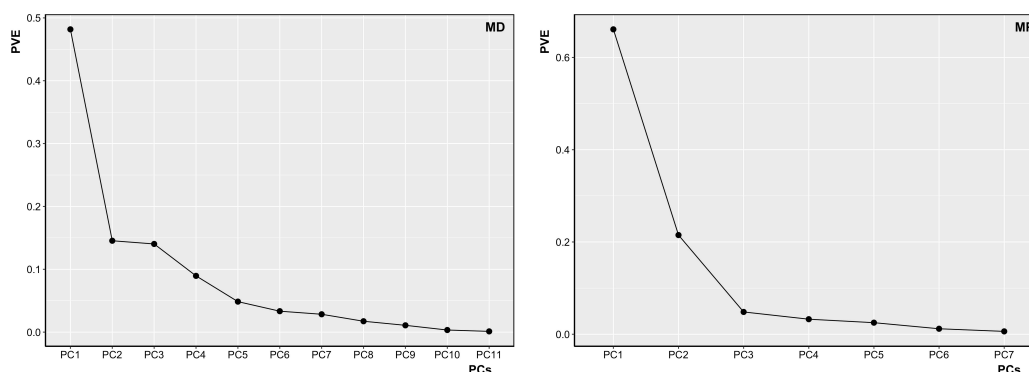


Figura 2. Gráfico de sedimentación para MD e MP.

Tanto para MD como para MP, o primeiro compoñente principal (PC1), basicamente, correspóndese co índice de Peacock e colegas [5]. Ao igual que este, o PC1 de MD é o sumatorio das distintas variables, todas con coeficientes positivos (Táboa 3). No caso de MP, a situación é similar, exceptuando MP2 que mostra un coeficiente negativo próximo a 0 para o primeiro compoñente (Táboa 3).

Os coeficientes ou saturacións dos distintos PCs indican a influencia de cada unha das variables sobre ese compoñente, sendo maior canto máis alto sexa o valor absoluto do coeficiente [23]. Unha forma visual de avaliar o impacto de cada variable sobre cada compoñente é o gráfico de saturacións, no que se representan os coeficientes para cada variable no plano dos compoñentes principais explicativos (Figura 3).

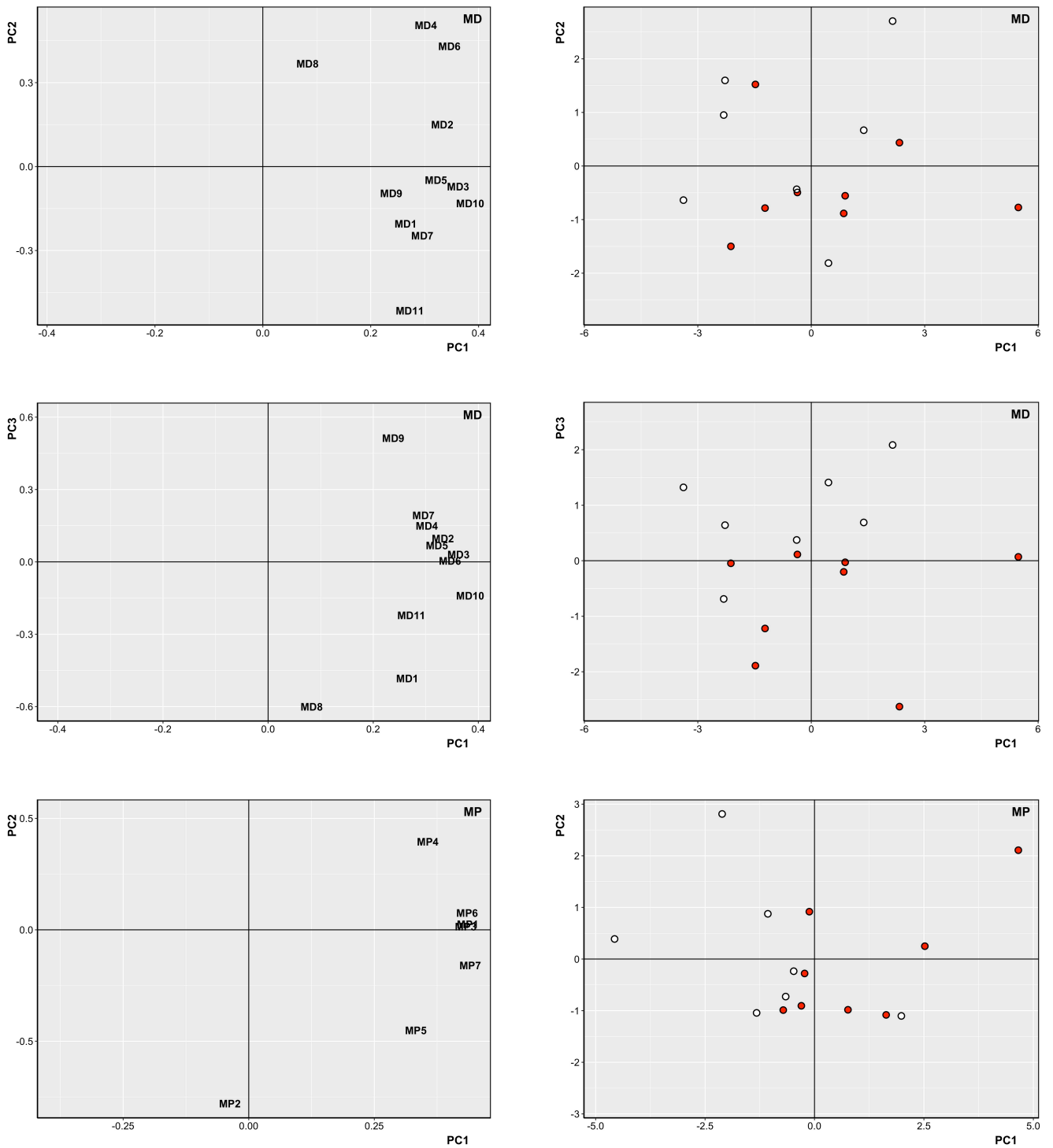


Figura 3. Representación dos coeficientes das variables de MD (MD1 a MD11) e MP (MP1 a MP7) (esquerda) e das puntuacións ou *scores* de cada un dos 15 personaxes analizados (dereita) para cada un dos compoñentes elixidos de MD (PC1, PC2 e PC3) e MP (PC1 e PC2). Indícanse en vermello as puntuacións dos personaxes cunha F relativamente alta ($F > 0,0933$) e en branco as puntuacións dos personaxes cunha F relativamente baixa ($F < 0,0933$).

Os compoñentes principais seleccionados representan, en gran medida, o conxunto de datos iniciais, polo que, analizando a asociación de cada un deles co coeficiente de consanguinidade (F), podemos observar o efecto da consanguinidade simultaneamente sobre todas as variables. A asociación dos compoñentes principais coa F foi avaliada mediante os coeficientes de correlación non paramétricos de Kendall (τ) e de Spearman (ρ) e a través dunha regresión lineal. Tanto para os compoñentes principais PC2 e PC3 de MD como para o primeiro compoñente principal (PC1) de MP atopamos unha asociación estatisticamente significativa coa F , a cal é maior cando é expresada mediante os coeficientes de correlación non paramétricos, polo que podemos inferir que, probablemente, a asociación non sexa completamente lineal (Táboa 4).

Táboa 4. Asociación entre os compoñentes principais de MD e MP co coeficiente de consanguinidade (F) expresada mediante coeficientes de correlación non paramétricos: o coeficiente de Kendall (τ) e o coeficiente de Spearman (ρ) e mediante regresión lineal dos compoñentes principais de MD e MP co coeficiente de consanguinidade (F).

	τ	P	ρ	P	$b \pm SE$	P
MD						
PC1	0,143	0,248	0,211	0,225	4,591 \pm 8,132	0,291
PC2	-0,486	0,006	-0,632	0,007	-8,095 \pm 3,925	0,030
PC3	-0,467	0,008	-0,654	0,005	-7,348 \pm 3,947	0,043
MP						
PC1	0,543	0,002	0,661	0,009	14,103 \pm 6,622	0,027
PC2	-0,067	0,385	-0,150	0,593	-3,109 \pm 4,300	0,242

Esta asociación coa consanguinidade pódese visualizar no chamado gráfico de puntuacións ou *scores* no que se representan os valores dos 15 individuos analizados para cada PC. Podemos observar que, en xeral, aqueles personaxes cun coeficiente de consanguinidade relativamente alto, maior que o valor medio ($F > 0,0933$), presentan un alto valor absoluto para aqueles compoñentes asociados coa F (Figura 3).

Aquelas variables que presenten unha maior influencia sobre estes compoñentes principais, é dicir, cun maior coeficiente, serán, por conseguinte, as maioritariamente relacionadas coa consanguinidade (Táboa 3 e Figura 3). Polo tanto, para MD, as variables sobre as que a consanguinidade ten un maior efecto son MD4, MD11, MD1, MD8 e MD9. Como a asociación de PC2 e PC3 coa F é negativa (Táboa 4), aquelas variables

cun valor negativo para o seu correspondente coeficiente (MD11, MD1 e MD8), presentarán unha asociación positiva co coeficiente de consanguinidade.

A variable MD11, que se corresponde co “labio Habsburgo” ou labio inferior evertido, pode ser tamén resultado dun excesivo crecemento mandibular e ser considerada un sinal de MP, en lugar de MD [2]. Esta hipótese concorda coa súa gran correlación coa maioría das variables de MP, exceptuando MP2 (Táboa 2). Pola outra banda, MD1 e MD8 contribúen de maneira importante ao PC3 de MD, un dos compoñentes asociado significativamente coa consanguinidade (Táboa 4), mais que soamente explica o 14% da variación de MD (Táboa 3). Polo que, independentemente de que MD11 sexa considerada unha variable de MD ou MP, unha pequena parte da variación de MD está relacionada coa consanguinidade. MD1 é outra das variables de MD significativamente correlacionada coa maior parte das variables de MP (Táboa 2). Podemos apreciar, polo tanto, que dúas das variables de MD asociadas positivamente coa consanguinidade (MD1 e MD11) están, á súa vez, altamente correlacionadas con MP.

En canto a MP, os valores para o primeiro compoñente principal (PC1) presentan unha regresión positiva e estatisticamente significativa coa F (Táboa 4). Polo tanto, a consanguinidade presenta un gran efecto sobre todas as variables analizadas para MP, exceptuando MP2.

A alta correlación positiva entre moitas das variables de MD e MP (Táboa 2), indícanos que a “mandíbula Habsburgo” está causada tanto por deficiencia maxilar como por prognatismo mandibular, en maior ou menor medida. Tendo en conta que a correlación fenotípica de trazos adoita ser unha boa estima da súa correlación xenética [27], cabe esperar que MD e MP estean xenéticamente correlacionadas, como a maioría dos trazos da cara humana [22].

Grazas á análise dos nosos datos polo método de compoñentes principais, atopamos unha forte asociación entre a consanguinidade e a “mandíbula Habsburgo”, especialmente cos trazos de MP. Polo tanto, podemos concluír que a gran prevalencia do prognatismo mandibular na dinastía dos Habsburgo non se debe unicamente a deriva xenética, senón tamén aos altos niveis de consanguinidade nesta dinastía. Adicionalmente, tal e como indicamos anteriormente, a forte asociación positiva entre a consanguinidade e o prognatismo mandibular proporciónanos relevante información sobre o modo de herdanza deste trazo. O coeficiente de consanguinidade (F) é unha medida da homocigosidade do xenoma dun individuo, o que queda reflexado na súa alta correlación coa homocigosidade estimada por secuenciación masiva de todo o

xenoma [28]. Ademais, a F calculada a partir de pedigrees, como é o noso caso, está correlacionada coa F_{ROH} que é a proporción de xenoma autosómico idéntico por ascendencia en forma de *runs of homozygosity* (ROHs) [29]. Polo tanto, unha asociación entre a consanguinidade e un determinado fenotipo indica unha base xenética recesiva para o mesmo. No noso caso, a magnitude de prognatismo mandibular aumenta co incremento da homocigosidade do xenoma causada por consanguinidade, demostrando que é un trazo recesivo.

Este feito contrasta coas análises de segregación [12] e coas análises de segregación complexa [3,13] que propoñen un xen maior dominante como causa deste fenotipo. Un dos principais problemas deste tipo de análises podería ser a consideración do prognatismo mandibular como un fenotipo cualitativo, en lugar dun trazo cuantitativo. Outro dos problemas á hora de averiguar a base xenética de distintos trazos empregando estas análises, en concreto as análises de segregación complexa (CSA), derivan do propio método. As CSA baséanse na comparación de distintos modelos de herdanza usando un test de razón de verosimilitude e a elección dun determinado modelo, dentro daqueles igualmente probables, segundo o criterio de información de Akaike (AIC) [3,13]. Polo tanto, podería acontecer, como nun destes estudos [13], que tanto o modelo autosómico recesivo como autosómico dominante non sexan rexeitados polo primeiro test e o modelo autosómico dominante finalmente sexa escollido por ter un AIC máis baixo, mais cunha diferenza mínima. Pola contra, outras análises de segregación rexeitan a existencia dun xen maior, suxerindo unha base polixénica para este trazo [8]. Isto coincide co descubrimento de múltiples loci no xenoma asociados con este trazo nos estudos de asociación do xenoma completo (GWAS) [14,15,16,17]. Se a base deste trazo é polixénica, o noso resultado podería concordar coa influencia dun xen maior dominante mais cun efecto recesivo de todos os xenes en conxunto, fenómeno coñecido como dominancia direccional.

Este estudo proporciona a primeira evidencia de depresión consanguínea sobre o rostro humano, en concreto, sobre o prognatismo mandibular. A depresión consanguínea foi demostrada en múltiples estudos, cun efecto sobre as enfermidades monoxénicas [30], diminuindo a supervivencia prerreprodutiva [20] e aumentando a frecuencia de múltiples enfermidades e trazos complexos [31]; mais nunca foi probado que tivese unha repercusión nos trazos faciais.

CONCLUSIÓNS

1. A “mandíbula Habsburgo” é unha deformidade directamente relacionada coa consanguinidade, tal e como demostra a asociación positiva estatisticamente significativa entre o prognatismo mandibular e o coeficiente de consanguinidade estimado a partir do pedigree. Este feito apoia a hipótese, nunca antes empiricamente contrastada, dunha relación causal entre a “mandíbula Habsburgo” e os altos niveis de consanguinidade desta dinastía.
2. A magnitude do prognatismo mandibular aumenta coa homocigose xenómica, indicando unha base xenética recesiva para este trazo. Esta conclusión non é compatible coa hipótese exposta pola maioría dos estudos de segregación dun modo de herdanza dominante para o prognatismo mandibular.
3. A “mandíbula Habsburgo” é un trazo complexo que xeralmente implica tanto un déficit maxilar como un excesivo crecemento da mandíbula. Polo tanto, é razoable referirse a este trazo como un exemplo de prognatismo mandibular en sentido estricto, o que foi recentemente refutado por algúns autores.
4. O “labio Habsburgo”, previamente considerado un signo de MD, está altamente correlacionado con MP, apoiando a súa consideración como unha consecuencia da hiperplasia mandibular.
5. O prognatismo mandibular é obxecto de depresión consanguínea. Ata o noso coñecemento, este traballo aporta a primeira evidencia de depresión consanguínea nun trazo do rostro humano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Géoris M. *Los Habsburgo*. Madrid: Aldebarán Ediciones; 2000.
2. Thompson EM, Winter RM. Another family with the 'Habsburg jaw'. *J Med Genet*. 1988; 25: 838-842.
3. Cruz RM, Krieger H, Ferreira R, Mah J, Hartsfield J, Oliveira S. Major gene and multifactorial inheritance of mandibular prognathism. *Am J Med Genet*. 2008; 146A: 71-77. doi: 10.1002/ajmg.a.32062.
4. Hart GD. The Habsburg Jaw. *CMAJ*. 1971; 104: 601-603.
5. Peacock ZS, Klein KP, Mulliken JB, Kaban LB. The Habsburg jaw re-examined. *Am J Med Genet*. 2014; 164A: 2263-2269. doi: 10.1002/ajmg.a.36639.
6. Lippi D, Pierleoni F, Franchi L. Retrognathic maxilla in “Habsburg jaw”. Skeletofacial analysis of Joanna of Austria (1547–1578). *Angle Orthod*. 2012; 82(3): 387-395.
7. Giuffra V, Panetta D, Salvadori PA, Fornaciari G. A historical case of amelogenesis imperfecta: Giovanna of Austria, Grand Duchess of Tuscany (1547 - 1578). *Eur J Oral Sci*. 2014; 122: 1-6. doi: 10.1111/eos.12097.
8. Ko J, Suh YJ, Hong J, Paeng J, Baek S, Kim YH. Segregation analysis of mandibular prognathism in Korean orthognathic surgery patients and their families. *Angle Orthod*. 2013; 83(6): 1027-1035. doi: 10.2319/021313-130.1.
9. Nishio C, Huynh N. Skeletal malocclusion and genetic expression: an evidence-based review. *J Dent Sleep Med*. 2016; 3(2): 57–63. doi: 10.15331/jdsm.5712.
10. Kim YH, Cho HY, Baek CH, Lee A, Kim G, Kim WY, et al. Genetic influence and heritability in mandibular prognathism of Korean families. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2010; 36: 502-507. doi: 10.5125/jkaoms.2010.36.6.502.
11. Watanabe M, Suda N, Ohyamac K. Mandibular prognathism in Japanese families ascertained through orthognathically treated patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005; 128(4): 466-470. doi: 10.1016/j.ajodo.2004.09.018.
12. Wolff G, Wienker TF, Sander H. On the genetics of mandibular prognathism: analysis of large European noble families. *J Med Genet*. 1993; 30: 112-116.

13. El-Gheriani AA, Maher BS, El-Gheriani AS, Sciote JJ, Abu-shahba FA, Al-Azemi R, et al. Segregation analysis of mandibular prognathism in Libya. *J Dent Res*. 2003; 82(7): 523-527.
14. Chen F, Li Q, Gu M, Li X, Yu J, Zhang Y. Identification of a mutation in FGF23 involved in mandibular prognathism. *Sci Rep*. 2015; 5: 11250. doi: 10.1038/srep11250.
15. Lee MK, Shaffer JR, Leslie EJ, Orlova E, Carlson JC, Feingold E, et al. Genome-wide association study of facial morphology reveals novel associations with *FREMI* and *PARK2*. *PLoS ONE*. 2017; 12(4): e0176566. doi: 10.1371/journal.pone.0176566.
16. Saito F, Kajii TS, Oka A, Ikuno K, Iida J. Genome-wide association study for mandibular prognathism using microsatellite and pooled DNA method. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2017; 152(3): 382-388. doi: 10.1016/j.ajodo.2017.01.021.
17. Xiong X, Li S, Cai Y, Chen F. Targeted sequencing in *FGF/FGFR* genes and association analysis of variants for mandibular prognathism. *Medicine*. 2017; 96(25): e7240. doi: 10.1097/MD.00000000000007240.
18. Álvarez G, Ceballos FC. Royal inbreeding and the extinction of lineages of the Habsburg dynasty. *Hum Hered*. 2015; 80: 62–68. doi: 10.1159/000440765.
19. Álvarez G, Ceballos FC, Quinteiro C. The role of inbreeding in the extinction of a European royal dynasty. *PLoS ONE*. 2009; 4(4): e5174. doi: 10.1371/journal.pone.0005174.
20. Ceballos FC, Álvarez G. Royal dynasties as human inbreeding laboratories: the Habsburgs. *Heredity*. 2013; 111: 114-121. doi: 10.1038/hdy.2013.25.
21. Cavalli-Sforza LL, Bodmer WF. *Genética de las poblaciones humanas*. Barcelona: Ediciones Omega; 1981.
22. Cole JB, Manyama M, Larson JR, Liberton DK, Ferrara TM, Riccardi SL, et al. Human facial shape and size heritability and genetic correlations. *Genetics*. 2017; 205: 967-978. doi: 10.1534/genetics.116.193185.
23. Guisande C, Vaamonde A, Barreiro A. *Tratamiento de datos con R, STATISTICA y SPSS*. España: Ediciones Díaz de Santos; 2011.
24. Härdle WK, Simar L. *Applied multivariate statistical analysis*. 3ª Edición. Londres: Springer; 2012.
25. Manly BFJ, Navarro JA. *Multivariate Statistical Methods. A primer*. 4ª Edición. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2017.

26. Pérez C. *Técnicas estadísticas con SPSS*. Madrid: Pearson Educación; 2001.
27. Cheverud JM. A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution*. 1988; 42(5): 958-968. doi: 10.1111/j.1558-5646.1988.tb02514.x.
28. Hoffman JI, Simpson F, David P, Rijks JM, Kuiken T, Thorne MA, et al. High throughput sequencing reveals inbreeding depression in a natural population. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2014; 111(10): 3775-3780. doi: 10.1073/pnas.1318945111.
29. McQuillan R, Leutenegger A, Abdel-Rahman R, Franklin CS, Pericic M, Barac-Lauc L, et al. Runs of homozygosity in European populations. *Am J Hum Genet*. 2008; 83: 359-372. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.08.007.
30. Álvarez G, Quinteiro C, Ceballos FC. Inbreeding and genetic disorder. En: Ikehara K. (ed) *Advances in the Study of Genetic Disorders*. IntechOpen; 2011. p.21-44. doi: 10.5772/745
31. Campbell H, Carothers A, Rudan I, Hayward C, Biloglav Z, Barac L, et al. Effects of genome-wide heterozygosity on a range of biomedically relevant human quantitative traits. *Hum Mol Genet*. 2007; 16(2): 233-241. doi: 10.1093/hmg/ddl473.