



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
"FARMACOLOGIA E ONCOLOGIA MOLECOLARE"

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. Antonio Cuneo

*IDENTIFICAZIONE DI VARIANTI GENETICHE  
ASSOCIATE A RISCHIO DI  
LABIO/PALATOSCHISI O PALATOSCHISI NON-  
SINDROMICHE E DI INTERAZIONI GENE-  
AMBIENTE IN UNA AMPIA CASISTICA DI TRIADI  
EUROPEE*

Settore Scientifico Disciplinare MED/03

**Dottorando**

Dott. Franceschelli Paola

---

(firma)

**Tutore**

Prof. Rubini Michele

---

(firma)

Anni 2012/2014



## Sommario

1.1.	<i>Malformazioni Congenite, Anomalie Craniofacciali e Schisi Orofacciali</i> .....	2
1.2.	<i>Embriologia Craniofacciale</i> .....	3
1.2.1.	<i>Regolazione molecolare della morfogenesi del volto</i> .....	6
1.3.	<i>Sviluppo e Classificazione delle Schisi Orofacciali</i> .....	9
1.3.1.	<i>Cleft Lip</i> .....	10
1.3.2.	<i>Cleft Lip and Palate</i> .....	12
1.3.3.	<i>Cleft Palate</i> .....	13
1.3.4.	<i>Fenotipi sub-clinici</i> .....	14
1.3.5.	<i>Sistemi di classificazione delle Schisi Orofacciali</i> .....	15
1.3.6.	<i>Schisi orofacciali sindromiche e non-sindromiche</i> .....	17
1.4.	<i>Diagnosi</i> .....	19
1.4.1.	<i>Diagnosi prenatale</i> .....	19
1.4.2.	<i>Diagnosi perinatale e post-natale</i> .....	20
1.5.	<i>Trattamenti</i> .....	20
1.5.1.	<i>Periodo perinatale</i> .....	21
1.5.2.	<i>Età prescolare</i> .....	26
1.5.3.	<i>Età scolare</i> .....	27
1.5.4.	<i>Adolescenza</i> .....	28
1.6.	<i>Epidemiologia</i> .....	29
1.7.	<i>Eziologia</i> .....	33
1.7.1.	<i>Eziologia delle schisi Sindromiche</i> .....	33
1.7.2.	<i>Eziologia delle schisi Non-sindromiche</i> .....	36
1.7.2.1.	<i>Fattori di rischio ambientale</i> .....	36
1.7.2.2.	<i>Fattori di rischio genetico</i> .....	42
1.7.2.3.	<i>Interazioni gene-ambiente</i> .....	53
3.1.	<i>Campionamento</i> .....	60
3.1.1.	<i>Casistica Europea</i> .....	60
3.1.2.	<i>Casistica Italiana</i> .....	62
3.2.	<i>Genotipizzazione</i> .....	63
3.2.1.	<i>Genotipizzazione tramite PCR e corsa elettroforetica</i> .....	63
3.2.2.	<i>Genotipizzazione tramite RealTime PCR</i> .....	65
3.3.	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i> .....	67

3.4.	<i>Analisi Bioinformatiche</i> .....	69
3.5.	<i>Analisi statistiche</i> .....	70
3.5.1.	<i>Equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE)</i> .....	70
3.5.2.	<i>Calcolo dei limiti di confidenza</i> .....	71
3.5.3.	<i>Calcolo dell'Odds Ratio</i> .....	71
3.5.4.	<i>Analisi delle triadi</i> .....	73
3.5.5.	<i>Transmissium Disequilibrium Test (TDT)</i> .....	74
3.5.6.	<i>Analisi logaritmico-lineare dei rischi relativi</i> .....	75
3.5.7.	<i>Analisi log-lineare dell'interazione gene-ambiente (GEI)</i> .....	78
3.5.8.	<i>Test esatto di Fisher</i> .....	79
3.5.9.	<i>Correzione di Yate</i> .....	80
3.5.10.	<i>Correzione di Bonferroni</i> .....	80
4.1.	<i>Studi di associazione gene-candidato a nsOFC</i> .....	82
4.1.1.	<i>Associazione di una variante del gene CBS a nsOFC</i> .....	82
4.1.2.	<i>Studio di associazione di varianti del gene HLA-G a nsOFCs</i> .....	89
4.1.3.	<i>Ricerca di varianti funzionali nell'intorno del gene GREM1</i> .....	99
4.1.4.	<i>Ricerca di varianti funzionali nell'intorno del gene IRF6</i> .....	107
4.2.	<i>Studio di associazione di geni candidati a nsCP</i> .....	116
5.1.	<i>Interazione di fattori ambientali e CBS844ins68 nell'eziologia delle schisi orofacciali non-sindromiche</i> .....	125
5.2.	<i>Identificazione di HLA-G come nuovo gene candidato</i> .....	127
5.3.	<i>Esclusione di una variante putativamente funzionale nell'intorno di GREM1 dall'eziologia comune delle schisi non-sindromiche</i> .....	129
5.4.	<i>Identificazione di una nuova variante funzionale nell'intorno del gene IRF6</i> .....	131
5.5.	<i>Identificazione di nuove varianti associate a nsCP</i> .....	133
5.6.	<i>Conclusioni</i> .....	135

# 1. INTRODUZIONE

---

## **1.1. Malformazioni Congenite, Anomalie Craniofacciali e Schisi Orofacciali**

Si definiscono malformazioni congenite le alterazioni strutturali o funzionali di un determinato organo o apparato che siano presenti sin dalla nascita dell'individuo, e perciò legate a un difetto di tipo irreversibile nella morfogenesi fetale. Circa il 20% delle gravidanze con presenza di un feto malformato termina in aborto, mentre il rimanente 80% determina la nascita di un individuo con anomalia congenita (Paranaíba et al. 2011).

Le malformazioni congenite colpiscono approssimativamente il 3-5% dei nuovi nati; rappresentano una delle più importanti cause di mortalità neonatale e di morbidità sia in età infantile che nella successiva età adulta (Jones et al. 2004; Castro et al. 2006; Canfield et al. 2006). Sono rappresentate in maggior parte da anomalie del sistema nervoso centrale (specialmente difetti del tubo neurale come spina bifida, anencefalia ed encefalocele), anomalie del sistema muscoloscheletrico (come polidattilia, sindattilia e piede torto), anomalie cardiovascolari, e malformazioni craniofacciali (Costa et al. 2006; Victora & Barros 2001).

Tra le malformazioni congenite, le anomalie craniofacciali costituiscono un ampio gruppo che comprende tutte le tipologie di alterazioni riguardanti la morfologia del cranio e/o del volto. Ne fanno parte le schisi orofacciali, le craniosinostosi, l'oloprosencefalia, i difetti otomandibolari, i difetti del tubo neurale che interessano il polo cefalico (anencefalia ed encefalocele), e sindromi multisistemiche come la Sindrome di Apert e la Sindrome di Crouzon (Monlleó & Gil-da-Silva-Lopes 2006). La regione craniofacciale è altamente complessa, sia nelle strutture che la compongono, sia nei processi di sviluppo che la determinano; proprio per questo motivo è soggetta a numerosi tipi di anomalie alla nascita. Le malformazioni craniofacciali insorgono da errori nella coordinazione dei normali processi tissutali, nella determinazione del destino cellulare e nella differenziazione di particolari tipi di cellule durante l'embriogenesi (Nuckolls et al. 1999).

Le schisi orofacciali (*Orofacial Clefts*, OFCs), oltre a rappresentare la tipologia più comune di anomalia craniofacciale, costituiscono anche uno dei difetti congeniti più diffusi al mondo, con un'incidenza globale di circa 1 affetto ogni 700 nuovi nati (Mossey et al. 2009). Si tratta di difetti determinati dalla mancata o incompleta chiusura di tessuti embrionali facciali indipendenti che si fondono tra loro durante il corretto sviluppo embrionale craniofacciale.

In genere le OFCs colpiscono il labbro superiore e il palato, e sono indicate come schisi del labbro e/o del palato (*Cleft Lip and/or Palate*); più raramente possono interessare altre zone del volto e insorgere ad esempio tra labbro e occhio, o tra labbro e orecchio (Cohen 2002).

Le OFCs rappresentano la seconda causa di mortalità infantile nei paesi sottosviluppati: possono infatti comportare gravi difficoltà nell'alimentazione e nella respirazione del neonato, trattabili esclusivamente con un approccio chirurgico. Sebbene nei paesi avanzati le OFCs non costituiscano una delle principali cause di mortalità, gli effetti che tali patologie comportano sulla capacità di linguaggio, sull'udito, l'aspetto fisico e sulla psicologia determinano un notevole impatto sulla salute e sullo stile di vita dell'individuo e comportano la necessità di un intervento a livello multidisciplinare (chirurgico, ortodontico, logopedistico e psicologico), con una notevole spesa economica in termini di salute e servizi correlati (Mossey et al. 2009; Farronato et al. 2014).

## **1.2. Embriologia Craniofacciale**

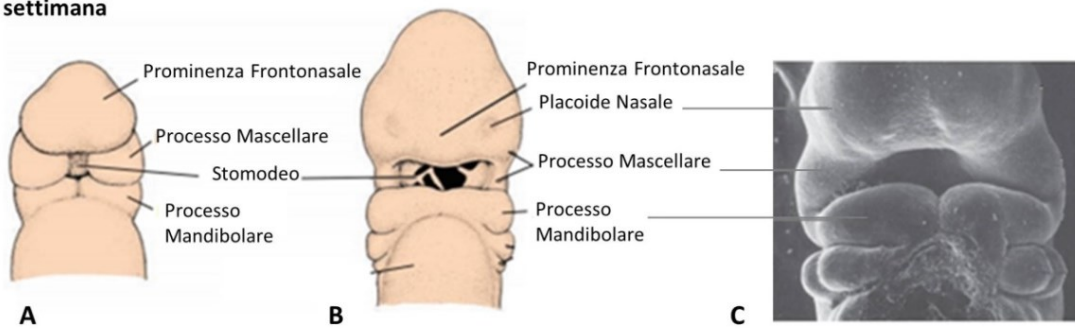
Lo sviluppo del volto ha inizio alla 4ª settimana di gestazione, con la migrazione delle cellule della cresta neurale craniale dalla regione dorsale del tubo neurale anteriore alla regione facciale, dove si determina la formazione di cinque distinti primordi facciali, che andranno a circondare lo stomodeo (primitiva cavità orale): la prominenza frontonasale (in posizione cefalica rispetto allo stomodeo), i due processi mascellari (in posizione laterale rispetto allo stomodeo) e i due processi mandibolari (in posizione caudale rispetto allo stomodeo).

Alla fine della 4ª e inizio delle 5ª settimana di gestazione la porzione inferiore della prominenza frontonasale viene suddivisa dalla formazione dei due placoidi nasali che successivamente si invaginano, plasmando le prominenze nasali, a loro volta suddivise nei processi nasali mediali e laterali.

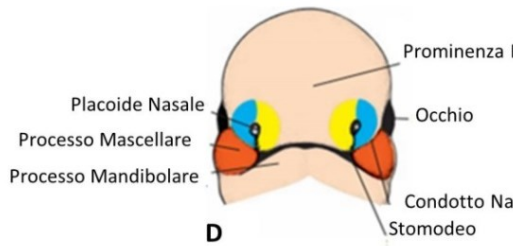
Alla fine della 6ª-7ª settimana di embriogenesi, i processi nasali mediali si espandono e fondono tra loro formando il filtro del labbro (*philtrum*); durante le due settimane successive, anche i processi mascellari continuano a espandersi e aumentare di dimensione, e alla fine dell'8ª settimana fondono con i rispettivi processi nasali mediali, dando luogo alla formazione del segmento intermascellare; in seguito il segmento intermascellare fonde con le prominenze mascellari fiancheggianti, completando la formazione del labbro superiore e del palato primario (Sadler 2012; Mossey et al. 2009; Rahimov et al. 2012).

Il labbro superiore deriva dunque dalla fusione delle due prominenze nasali mediali e dai due processi mascellari (le prominenze nasali laterali non partecipano alla formazione del labbro superiore), mentre il labbro inferiore e la mandibola si sviluppano dalla fusione dei due processi mandibolari.

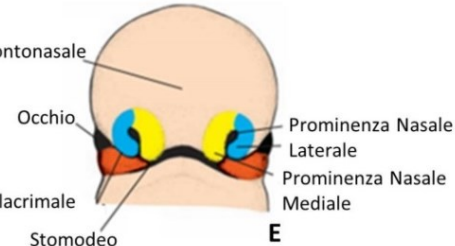
4° settimana



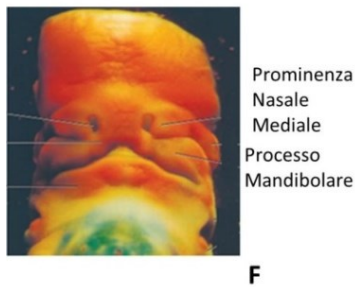
5° settimana



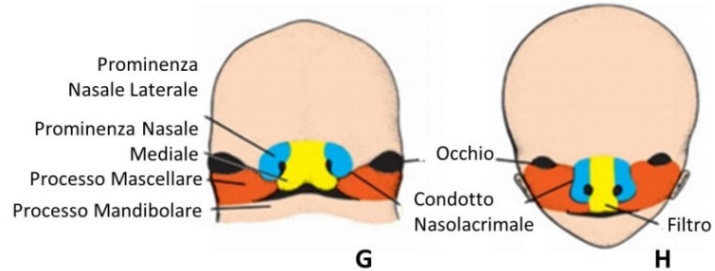
6° settimana



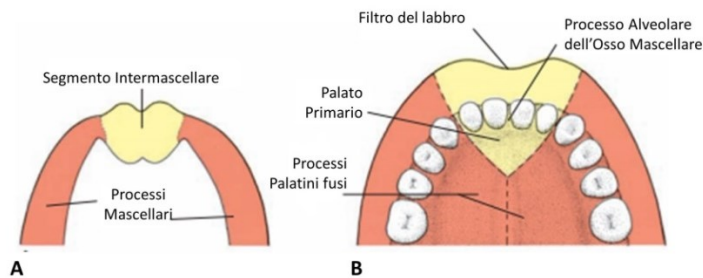
8° settimana



10° settimana



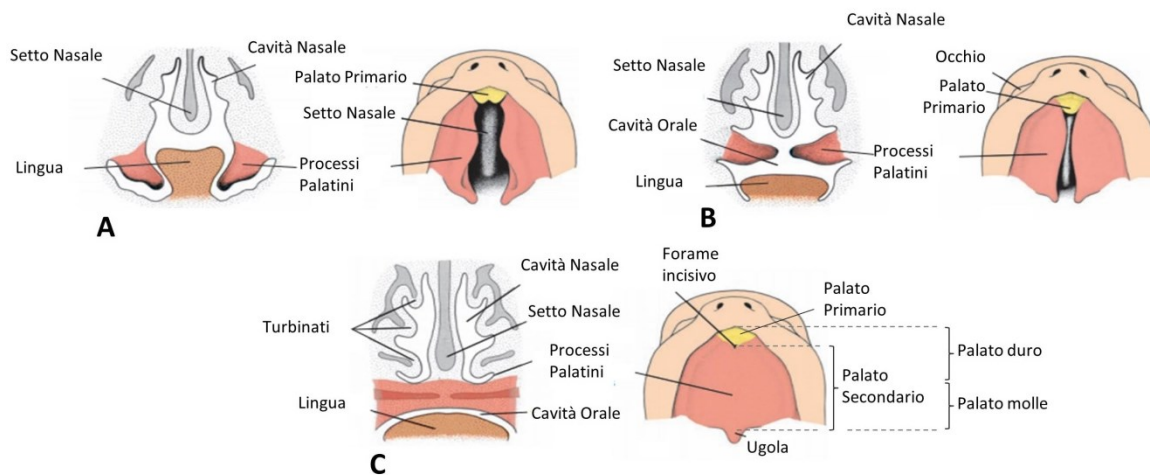
**Figura 1: Morfogenesi del volto, vista frontale.** A. Embrione di circa 24 giorni. Lo stomodeo è circondato dai cinque primordi facciali. B. Formazione dei placoidi nasali sulla prominente frontale alla fine della 4° settimana. C. Immagine al microscopio elettronico di un embrione umano simile a quello mostrato in figura B. D. Embrione di 5 settimane; formazione delle prominente nasali mediali e laterali. E. Embrione di 6 settimane. F. Fotografia di un embrione a uno stadio simile a quello mostrato il figura G. G. Alla 7°-8° settimana di gestazione i processi mascellari si sono fusi con le prominente nasali mediali, formando il filtro, il segmento intermascellare e il labbro superiore. H. Alla 10° settimana la formazione del volto è completa (Sadler 2012).



**Figura 2:** A. Segmento intermascellare e processi mascellari. B. Dal segmento intermascellare hanno origine il filtro del labbro superiore e il palato primario, di cui fa parte il processo alveolare (la parte mediale dell'osso mascellare) contenente i 4 denti incisivi (Sadler 2012).



Il palato secondario comincia a svilupparsi durante la 6° settimana di embriogenesi. Le prominenze mascellari si estendono dando forma ai processi palatini, che si orientano verticalmente fiancheggiando la lingua. Durante la 7° settimana, l'espandersi della giunzione mascellare e la discesa della lingua determinano il riposizionamento dei processi palatini, che assumono un orientamento orizzontale (Shkoukani et al. 2014). Una volta allineate correttamente e in contatto tra loro, le estremità degli epiteli che costituiscono i processi palatini (*Medial Edge Epithelium*, MEE) si fondono rapidamente formando la cucitura epiteliale mediale (*Midline Epithelial Seam*, MES); successivamente le cellule epiteliali della linea mediale vanno incontro ad apoptosi per permettere la continuità mesenchimale lungo tutta la superficie del palato (Fitchett & Hay 1989; Birnbaum et al. 2009). L'ulteriore differenziazione del mesenchima palatino porta poi alla formazione di intramembrane ossee, che corrisponderanno all'area del palato duro; la porzione posteriore non va invece incontro ad ossificazione, determinando la formazione del palato molle (Merritt 2005; Birnbaum et al. 2009; Iwata et al. 2011; Shkoukani et al. 2014). Intorno alla 10° settimana di sviluppo embriologico, il palato secondario fonde completamente con il palato primario e con il labbro superiore, e completa la sua formazione alla 12° settimana fondendosi con il setto nasale e separando così la cavità oronasale in due distinte cavità, orale e nasale, che renderanno possibile la simultanea masticazione e respirazione (van Aalst A et al. 2008; Mossey et al. 2009; Shkoukani et al. 2014).



**Figura 3: Morfogenesi del palato;** sezione frontale della testa e visione ventrale del palato dopo rimozione della giunzione mandibolare e della lingua. A. Embrione di 6,5 settimane. I processi palatini sono in posizione verticale sui lati della lingua. B. Embrione di 7,5 settimane. La lingua è scesa e i processi palatini sono in posizione orizzontale. C. Embrione di 10 settimane: i due processi palatini si sono fusi tra loro e con il setto nasale. Il forame incisivo determina il punto di incontro tra palato primario e palato secondario. Il palato è inoltre diviso in palato duro (osseo) e palato molle (muscolare) (Sadler 2012).

### 1.2.1. Regolazione molecolare della morfogenesi del volto

I processi cellulari di proliferazione, differenziazione e apoptosi, volti a determinare la convergenza e la fusione dei processi facciali e palatini, sono finemente regolati da un ampio spettro di complessi *pathways* di molecole segnale; studi effettuati su modelli animali di topi e polli hanno avuto un ruolo centrale nell'identificazione delle principali molecole coinvolte nello sviluppo di labbro e palato (Jiang et al. 2006; Mossey et al. 2009). In entrambe le specie, lo sviluppo del labbro e del palato primario avvengono in maniera strettamente parallela all'essere umano; poiché l'embrione di pollo è facilmente accessibile per la manipolazione sperimentale e continua il suo sviluppo nell'uovo anche dopo successivi interventi, è stato utilizzato negli anni come modello principale di studio per formazione di labbro e palato primario; le evidenze a disposizione suggeriscono che i meccanismi molecolari operino in modo estremamente simile –se non identico- anche in topi e esseri umani (Mossey et al. 2009). Gli studi molecolari effettuati hanno mostrato come la formazione primaria, la crescita e la fusione dei processi facciali siano processi mediati da interazioni di tipo epitelio-mesenchima controllati, almeno parzialmente, da interazioni tra fattori di crescita dei fibroblasti (*fibroblast growth factors*, FGFs), proteine morfogeniche dell'osso (*bone morphogenetic proteins*, BMPs), fattori di crescita trasformanti (*transforming growth factors*, TGFs) e da gradienti locali di acido retinoico. Sono coinvolti anche numerosi fattori di trascrizione dello sviluppo appartenenti alle famiglie *msh homeobox* (MSX), *distal-less homeobox* (DLX), *paired box* (PAX) e *T-Box* (TBX) (Barlow et al. 1999; Lee et al. 2001; Mossey et al. 2009; Rahimov et al. 2012).

Il *pathway* dei fattori FGFs è noto per giocare un ruolo fondamentale nell'induzione della migrazione delle cellule della cresta neurale e nella regolazione delle interazioni epitelio-mesenchimale durante la fusione delle prominente facciali (Nie et al. 2006). La maggior parte dei ligandi e i recettori *Fgfr1* e *Fgfr2* sono ampiamente espressi durante lo sviluppo dei primordi facciali (Bachler & Neubüser 2001). *Fgf8* è un importante ligando richiesto per la formazione dell'arco faringeo sotto il controllo delle proteine *sonic hedgehog* (SHH) (Trumpf et al. 1999; Haworth et al. 2007; Rahimov et al. 2012). È espresso nell'ectoderma mascellare e mandibolare e induce a sua volta l'espressione di fattori di trascrizione contenuti domini *homeobox* (*Lhx6*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Barx1*) (Rahimov et al. 2012).

Le BMPs sono molecole segnale cellulo-secrete appartenenti alla superfamiglia TGF $\beta$  dei fattori di trascrizione, che regolano importanti processi tra cui la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi cellulare (Srichomthong et al. 2005). I membri di questo *pathway* cellulare sono espressi nei processi facciali in un *pattern* altamente regolato in maniera spazio-temporale e la crescita dei primordi facciali è di tipo *BMP-dosage-sensitive* (Barlow & Francis-West 1997; Ashique et al. 2002).

Le conoscenze inerenti lo sviluppo del palato secondario derivano invece quasi totalmente dall'analisi di modelli murini, nei quali gli eventi morfologici sono essenzialmente gli stessi che avvengono negli esseri umani (Gritli-Linde 2007; Mossey et al. 2009). Il controllo molecolare della formazione e dell'innalzamento verticale dei processi palatini implica una complessa cascata di segnali composta da fattori di trascrizione, fattori di crescita e loro recettori, tra cui *Ors2*, *Lhx8*, *Msx1*, *Fgf10*, *Fgfr2b*, *Tgfb2*, *Tgfb2* (Gritli-Linde 2007). Lo scambio di segnali tra l'epitelio del palato e il mesenchima è noto per avere un ruolo chiave nella regolazione della crescita del palato: *Msx1* regola l'espressione di *Bmp2* e *Bmp4* nel mesenchima e di *Shh* e *Bmp4* nell'epitelio. *Shh* stimola a sua volta l'espressione nel mesenchima di *Bmp2*, che regola la crescita dei processi palatini (Zhang et al. 2002). Le molecole *Shh* sono ampiamente espresse nell'ectoderma che riveste le strutture dei processi facciali (Chiang et al. 1996) e legano il recettore di superficie Patched (*Ptch*), il quale inibisce le proteine transmembrana *Smoothed*, che a loro volta attivano la famiglia di fattori di trascrizione *zinc-finger* GLI che regolano l'espressione *downstream* di geni *target* come *FOXE1* (*Forkhead Box E1*) (Brancaccio et al. 2004; Eichberger et al. 2004; Rahimov et al. 2012), membro della famiglia dei fattori di trascrizione *forkhead/winged domain*, i cui membri sono primariamente coinvolti nello sviluppo embriologico (De Felice et al. 1998).

Una volta avvenuta l'elevazione orizzontale dei processi palatini (guidata dall'accumulo di e idratazione di glicosamminoglicani, tra cui acido ialuronico), e il loro contatto a livello della linea mediale del palato, i processi di differenziazione e fusione cellulari devono essere finemente controllati; la differenziazione peridermica è sotto controllo delle molecole segnale *jagged 2* (*JAG2*) e dall'*Interferon Regular Factor 6* (*IRF6*) (Suzuki et al. 2000; Casey et al. 2006; Richardson et al. 2006; Mossey et al. 2009). La fusione dei processi palatini sembra essere guidata da numerose molecole di adesione cellulare (inclusa la nectina 1), componenti desmosomiali (Suzuki et al. 2000; Mogass et al. 2000), e da fattori di trascrizione incluso il *transforming growth factor  $\alpha$*  (*TGFA*), l'*epidermal growth factor receptor* (*EGFR*) (Miettinen et al. 1999) e membri della superfamiglia  $TGF\beta$  come *Tgf $\beta$ 3*, espresso significativamente a livello della MEE anche prima e dopo l'elevazione dei processi palatini insieme a *Ifr6* (Shkoukani et al. 2014); diversi studi suggeriscono che *Tgf $\beta$ 3* possa promuovere la fusione del palato attraverso un effetto sinergico: stimolando l'adesione iniziale dei processi palatini, incrementando la superficie della MEE tramite l'induzione di protuberanze e filipodi, e promuovendo la successiva degenerazione delle cellule epitaliali (Kartinen et al. 1997; Taya et al. 1999; Gato et al. 2002; Martínez-Alvarez et al. 2000; Tudela et al. 2002). A livello molecolare, si è dimostrato che *TGF $\beta$ 3* regola a sua volta membri della famiglia delle metallo-proteinasi della matrice, inclusi *TIMP2* e *MMP13*, che sono coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare (Blavier et al. 2001).



**Figura 4:** Immagine al microscopio elettronico del volto embrionico al giorno 33 di embriogenesi, rappresentanti i pattern di espressione genica studiati nell'embrione murino (Sperber et al. 2010).

### 1.3. Sviluppo e Classificazione delle Schisi Orofacciali

Come descritto nel capitolo precedente, lo sviluppo della regione orofacciale è costituito da una sequenza di eventi rigidamente coordinati a livello spazio-temporale. L'alterazione di uno di questi processi può essere causa di erronei movimenti epiteliali, perturbazioni nella transizione epitelio mesenchimale (*Epithelial-Mesenchymal Transformation*, EMT), o mancata apoptosi che, determinando un'anomala morfogenesi del labbro superiore e/o del palato, danno come risultato una schisi. Durante la 6° sesta settimana di embriogenesi, immediatamente prima della fusione con il processo mascellare, le prominente nasali mediali presentano un picco di proliferazione cellulare che porta a un incremento di suscettibilità agli insulti teratogeni, aumentando la possibilità di fallimento della fusione e di formazione di schisi del labbro, del processo alveolare e del palato primario (Marazita & Mooney 2004; Merritt 2005; Dudas et al. 2007; Mossey et al. 2009; Shkoukani et al. 2014). Le schisi del palato secondario sono invece dovute a fallimenti nei processi di elevazione, contatto, adesione o fusione dei processi palatini che avvengono tra la 7° e la 10° settimana di embriogenesi (Marazita & Mooney 2004).

Considerando una primaria distinzione anatomica, le schisi orofacciali vengono suddivise in tre categorie principali:

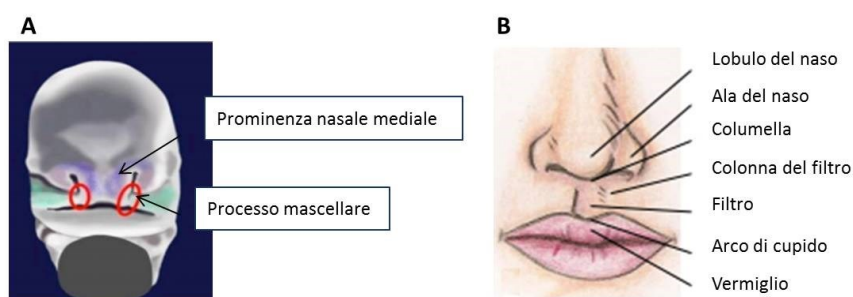
- **CL:** *cleft lip*, schisi del solo labbro
  - **CLP:** *cleft lip and palate*, schisi del labbro e del palato
  - **CP:** *cleft palate*, schisi del solo palato
- } **CL/P:** *cleft lip with or without cleft palate*

CL e CLP sono storicamente considerate come varianti dello stesso difetto (schisi del labbro con o senza schisi del palato, CL/P), con differenza solo nel grado di severità (CL fenotipo *mild*, CLP fenotipo *severe*): il fallimento dei corretti processi di fusione del labbro e del palato primario andrebbero infatti a rendere più difficoltoso il corretto allineamento e contatto dei processi palatini, interferendo con i meccanismi di fusione e formazione del palato secondario (Rahimov et al. 2012). Tuttavia, tale accorpamento è tuttora controverso: recenti studi mostrano l'esistenza di una differenza qualitativa tra i rischi di ricorrenza e i modelli di trasmissione di queste due categorie di *cleft*, e suggeriscono una chiara separazione nella classificazione tra CL e CLP (Harville et al. 2005; Rahimov et al. 2012; Watkins et al. 2014).

La suddivisione di CL e CLP (o CL/P) rispetto a CP isolati è invece supportata da dati eziologici e dal fatto che, in famiglie che presentano ricorrenza di schisi, la tipologia di *cleft* che segrega è tendenzialmente la medesima: famiglie con ricorrenza di CL/P solitamente non presentano membri affetti da CP, e viceversa; eccezioni sono rappresentate da famiglie con segregazione di tipologie miste di *cleft (mixed-cleft)*, frequenti per lo più in sindromi. La patogenesi tra CL/P e CP sembra quindi essere distinta (Mossey et al. 2009; Watkins et al. 2014; Shkoukani et al. 2014).

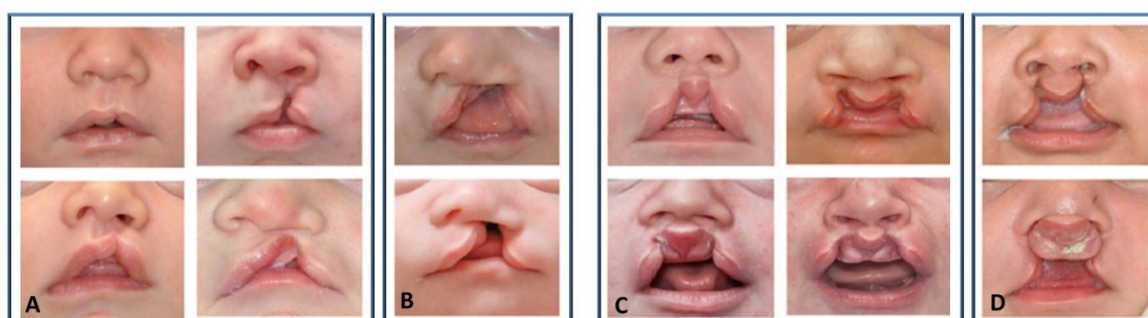
### 1.3.1. Cleft Lip

Il termine *Cleft lip* può riferirsi a qualsiasi combinazione di difetti che coinvolgono le strutture anteriori al forame incisivo, ossia il labbro superiore, il processo alveolare (segmento anteriore della mascella che forma l'arcata dentale e serve da supporto per i denti), e il palato primario: si tratta, come precedentemente descritto, di fenotipi embriologicamente riconducibili a una perturbazione nei processi di crescita e fusione dei processi nasali mediali con i processi mascellari (Wang et al. 2014).



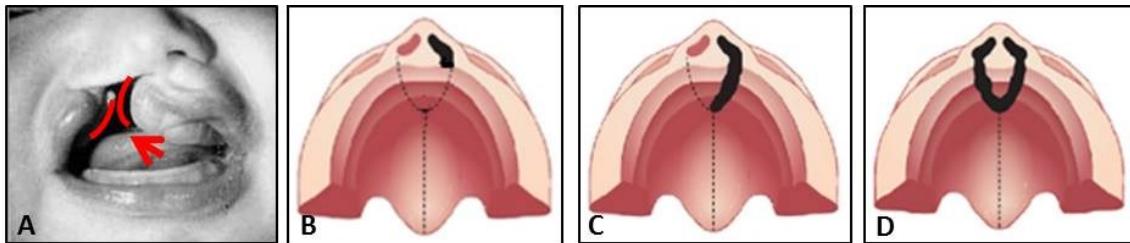
**Figura 5:** A. vista frontale di un embrione di circa 6 settimane. I cerchi in rosso evidenziano i punti di giunzione tra prominenze nasali mediali e processi mandibolari: la mancata fusione a livello di tali giunzioni determina *cleft lip*. B. Rappresentazione del labbro superiore completamente sviluppato e non affetto da schisi.

Il generico termine "*Cleft lip*" racchiude dunque in realtà un ampio ed eterogeneo gruppo di sub-fenotipi con diversi gradi di estensione e severità; in maniera approssimativa, si possono distinguere schisi complete, incomplete, unilaterali e bilaterali (Figura 6)



**Figura 6: Esempi di diversi sub-fenotipi di *cleft lip*.** A. Quattro diversi casi di *cleft lip* unilaterale sinistro (*Unilateral Cleft Lip*, UCL) incompleto, con diverso grado di estensione e di coinvolgimento dell'alveolo mascellare. B. Due casi di *cleft lip* completo unilaterale sinistro. C. Quattro casi di *cleft lip* bilaterale (*Bilateral Cleft Lip*, BCL) incompleto con diversa estensione. D. *Cleft lip* bilaterale completo. Nell'immagine in basso a destra è visibile la premaxilla, ossia il segmento intermascellare che a causa della mancata fusione con i processi mascellari risulta spostato in avanti (Wang et al. 2014).

Una schisi completa si sviluppa attraverso tutto il labbro fino alla base della narice nasale, determinando problemi della pelle, della mucosa, della muscolatura, dell'osso e alterando la simmetria del naso. Anche il *cleft* dell'alveolo mascellare, che solitamente accompagna le forme complete (Figura 7), può a sua volta essere suddiviso in completo o frastagliato. Una schisi incompleta può avere diversi livelli di estensione, attraversando l'*orbitacularis oris* (muscolo del labbro) e la pelle lasciando una porzione di tessuto labiale intatta (Crockett & Goudy 2014; Wang et al. 2014).



**Figura 7: Cleft lip completo con eventuale coinvolgimento del processo alveolare.** A. Visione frontale di UCL destro completo con schisi alveolare B. Rappresentazione di UCL sinistro, visione ventrale del palato senza *cleft* del processo alveolare. C. Rappresentazione di UCL sinistro, visione ventrale del palato con *cleft* del processo alveolare laterale e del palato primario D. Rappresentazione di BCL, visione ventrale del palato con coinvolgimento alveolare; la giunzione delle schisi è a livello del forame incisivo (L A Brito et al. 2012).

In alcuni casi, un residuo lembo di tessuto epiteliale può connettere il labbro o l'alveolo funzionando da "ponte"; questo tessuto anomalo è nominato "banda di Simonart" (Figura 8) (Crockett & Goudy 2014; Wang et al. 2014).



**Figura 8: caso di schisi con presenza di banda di Simonart**

### 1.3.2. Cleft Lip and Palate

La fessurazione riguarda il labbro superiore, il processo alveolare della mascella e il palato duro e/o molle. Nella forma unilaterale (*Unilateral Cleft Lip and Palate, UCLP*) la fessurazione interessa il processo alveolare laterale in corrispondenza della zona che si trova tra l'incisivo laterale e il canino, dirigendosi verso il dotto naso-palatino; da lì arriva al centro del palato duro e molle creando una comunicazione oro-nasale dovuta all'attività muscolare della lingua sui processi palatini. Nella forma bilaterale (*Bilateral Cleft Lip and Palate, BCLP*), le fessurazioni dei due lati si incontrano in corrispondenza del dotto nasopalatino arrivando nel palato sempre in posizione centrale (Farronato et al. 2014).

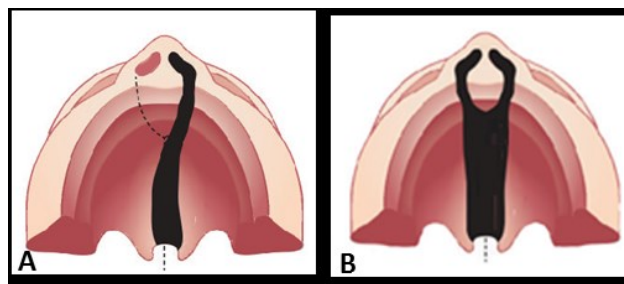


Figura 9: *Cleft lip and palate*; visione ventrale del palato. A. CLP unilaterale sinistro completo B. CLP bilaterale completo (Brito et al. 2012).

I CLP completi rappresentano le tipologie di schisi orofacciali più invalidanti: la funzionalità del palato è infatti compromessa, i muscoli del labbro superiore e della porzione inferiore del naso non possono unirsi, e l'integrità muscolare della regione risulta altamente danneggiata; la crescita del segmento minore del complesso maxillo-facciale appare ridotta, probabilmente a causa dell'assenza di stimolazione da parte dei muscoli nasolabiali. Tali alterazioni della funzione dei muscoli sul lato della schisi sono inoltre causa di asimmetria del naso e altre alterazioni fisionomiche.

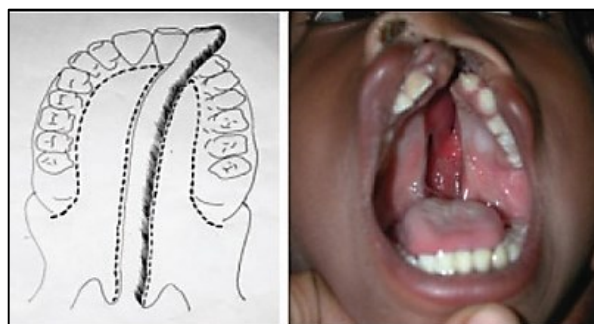
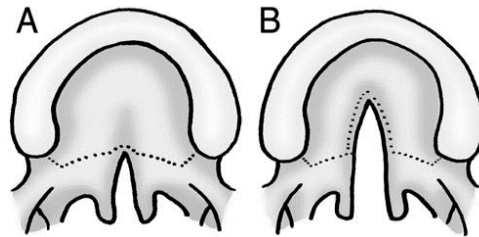


Figura 10: caso di *Unilateral Cleft lip and Palate* completo.



### 1.3.3. Cleft Palate

Le schisi del solo palato si presentano a livello del palato secondario (posteriormente al forame incisivo) e possono interessare sia il palato duro che molle (*cleft hard and soft palate*), oppure solo il palato molle (*cleft soft palate*) (Figura 11). Solitamente, la schisi parte dal dotto nasopalatino e arriva fino al palato molle (Brusati R 1999; Farronato et al. 2014).



**Figura 11: Rappresentazione schematica di Cleft Palate (CP).** A. schisi del solo palato molle. B. schisi di palato molle e palato duro (Shkoukani et al. 2014).

Anche in questo caso la schisi può avere diversi livelli di estensione, e sono quindi distinguibili forme complete e incomplete (Figura 12). Le diverse tipologie di schisi del palato sono associate a livelli variabili di deformità e disfunzioni. Il *cleft* del palato duro è correlato a inadeguatezza ossea, mentre il *cleft* del palato molle coinvolge la muscolatura palatina; il palato molle è infatti costituito da cinque paia di muscoli: i tensori del palato, gli elevatori del palato, i muscoli dell'ugola, i muscoli glossopalini e faringopalatini (Huang et al. 1998; van Aalst A et al. 2008; Shkoukani et al. 2014). Questi muscoli formano una "fascia", e sono coinvolti nella chiusura della nasofaringe durante la deglutizione e la funzione fonatoria, e controllano il corretto funzionamento delle trombe di Eustachio. In presenza di una schisi tali muscoli possono essere assenti, ipoplastici o anomali, determinando una perdita della corretta funzione palatale con conseguente insufficienza della velofaringe (*Velopharyngeal Insufficiency, VPI*) (Friedman et al. 2010; Shkoukani et al. 2014).



**Figura 12: A.** Schisi del solo palato molle. **B.** Schisi incompleta di palato molle e palato duro. **C.** Schisi completa di palato molle e palato duro (Silva Filho et al. 2007).

#### 1.3.4. Fenotipi sub-clinici

Nonostante l'ampio *range* di manifestazioni fenotipiche, le schisi vengono tipicamente considerate come un tratto semplice e qualitativo (affetto vs. non affetto). Evidenze recenti suggeriscono invece che, in famiglie con ricorrenza di schisi, i membri considerati "non affetti" possano manifestare delle caratteristiche subcliniche. Alcune di queste caratteristiche possono essere rappresentate dalla misura della regione craniofacciale, anomalie dentali (agenesia dentale, microdonzia, denti sovranumerari) e differenze nella struttura cerebrale (Leslie & Marazita 2013); fenotipi subclinici di CL/P includono i difetti occulti dell'*orbicularis oris*, le microforme di *cleft* (ovvero "solchi" a livello del bordo del vermiglio del labbro che non vanno a danneggiare la funzionalità muscolare del labbro) o mini-microforme di *cleft*, definite come "qualsiasi danneggiamento della giunzione vermiglio-cutanea senza elevazione dell'arco di cupido" (Yuzuriha & Mulliken 2008; Wang et al. 2014). Fenotipi subclinici di CP sono invece rappresentati dalle Palatoschisi Sottomucosa (*Submucous Cleft Palate, SMCP*): sia palato molle che palato duro sono ricoperti da una membrana mucosa e in alcuni casi, sebbene la mucosa appaia intatta, le ossa e/o i muscoli al di sotto di essa non sono adeguatamente saldati a livello della linea mediana. Solitamente, caratteristiche associate a SMCP includono ugola bifida (piccola schisi visibile esternamente solo a livello dell'ugola), zona pellucida (regione mediale di colore bluastro), insufficienza velofaringea (VPI), e un infossamento a livello della porzione posteriore del palato duro. Sebbene meno gravi rispetto ai CP, anche le schisi sottomucose sono causa di danni funzionali, in particolar modo a livello fonetico (Ha et al. 2013; Shkoukani et al. 2014).

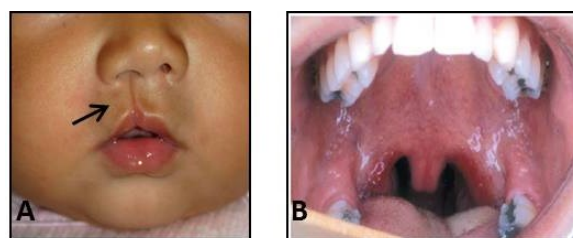


Figura 13: A. Microforma di *cleft lip*. B. Ugola bifida.

### 1.3.5. Sistemi di classificazione delle Schisi Orofacciali

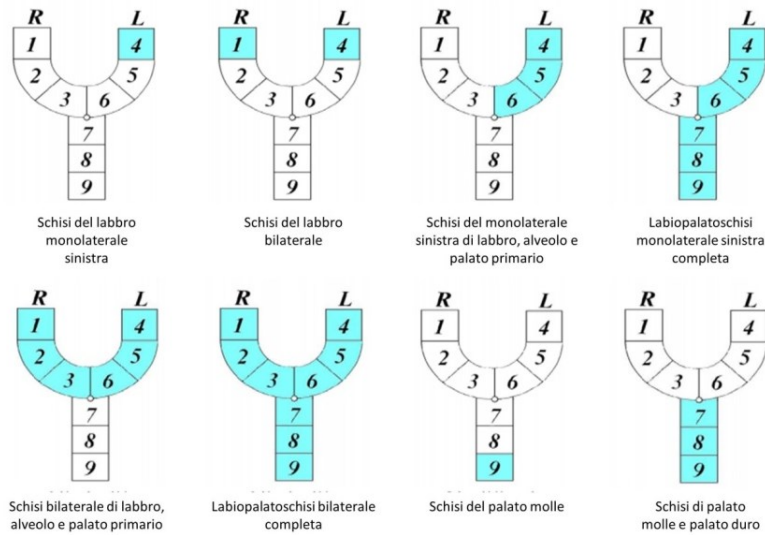
Le schisi orofacciali sono una tipologia di malformazione congenita che presenta un ampio spettro di variabilità fenotipica; la sola suddivisione in tre principali categorie anatomiche (CL, CLP e CP) non risulta dunque esaustiva, poiché questi gruppi sono a loro volta estremamente eterogenei.

Numerosi sono i sistemi di classificazione delle schisi sviluppati per facilitare diagnosi, trattamento chirurgico, terapie e ricerca, e che sono stati riportati in letteratura in ambito chirurgico e dentale. Tali sistemi sono primariamente distinti tra anatomici e basati sull'embriologia: mentre i clinici tendono a classificare le schisi concentrandosi su estetica e funzionalità, genetisti e biologi evolutivisti concentrano l'attenzione su aspetti legati a differenze fenotipiche e di ereditarietà e su espressione genica e morfogenesi tissutale. Tali differenze nell'approccio di studio della patologia hanno ostacolando lo sviluppo di un sistema di classificazione utilizzabile e universalmente riconosciuto (Mooney 2008). Incoerenze nell'uso di terminologie, livelli variabili di sub-classificazione, e ambiguità in alcune descrizioni, hanno contribuito ad aumentare la complessità delle ricerche volte a comprendere le basi eziologiche delle OFCs, a migliorare il trattamento per i pazienti, e a intensificare i sistemi di prevenzione.

In un recente studio (2014), Wang e colleghi hanno confrontato più di 20 sistemi di classificazione delle schisi orofacciali (focalizzandosi in particolar modo sulla classificazione delle labioschisi) al fine di identificare le discrepanze esistenti tra i diversi modelli, auspicando alla futura creazione di uno *standard* universalmente accettato che possa condurre a una migliore comprensione delle cause e delle variazioni nelle manifestazioni fenotipiche del *cleft*.

Tra i sistemi di classificazione uno dei più dettagliati e maggiormente utilizzati nella pratica clinica, è il diagramma a Y creato da Kernahan nel 1971, illustrato in Figura 14: ad ogni area numerata corrisponde una determinata zona della bocca. L'estensione del *cleft* viene indicata segnando la corrispondente area colpita direttamente sul diagramma:

- Aree 1 e 4: labbro destro e sinistro (rappresentano le linee di fusione tra i processi mascellari e le prominente nasali mediali a livello del labbro).
- Aree 2 e 5: alveolo destro e sinistro (rappresentano le linee di fusione tra i processi mascellari e il segmento intermascellare).
- Aree 3 e 6: palato primario (rappresentano le linee di fusione tra il palato primario e secondario, anteriormente il forame incisivo).
- Aree 7 e 8: palato duro (rappresenta la linea di fusione tra i processi palatini del palato duro, posteriore al forame incisivo).
- Area 9: palato molle.

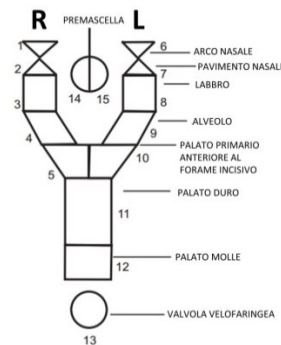
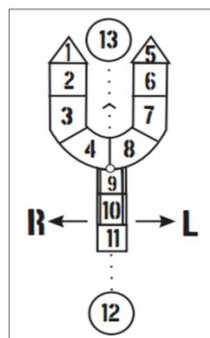


**Figura 14: Rappresentazione dei principali tipi di schisi nel diagramma ad Y (Kernahan 1971). \*R = destra (right) \*L = sinistra (left)**

Tale diagramma non fornisce però alcuna indicazione inerente la completezza/incompletezza di un eventuale *cleft lip*; per ovviare a tale mancanza, nel 1973, Elshahy modifica l'iniziale diagramma di Kernahan aggiungendo alcuni dettagli, illustrati in Figura 15 (Elshahy 1973):

- Aree 1 e 5: base delle narici.
- Aree 2 e 6: labbra superiori.
- Aree 3 e 7: alveoli.
- Aree 4 e 8: palato primario anteriore al forame incisivo;
- Aree 9 e 10: palato duro; le due frecce a destra e a sinistra servono ad indicare la possibile dislocazione della schisi del palato verso una delle due direzioni.
- Area 11: palato molle.
- Area 12: superficie faringea posteriore.
- Area 13: premaxella.

Un'ulteriore modifica è stata infine apportata da parte di Friedman e colleghi (Friedman et al. 1991), che aggiungono al diagramma gli archi nasali e il pavimento delle narici (Figura 15).



**Figura 15: modificazioni del diagramma ad Y apporate da Elshahy nel 1971 (a sinistra); Figura 16: Friedman nel 1991 (a destra)**

### 1.3.6. Schisi orofacciali sindromiche e non-sindromiche

Un'ulteriore e importante categorizzazione delle schisi orofacciali consiste nella distinzione tra schisi sindromiche (*syndromic Orofacial Cleft*, sOFC) e non-sindromiche (*non-syndromic Orofacial Cleft*, nsOFC). Le schisi non-sindromiche sono le più frequenti e si presentano sotto forma di difetto isolato, senza associazioni ad altre apparenti anomalie; le schisi sindromiche sono invece riconosciute come parte di una più completa patologia (sindrome), definita come insieme di anomalie multiple aventi un'eziopatologia collegata (Rahimov et al. 2012). Spesso si tratta di patologie a trasmissione mendeliana, con eziologia monofattoriale (Setó-Salvia & Stanier 2014; Leslie & Marazita 2013).

Le principali malformazioni che si presentano in concomitanza con le sOFC consistono per lo più in anomalie dentali (agenesie dentali, microdonzia, macrodonzia, iperodonzia), anomalie della cefalometria e del cervello (alterazioni del volume intracraniale, irregolarità nel tessuto del cervelletto, *deficit* del volume tissutale all'interno strutture corticali e subcorticali), anomalie cardiovascolari congenite, *deficit* dell'udito, difetti muscoloscheletrici, problemi respiratori e agli occhi, malformazioni degli arti e anomalie agli organi urinari e genitali.

In diversi casi il fenotipo clinico appare confondibile con quello di una schisi non-sindromica, in cui la presenza della sindrome è identificabile solo attraverso il riconoscimento di caratteristiche fenotipiche minori. Un classico esempio è rappresentato dalla Sindrome di van der Woude (VWS), la più nota e comune forma di OFC sindromica, che costituisce circa il 2% di tutti i casi di *cleft lip and/or palat*, con una prevalenza di circa 1/34.000 nuovi nati (Leslie & Marazita 2013). Caratteristica fenotipica peculiare di questa sindrome è la presenza, nell'85% dei casi, di fistole o fossette (dette "*pits*") sul labbro inferiore. Ulteriori malformazioni associate a questa sindrome sono ipodonzia, mancanza dei secondi premolari mascellari o mandibolari e dell'incisivo laterale mascellare, anchiloglossia (cioè una malformazione della cavità orale che consiste nell'eccessiva aderenza della lingua al pavimento della bocca) e, in alcuni casi, presenza di malformazioni popliteali e malformazioni cardiache congenite (Setó-Salvia & Stanier 2014). Nella sindrome di van der Woude (come in molte altre sindromi legate al *cleft*) non è raro riscontrare famiglie con ereditarietà di tipo autosomico dominante con fenotipi misti di CL/P e CP (Kondo et al. 2002). Altre *cleft-syndroms* tra le più conosciute sono la Sindrome Popliteale del Pterygium (PPS), disordine che accompagna malformazioni orofacciali a gravi deformazioni degli arti e dei genitali (Kondo et al. 2002), la Displasia Ectodermica, sindrome con presenza di sindattilia, deformità agli arti e, in alcuni casi, ritardo mentale (Marwaha & Nanda 2012), e la sequenza di Pierre Robin (*Pierre Robin sequence*, PRS).

La PRS è solitamente caratterizzata dalla presenza di una “triade” costituita da: micrognazia/retrognazia (mandibola piccola/spostata all’indietro), *cleft palate* (solitamente a forma di U anziché nella classica forma a V) e glossoptosi (posizione anormale e posteriore della lingua). Una sequenza si definisce come un “*pattern* di anomalie multiple che derivano da una precedente singola anomalia nota o presunta o da un fattore meccanico” (Spranger et al. 1982); in altre parole, una serie di eventi si verifica in sequenza, determinando uno specifico fenotipo malformativo. Dopo la chiusura del labbro superiore e del palato primario, la lingua è posta tra i due processi palatini, che sono cresciuti verticalmente e lateralmente a quest’ultima; durante l’ottava settimana di embriogenesi, la mandibola effettua uno “scatto” di crescita anteriormente, permettendo alla lingua di scendere e assumere la corretta posizione all’interno della mandibola e, successivamente, ai processi palatini di innalzarsi orizzontalmente, allinearsi e fondersi. La sequenza di Pierre Robin deriva dunque dall’alterazione nei meccanismi di crescita della mandibola, che comporta mal posizionamento della lingua la quale è, a sua volta, causa della schisi del palato. Approssimativamente il 40% delle PRS sono non-sindromiche, mentre il restante 60% si manifesta nel contesto di altre sindromi, come ad esempio la Sindromi di Stickler e la Sindrome Velo-cardio-facciale (Watkins et al. 2014).

## 1.4. Diagnosi

### 1.4.1. Diagnosi prenatale

La diagnosi precoce può essere effettuata in utero tramite ecografia (*ultrasound scanning, US*) a partire dalla 17° settimana di gestazione; non tutti i difetti risultano però visibili dalle immagini ecografiche ed esiste dunque il rischio di incorrere in falsi negativi o, al contrario, in falsi positivi. Da alcuni anni è stata introdotta una particolare tipologia di ecografia tridimensionale (3D US) che permette di identificare con accuratezza la presenza di anomalie a livello del labbro e del palato primario; grazie alla visualizzazione esclusiva delle strutture ossee, il difetto è ben caratterizzabile ed è possibile discriminare con buona efficienza un eventuale CL da un CLP. Diversi studi hanno dimostrato che l'ecografia 3D è un metodo diagnostico per le schisi orofacciali migliore rispetto alla classica ecografia bidimensionale (Lee et al. 1995; Lee et al. 2000; Mittermayer et al. 2004).



**Figura 16:** Immagine ecografica in 3D (a 38 settimane di gestazione) in cui è evidente la presenza di labioschisi monolaterale destra (Mittermayer and Lee, 2003).

Le OFCs implicano numerosi interventi chirurgici e una lunga fisioterapia, presupponendo un peso enorme sia in termini economici che sanitari. Avere la possibilità di effettuare una diagnosi prenatale diventa dunque estremamente importante, non solo perché permette ai clinici di prendere provvedimenti immediati alla nascita del malformato, ma anche perché rende possibile l'effettuazione di un consulto chirurgico antecedente alla nascita, aiutando i genitori ad affrontare al meglio i trattamenti a cui dovrà sottoporsi il neonato (Farronato et al. 2014; Crockett & Goudy 2014).

### 1.4.2. Diagnosi perinatale e post-natale

Il pediatra ha il compito di identificare e confermare i difetti anatomici e di determinare il fenotipo clinico della malformazione, inclusa l'eventuale associazione a sindromi. In particolare, il palato deve essere esaminato utilizzando un depressore della lingua e palpazione manuale per accertare l'eventuale presenza di schisi sottomucose. La cavità orale deve inoltre essere esaminata per valutare la presenza o assenza di alcuni denti, il grado di estensione di un possibile *cleft* del palato molle e/o duro, la presenza o assenza dell'ugola e qualsiasi evidenza di *pits* del labbro o del palato. Rigurgiti di fluidi nasali, ugola bifida e zone traslucide del palato sono sintomi estremamente importanti che devono essere esaminati dal pediatra (Habel et al. 1996; Farronato et al. 2014). Un'ulteriore anomalia fisica che può essere associata a CL/P è l'insufficienza velofaringea (*velopharyngeal insufficiency, VPI*); in caso di sospetta VPI, è necessario effettuare due semplici esami (in particolare intorno all'età di 3-4 anni): una video-fluoroscopia multi prospettica (un esame a raggi X effettuato durante la fonazione) e una naso-laringoscopia (Shprintzen & Golding-Kushner 1989). Queste tecniche permettono, utilizzando un endoscopio flessibile a fibre ottiche, di ottenere una visuale superiore della valvola velo-faringea. I pazienti devono dunque essere attentamente esaminati in modo da identificare qualsiasi alterazioni delle vie aeree; inoltre, deve essere effettuata una completa analisi fisica in modo da individuare eventuali malformazioni che possano suggerire una sindrome o un disordine genetico associato (Arosarena 2007).

## 1.5. Trattamenti

Se non corrette chirurgicamente, le schisi orofacciali rappresentano causa mortalità precoce o di grave disabilità nei sopravvissuti. Fin dal 1940 le cure chirurgiche sono disponibili per la maggior parte dei neonati in tutto il mondo sviluppato; tuttavia, nei paesi sottosviluppati, solo alcuni bambini affetti possono avere accesso alla chirurgia, e i livelli di mortalità neonatale causati da questa malformazione rimangono estremamente alti (Mossey et al. 2009).

Il periodo ottimale durante il quale eseguire una prima valutazione del trattamento cui sottoporre un bambino affetto da *cleft* è a pochi giorni dalla nascita. Il piano di cure per ciascun neonato è definito da un'*equipe* di medici (inizialmente composta da chirurgo, pediatra, genetista, specialisti della nutrizione; successivamente anche da otorinolaringoiatra, ortodontista, logopedista, psicologo) e comunicato alla famiglia. Abitualmente si raccomanda un regolare monitoraggio da parte dell'intera *equipe*, inizialmente per valutare la crescita e lo sviluppo, successivamente per



controllare le orecchie, il naso e la gola, la capacità di linguaggio e la presenza di eventuali problemi di sviluppo (Kasten et al. 2008; Farronato et al. 2014; Crockett & Goudy 2014). Il trattamento ortodontico di eventuali anomalie dentali normalmente ha inizio durante i primi anni di età scolare. La chirurgia per la ricostruzione del labbro e del palato è affrontata entro il primo anno di vita, poiché il *cleft* determina danni a livello cutaneo, muscolare, cartilagineo, mucoso e osseo, che diventano estremamente limitanti a livello di comunicazione, espressività facciale e estetica (McCarthy 1990).

### **1.5.1. Periodo perinatale**

È importante che i genitori siano avvisati tempestivamente circa la nascita di un bambino affetto da un'anomalia congenita e che, a poche ore dal parto, un consulente o un pediatra informino immediatamente la famiglia su tutti gli aspetti che riguardano la patologia. Idealmente, i genitori dovrebbero essere messi in contatto con un membro dell'equipe multidisciplinare entro le prime 24 ore dalla nascita (Kasten et al. 2008). Durante il primo periodo di vita del neonato, i problemi più gravi riguardano solitamente l'ambito respiratorio (in particolare nel caso della sequenza di Pierre Robin) e l'alimentazione. Particolari istruzione e assistenza devono dunque essere forniti ai genitori per quanto riguarda l'alimentazione del bambino; all'interno dell'ospedale può anche essere richiesto il supporto di un consulente per l'allattamento e di un terapeuta del linguaggio che affianchino i genitori (Habel et al. 1996). La fabbricazione di particolari placche ortopediche preoperatorie è considerata utile nel facilitare l'alimentazione del neonato e per facilitare la riparazione del *cleft*, insieme all'utilizzo di specifiche tipologie di biberon e tettarelle (Winters & Hurwitz 1995). L'alimentazione nasogastrica non è richiesta nella maggior parte dei casi ed è evitata quanto più possibile. Tuttavia, l'utilizzo della via naso-faringea risulta necessaria in caso di ostruzioni o altre gravi difficoltà respiratorie dovute ad anomalie anatomiche (Kasten et al. 2008; Farronato et al. 2014).

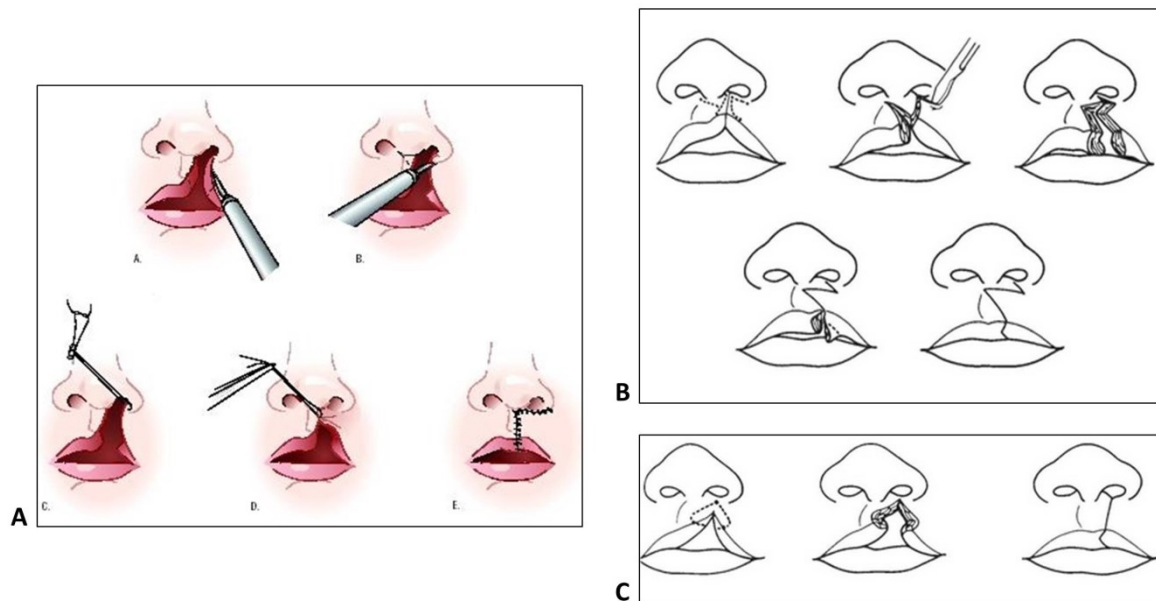
Il chirurgo deve esaminare il neonato a cui è stata identificata una schisi immediatamente dopo la nascita, valutando l'anatomia di labbro superiore, archi alveolari, narici, palato primario e palato secondario. Particolare attenzione deve essere prestata alle caratteristiche nasali (simmetria alare, proiezione della punta, posizione della parte basale) in presenza di una schisi del labbro. L'estensione del *cleft* deve essere classificata come descritto nei capitoli precedenti. Prima del trattamento chirurgico è necessario che il bambino raggiunga un adeguato peso corporeo (almeno 4.5 Kg) (Crockett & Goudy 2014).

Le tempistiche e gli approcci chirurgici variano notevolmente nei diversi centri di cura e da un paese all'altro. In Europa, un'iniziativa di *networking* fondata dall'Unione Europea nel 1990, ottenne consenso su una serie di raccomandazioni sul *cleft care delivery*, che furono successivamente adottate dalla *World Health Organization* (WHO). Tuttavia, i risultati registrati da parte di un servizio di sorveglianza del *network* hanno evidenziato come tali linee guida raramente siano state messe in pratica (Shaw et al. 2001); l'evidenza della mancanza di una solida base per la selezione dei protocolli di trattamento è resa esemplare dalla diversità di cure chirurgiche utilizzate in Europa nell'ambito di un solo fenotipo di schisi, ovvero il *cleft* unilaterale completo di labbro, alveolo e palato: nei 201 team che operano questo tipo di difetto, sono applicati 194 diversi protocolli chirurgici e solo la metà dei gruppi esaminati utilizza tecniche ortopediche pre-chirurgiche. Il progetto WHO "*International Collaborative Research on Craniofacial Anomalies*" ha evidenziato la necessità di una maggiore comunicazione e collaborazione internazionale sulle strategie per migliorare le cure cliniche e standardizzare gli *outcomes* (Mossey et al. 2009).

Solitamente le riparazioni di schisi del labbro avvengono intorno ai 3 mesi di vita e intorno ai 4-5 mesi quando possibile. Molti clinici considerano i 3 mesi come un periodo sufficiente per l'effettuazione di un'anestesia sicura e per un'efficiente riparazione labiale (Kapp-Simon 2004).

Le molteplici tecniche che possono essere utilizzate per il ripristino delle funzioni e dei corretti contorni anatomici del labbro hanno il comune obiettivo nel cercare di ottenere un volto il più possibile simmetrico e bilanciato; le metodologie più note sono la "chiusura a linea retta" (Thompson 1912), la "riparazione geometrica" o "*triangular-flap-repair*" (Tennison 1952; Randall 1959), la tecnica di "avanzamento rotatorio" (Millard 1976) e le varie modifiche che, negli anni, sono state proposte a tali tecniche. Ciascuna di queste metodologie di riparazione si basa sul tentativo di "allungare" il lato del labbro privo di schisi creando una cicatrice alla base della columella (tecnica di Millard) o sopra il vermiglio (linea dritta di Thompson). È da tenere presente che ciascuna malformazione è unica, con lievi differenze da paziente a paziente, e richiede un certo livello di improvvisazione e abilità da parte del chirurgo (Crockett & Goudy 2014).

Un altro approccio chirurgico diffuso è la cosiddetta "riparazione funzionale", descritta da Delaire (Markus & Booth 1995). Molti chirurghi maxillo-facciali sostengono questo metodo rispetto alle tecniche solitamente utilizzate dai chirurghi plastici, sebbene vi siano alcuni pareri discordanti in merito all'efficacia di tale tecnica, e i risultati più soddisfacenti siano stati raggiunti tramite l'utilizzo delle classiche tecniche utilizzate in chirurgia plastica (Farronato et al. 2014).

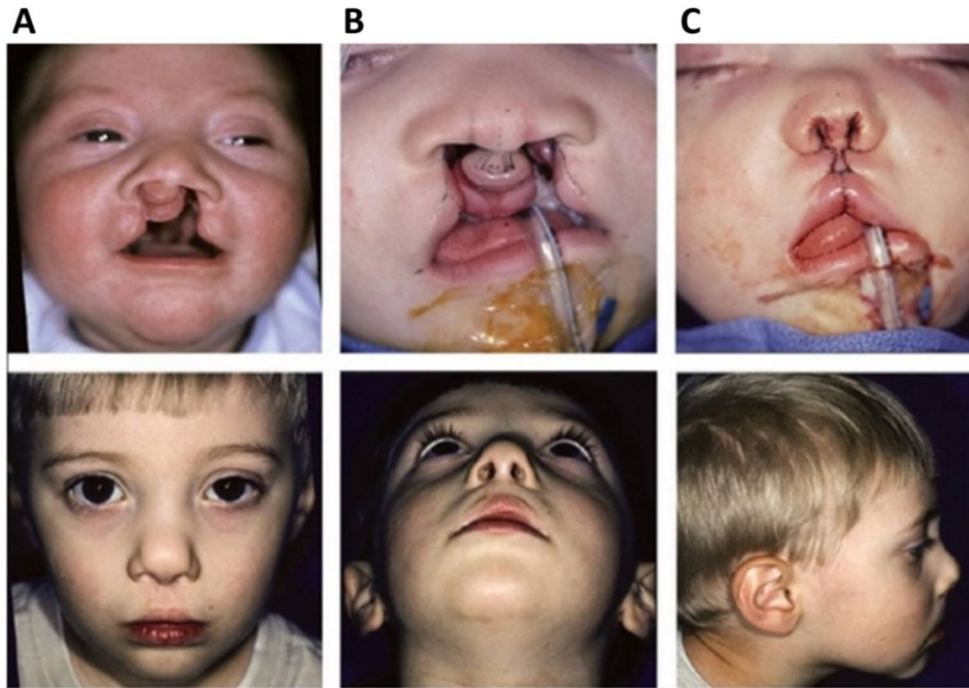


**Figura 17: Rappresentazioni delle diverse tecniche di riparazione chirurgica di schisi del labbro monolaterale.** A. Tecnica della chiusura a linea retta. B. Tecnica dell'avanzamento rotatorio. C. Riparazione geometrica.

Anche nel caso delle schisi bilaterali, esistono numerosi protocolli che producono ottimi risultati, tra cui la riparazione bilaterale nell'infanzia con allungamento della columella in un secondo intervento effettuato più tardivamente, tecniche che prevedono un solo intervento di riparazione del *cleft* (*1-stage cleft repair*) che possono includere o meno una prima rinoplastica, e infine protocolli che prevedono una iniziale operazione di adesione del labbro con un riparo effettivo della schisi solo diversi mesi dopo. Recentemente è utilizzata in ampia misura la tecnica *1-stage cleft repair* che prevede l'immediato allungamento della columella (Crockett et Goudy, 2014).



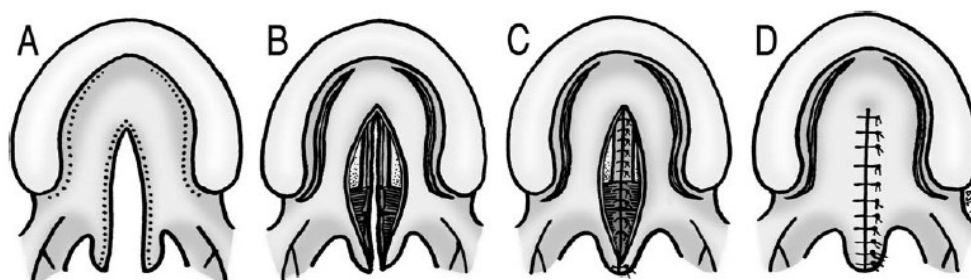
**Figura 18: Fotografia post-operatoria (a sinistra) e rappresentazione schematica (a destra) di schisi unilaterale nasolabiale dopo riparazione chirurgica con tecnica di riparazione geometrica (Meara et al. 2011).**



**Figura 19:** A. Immagine preoperatoria di neonato con schisi bilaterale completa di labbro e palato. B. Visuale intraoperatoria. C. Riparazione completa nasolabiale postoperatoria. Immagini sotto: aspetto del paziente a 2,5 anni di età (Mulliken 2009)

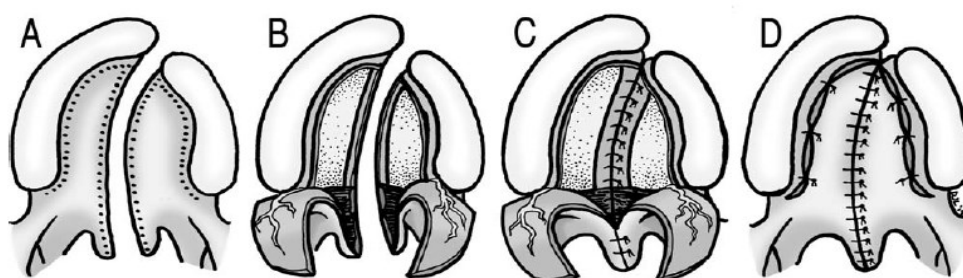
La riparazione delle schisi del palato si focalizza sulla separazione dei meccanismi nasali da quelli velo-faringei determinando il miglioramento della capacità di linguaggio, di alimentazione e di funzionalità delle tube di Eustachio, cercando di salvaguardare il quanto più possibile la corretta crescita della mascella e dell'arco dentale (Mars & Houston 1990). Esistono forti controversie su quale sia il periodo ottimale in cui eseguire la palatoplastica: se, infatti, riparazioni del *cleft* intorno ai 3-6 mesi di vita hanno mostrato un netto miglioramento nei risultati sulla capacità di linguaggio (Ysunza et al. 1998), svolgere l'operazione così precocemente aumenta la possibilità che si verifichino alterazioni della crescita del volto, con necessità di ulteriori interventi di chirurgia maxillo-facciale negli anni successivi. Il periodo di operazione consigliato per salvaguardare al meglio l'estetica del volto varia tra i 2 e i 15 anni di vita dell'affetto, tenendo presente però l'esistenza di forte rischio che lo sviluppo della capacità di linguaggio risulti altamente compressa. Solitamente l'operazione avviene perciò tra i 12 e i 24 mesi di vita del paziente, ossia nel periodo immediatamente antecedente lo sviluppo delle capacità di linguaggio (Shkoukani et al. 2014). I pazienti affetti da sequenza di Pierre Robin sono tipicamente trattati ad un'età più elevata (14-16 mesi) per evitare possibili ostruzioni delle vie aeree (Crockett & Goudy 2014). La palatoplastica può essere effettuata tramite l'utilizzo di diverse tecniche, a seconda che il *cleft* sia localizzato a livello del palato primario o secondario. In alcuni casi inoltre possono essere necessari più interventi per il recupero completo delle funzionalità di linguaggio, deglutizione e occlusione dentale. L'uso di apparecchi ortopedici pre-chirurgici, nel caso delle

schisi complete del labbro e palato è considerato particolarmente benefico: in particolare nel *cleft* unilaterale tali apparecchi sono utilizzati per cercare di ridurre le dimensioni della schisi e facilitare la riparazione, mentre nel *cleft* bilaterale mantengono in posizione la premascella, prevenendone lo spostamento in avanti (Strong & Buckmiller 2001). La tecnica di von Lagenback, illustrata in Figura 22 è attualmente la tecnica più utilizzata nella riparazione del *cleft* del palato secondario senza coinvolgimento del palato primario né del labbro.



**Figura 20: Riparazione di schisi del palato con tecnica di Lagenback.** A. Marcatura delle zone da incidere. B. Lembi palatali assiali pedunculati elevati lateralmente e mossi medialmente con l'aiuto dell'incisione. C. Chiusura dello strato superiore per separare la cavità nasale. D. Chiusura dei due lembi in prossimità della linea mediana del palato (Shkoukani et al., 2014).

La palatoplastica “*Two flap*” (Figura 23) è invece la maggiormente utilizzata nella riparazione dei *cleft* completi di labbro e palato unilaterali e bilaterali.



**Figura 21: riparazione di labiopalatoschisi con tecnica *Two flap*.** A. Marcatura delle zone da incidere. B. Elevazione dei lembi palatali con preservazione dei veli palatini superiori. C. Chiusura dello strato superiore per separare la cavità nasale e riparazione del muscolo elevatore del velo palatino. D. Completa chiusura. (Shkoukani et al. 2014).

### **1.5.2. Età prescolare**

In particolar modo nei casi di palatoschisi, il rischio di sviluppo di successivi disturbi nel linguaggio anche dopo l'operazione chirurgica è estremamente elevato: solo il 25% dei bambini con CL/P sviluppa una pronuncia normale dopo la chirurgia primaria, mentre il restante 75% richiede ulteriori interventi durante l'infanzia e l'adolescenza per raggiungere una sufficiente competenza linguistica (Habel et al. 1996; Kasten et al. 2008; Farronato et al. 2014). I difetti del linguaggio sono spesso causati da anomalie strutturali persistenti, come la VPI, problemi dentali e occlusionali, problemi di udito. Il più comune disturbo del tono è rappresentato dall'ipernasalità, la cui principale causa è, in caso di VPI, la chiusura inadeguata di strutture velo-faringee durante la fonazione. Il trattamento è di solito chirurgico (faringoplastica) oppure tramite l'uso di apparecchi protesici. Durante il periodo di normale sviluppo del linguaggio, in particolare nei primi 6 anni di vita, è fondamentale il monitoraggio del paziente da parte del logopedista, che continua parallelamente alla gestione ortodontica e linguistica (Farronato et al. 2012).

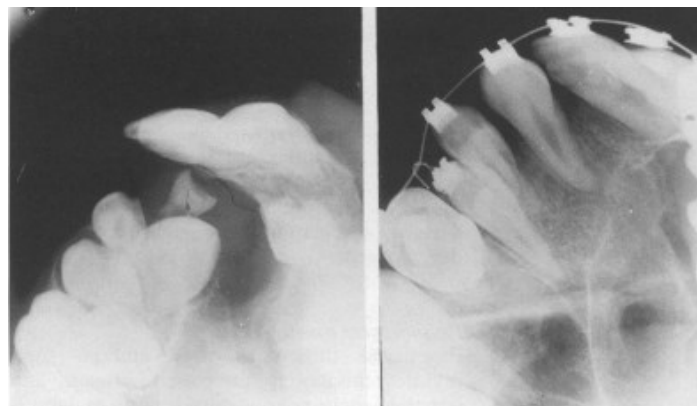
A causa di una frequente anomalia nell'inserzione del muscolo elevatore del palato a livello dell'orifizio faringeo della tuba di Eustachio, con conseguente scarsa aereazione e drenaggio dell'orecchio medio, i pazienti sono esposti ad aumentato rischio di infezioni (Sheahan et al. 2003; Goudy et al. 2006). In caso di infezioni ricorrenti o perdita di udito cronica, sono richiesti interventi chirurgici come la timpanoplastica o la mastoidectomia (Chapman et al. 1998; Ramana et al. 2005). Sono consigliati dunque controlli periodici da parte del chirurgo otorinolaringoiatra e dell'audiologo.

Il coinvolgimento di un ortodontista aumenta con l'eruzione della dentizione decidua e permanente. Se la schisi interessa il processo alveolare è infatti possibile riscontrare la presenza di denti malformati o soprannumerari e agenesie che portano a una compromessa estetica del volto; vi sono inoltre rischi di sviluppo di disordini nell'occlusione, correggibili al momento dell'eruzione della dentizione permanente (Habel et al. 1996; Farronato et al. 2014).

### 1.5.3. Età scolare

In questo periodo sono di particolare importanza la gestione ortodontica, l'innesto dell'osso alveolare e il sostegno psicologico.

Nel caso di schisi completa di labbro e palato, si ha un coinvolgimento dell'osso alveolare che può portare, anche dopo che labbro e palato sono stati riparati, alla formazione di una lacuna ossea che deve essere risolta a circa 6-7 o 9-11 anni di età (Kasten et al. 2008; Bergland et al. 1986). La lacuna ossea viene riempita da spongiosa, solitamente prelevata dalla cresta iliaca, creando una normale architettura alveolare grazie alla quale i denti possono erompere ed essere successivamente spostati ortodonticamente. Dopo tre mesi l'osso innestato è indistinguibile dall'osso locale, anche radiograficamente (Boyne PJ 1976). In occasione di tale intervento, il chirurgo ha l'opportunità di riparare eventuali fistole residue e migliorare l'aspetto del naso. Dopo 3-4 anni dalla fase di innesto osseo (intorno ai 12-13 anni), si effettua il trattamento ortodontico definitivo. In alcuni pazienti, dopo multiple operazioni di labbro e palato, si sviluppano *deficit* di crescita mascellare con conseguente mascella ipoplastica e terzo medio del volto ridotto. Queste complicanze possono essere affrontate con apparecchi ortodontici nei casi meno gravi, o con ulteriori interventi nei casi più complicati (Kasten et al. 2008).



**Figura 22: Radiografia del danno all'osso alveolare prima (A) e dopo (B) l'operazione ortodontica di innesto dell'osso alveolare (Kasten et al. 2008).**

Grosse difficoltà emotive possono emergere durante questa fase dell'infanzia a causa di una scarsa autostima e problemi di relazione sociale, che vanno affrontate con l'aiuto di uno psicoterapeuta che si relazioni non solo in paziente, ma con anche i genitori e la famiglia (Crockett & Goudy 2014).

#### 1.5.4. Adolescenza

Un significativo numero di pazienti con CL/P manifesta un'alterazione della crescita facciale (retrusione mandibolare) solo dopo la pubertà, momento in cui la disarmonia facciale può diventare più evidente. Purtroppo la chirurgia palatale nella prima infanzia, fondamentale per permettere la fonazione, è la prima responsabile della comparsa di tali problemi durante la crescita. Attualmente la tempistica ideale per effettuare il primo trattamento chirurgico evitando tali effetti collaterali, non è nota. L'unico trattamento disponibile per la correzione della retrusione mandibolare è l'avanzamento chirurgico del mascellare superiore. In alcuni casi l'intervento può essere anticipato ai primi anni dell'adolescenza per limitare il più possibile i problemi psicologici causati da un aspetto disarmonico del viso, ma spesso l'intervento chirurgico è possibile solo a fine crescita, quando le strutture interessate dalla chirurgia hanno raggiunto la fine del loro accrescimento. Il naso è una delle ultime strutture a terminare lo sviluppo, così eventuali interventi di rinoplastica sono possibili solo negli ultimi stadi dell'adolescenza (Farronato et al. 2014; Crockett & Goudy 2014).

Questa lunga serie di trattamenti che si susseguono dalla nascita fino all'età adulta sono un pesante carico per il soggetto affetto e per la famiglia per quanto riguarda l'impatto sociale e psicologico; individui nati con schisi hanno infatti maggiore incidenza di problemi di salute mentale e un maggiore tasso di mortalità a tutti gli stadi della crescita (Wehby & Cassell 2010). Il *Cleft* è inoltre associato a un più elevato rischio di sviluppare diversi tipi di cancro, come il cancro al seno, al cervello e al colon, sia per quanto concerne gli individui con schisi che per i membri della famiglia (Wehby & Cassell 2010; Leslie & Marazita 2013).

L'impatto della patologia è infine gravoso anche per la società in termini di costi medici a lungo termine: si è stimato che il costo dei vari trattamenti nel corso della sua vita di un singolo paziente affetto da schisi orofacciale, ammonti approssimativamente a 200.000 \$ (Leslie & Marazita 2013).



Figura 23: Immagini fotografiche di un paziente affetto da labiopalatoschisi dalla prima infanzia all'età adulta (Salyer et al. 2009).



## 1.6. Epidemiologia

*Incidenza* e *prevalenza* sono due distinte misure utilizzate tradizionalmente negli studi epidemiologici al fine di quantificare l'*occorrenza* di una patologia in una popolazione, ossia la probabilità che la data patologia possa manifestarsi in un individuo la cui famiglia non presenta precedenti casi di *ricorrenza* (Watkins et al. 2014).

L'*incidenza* è definita come “numero di nuovi casi di patologia in una popolazione di individui che siano sottoposti a rischio di sviluppare la malattia in un dato periodo di tempo”; tale misura può essere espressa sia come proporzione, con il numero di individui che compongono la popolazione a rischio come denominatore, che sotto forma di una frazione dove il denominatore riflette il tempo considerato di rischio per la popolazione. La *prevalenza* invece è una misura statica, che descrive in numero di casi di malattia nella popolazione ad un determinato *time point* (Rothman et al. 2008; Watkins et al. 2014).

Negli studi epidemiologici dei difetti congeniti pubblicati negli ultimi anni, per descrivere l'occorrenza delle OFCs sono state utilizzate sia le misure di incidenza che quelle di prevalenza. Misurare la reale incidenza delle OFCs e di altri difetti congeniti è tuttavia virtualmente impossibile, a causa della difficoltà nell'accertamento di alcuni casi che occorrono durante il primo trimestre di gravidanza e che terminano spesso in aborto spontaneo, e nel definire la reale dimensione della popolazione a rischio (numero di concepimenti). Tipicamente infatti, le OFCs sono causate da fattori che agiscono durante le prime 9 settimane di gravidanza e, per misurare correttamente l'incidenza, si dovrebbero includere nella popolazione tutti gli embrioni che si trovino nel periodo gestazionale a rischio per lo sviluppo della malformazione; durante questo primo stadio della gravidanza molte donne non sono consapevoli di essere in stato interessante e un alto numero di aborti spontanei rimane inosservato. Per questo motivo è dunque impossibile quantificare il numero di concepimenti che raggiungono il periodo gestazionale di interesse nell'occorrenza delle OFCs (Mason et al. 2005).

La *prevalenza alla nascita*, che negli studi sui difetti congeniti è spesso semplificata come prevalenza, è una funzione del numero di nuovi casi di OFCs così come della sopravvivenza del feto, e rappresenta dunque la misura considerata più idonea per quantificare la frequenza delle OFCs al momento del parto (Rothman et al. 2008). Negli studi epidemiologici delle schisi orofacciali, la prevalenza viene espressa come rapporto tra numero di casi accertati di OFCs tra nati vivi, aborti spontanei (normalmente limitati alle 20 settimane di gestazione) e interruzioni volontarie di gravidanza (IVG) sul numero totale di nati vivi in un dato periodo di tempo. La stima è normalmente espressa per 10.000 nati vivi. Poiché il numero di morti fetali è molto piccolo rispetto al numero di nati vivi, l'esclusione della morte fetale dal denominatore possiede

un'influenza estremamente marginale sulla prevalenza stimata. Includere le morti fetali e le IVG al numeratore riflette invece in maniera più realistica la vera prevalenza delle OFCs al momento del parto; considerare solamente il numero di casi tra i nati vivi rappresenterebbe una sottostima della reale prevalenza delle OFCs (Mason et al. 2005; Watkins et al. 2014).

La prevalenza delle OFCs solitamente è riportata come proporzione di neonati affetti da CL/P e, distintamente, di neonati affetti da CP. La frequenza alla nascita di CL/P e CP in alcune parti del mondo non è tutt'ora nota; in molte altre zone dove tali informazioni sono invece disponibili, le differenze tra le provenienze dei campioni (popolazione o ospedale), la durata e il metodo di accertamento, i criteri utilizzati, e le fluttuazioni del campionamenti, rendono difficoltosa la comparabilità dei dati (Mossey & Little 2002). Tuttavia, i risultati a disposizione indicano che la frequenza globale delle schisi orofacciali si aggira intorno a 1 affetto ogni 700 nati vivi (Mossey & Catilla 2003; Birnbaum et al. 2009).

Uno degli studi epidemiologici più recenti è stato realizzato tramite la raccolta dati effettuata dall'*International Perinatal Database of Typical Orofacial Clefts* (IPDTC), fondato nel 2003 come parte di un progetto di collaborazione sull'epidemiologia delle anomalie craniofacciali da parte del *the National Institutes for Dental and Craniofacial Research* e canalizzato tramite il WHO *Human Genetics Programme*. IPDTC ha collezionato le informazioni su singoli casi di CL/P e CP tramite la collaborazione di tre organizzazioni di sorveglianza dei difetti congeniti: *European Surveillance Systems of Congenital Anomalies* (EUROCAT) in Europa, di cui fanno parte i due Registri Italiani delle regioni Emilia Romagna (Indagine sulle Malformazioni congenite in Emilia-Romagna, IMER, <http://www.registroimer.it/>) e Toscana (Registro Toscano dei Difetti congeniti, RTDC, <http://www.rtdc.it/>), il *National Birth Defects Prevention Network* (NBDPN) negli USA, e l'*International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research* (ICBDSR), che colleziona dati provenienti da tutto il mondo. L'analisi delle informazioni collezionate avviene al Centro ICBDSR di Roma, per massimizzare la compatibilità dei risultati. Lo studio, pubblicato nel 2011, ha riportato i dati di prevalenza di CL/P in una popolazione totale di approssimativamente 8 milioni di nati vivi, raccolti da 54 registri di 30 Stati tra il 2000 e il 2005 (IPDTC 2010). Dall'analisi dei dati dello studio, riassunti in Tabella 1, la prevalenza globale di CL/P è risultata corrispondente a 9,92 affetti alla su 10.000 nati vivi, con una prevalenza di CL pari a 3,28 su 10.000 e di CLP pari a 6,64 su 10.000 nati vivi. In particolare negli USA la prevalenza registrata dal NBDPN è risultata pari a 10,2 affetti ogni 10.000 nati vivi; similmente, nell' Europa occidentale si sono riportati valori pari a 12,1 su 10.000, mentre in Giappone il valore di prevalenza è risultato il doppio rispetto a quello degli USA (20,0 per 10.000nati vivi). Considerando il totale globale di casi, il 76,8% era non sindromico, il 15,9% era associato ad altre malformazioni ed il restante 7,3% era parte di sindromi conosciute, con valori simili tra USA, Europa Occidentale e Giappone.

Tabella 1: Prevalenza dei CL/P tra il 2000 e il 2005 (IPDTC 2010)

Regione Geografica	Num di Casi/10.000 nati	95% Intervallo di confidenza
USA	10,2	9,8 - 10,6
Europa Occidentale	12,1	11,1 - 13,2
Giappone	20,0	18,6 - 21, 6
Canada	11,5	10,2 - 12, 9
Australia	9,7	8,5 - 11,0

Studi condotti su differenti popolazioni suggeriscono inoltre l'idea che la prevalenza di CL/P vari in maniera significativa a seconda dell'area geografica e delle origini ancestrali della popolazione, con frequenze estremamente elevate tra le popolazioni Asiatiche e i Nativi d'America (1/500 nati vivi), frequenze intermedie di circa 1/1.000 nelle popolazioni Europee, e frequenze notevolmente più basse nelle popolazioni Africane (1/2.500 nati vivi)(Vanderas 1987; Murray et al. 1997; Mossey & Little 2002; van Aalst A et al. 2008; Rahimov et al. 2012). Studi di comparazione effettuati su gruppi etnici di UK e USA (Croen et al. 1998; Leck & Lancashire 1995), e studi su immigrati in USA dalla Cina e dal Giappone (Croen et al. 1998; Ching & Chung 1974), hanno dimostrato come i gruppi immigrati abbiano valori di prevalenza di CL/P più simili a quelli registrati nella corrispettiva area di origine piuttosto che a quelli dell'area di migrazione (Mossey et al. 2009). Negli studi in cui CL e CLP sono stati analizzati separatamente, si è osservato che il 90% dei CLP si presenta con *cleft* completo o subtotale, mentre le schisi tendono ad essere incomplete e meno gravi nei casi di CL isolati (Jensen et al. 1988); la NBDPN ha inoltre mostrato come l'associazione del CL con altre malformazioni sia molto più bassa rispetto all'associazione di queste ultime con CLP (Genisca et al. 2009; Rahimov et al. 2012), supportando l'ipotesi, ancora controversa, che CL e CLP possano avere eziologia distinta. Vi sono differenze di frequenza inerenti anche la lateralità: tra i casi di *cleft lip* infatti, il 75% è unilaterale e si è osservato un rapporto di 2:1 tra *cleft* sul lato sinistro e sul lato destro del labbro (Dixon et al. 2011; Leslie & Marazita 2013).

Significativamente diversa risulta l'epidemiologia delle schisi isolate del palato; la prevalenza alla nascita di CP, escludendo i disordini cromosomici, differisce considerabilmente tra le diverse regioni geografiche, con un *range* che varia da 1,2 casi su 10.000 nati vivi nelle aree Sub sahariane dell'Africa, a 11,3 casi per 10.000 nati vivi nelle regioni dell'Oceania. In Europa e nelle zone dell'Asia centrale, la media di prevalenza alla nascita dei CP è 6 su 10.000 nati vivi (Mossey & Modell 2012). Nel periodo tra 2004 e 2006, negli Stati Uniti è stata registrata pari a 6,5 casi su 10.000 nati vivi (Parker et al. 2010).

La proporzione di individui con anomalie addizionali sembra essere molto maggiore in casi di CP rispetto a quanto non si osserva in caso di CL/P: in uno studio Europeo di circa 4.000 individui con

CP, il 55% dei casi era isolato, mentre il 18% era in associazione con altre anomalie e il 27% era parte di sindromi note (Calzolari et al. 2004).

Inoltre, sono state registrate evidenti differenze di genere nell'epidemiologia di CL/P e CP: il *cleft* in generale è più comune nei maschi, ed in particolare il CL/P occorre più frequentemente nei maschi con un rapporto di 2:1, mentre il CP è tipicamente più frequente nelle femmine (rapporto maschi/femmine di 1:2); nel feto femminile infatti i processi palatini impiegano una settimana in più a fondere rispetto a quanto non avvenga nei feti maschili, lasciando più tempo di esposizione a eventuali fattori teratogeni che possono portare a fallimento della fusione (Marazita & Mooney 2004; Merritt 2005; van Aalst A et al. 2008; Shkoukani et al. 2014).

L'influenza dello stato socio-economico sulla prevalenza delle OFCs non è stata determinata in maniera conclusiva, sebbene gli studi epidemiologici condotti negli ultimi anni riportano frequenze più elevate in paesi sottosviluppati; possibili spiegazioni delle differenze di prevalenza a seconda dell'origine geografica e dello stato socio-economico possono includere diversi fattori ambientali come la malnutrizione, accessibilità alle cure mediche e fattori di rischio legati allo stile di vita come il fumo di sigaretta (Leslie & Marazita 2013); queste osservazioni suggeriscono inoltre che il contributo relativo dei singoli geni di suscettibilità alle OFCs possa variare tra le diverse popolazioni (Dixon et al. 2011). Gli studi epidemiologici risultano quindi di fondamentale importanza nella comprensione e nell'approfondimento dell'eziologia delle schisi orofacciali.

## 1.7. Etiologia

Le schisi orofacciali, come la maggior parte delle malformazioni congenite e delle malattie che affliggono sia l'infanzia che l'età adulta, sono descritte come patologie *complesse*. Questi disordini rappresentano condizioni dove non sempre vi è un singolo gene causativo e completamente penetrante responsabile dello sviluppo del fenotipo patologico. Al contrario, il fenotipo può derivare dalla combinazione di molteplici effetti di più geni con o senza l'interazione di fattori ambientali (non genetici) addizionali. I fenotipi complessi hanno causalità eterogenee, il che significa che all'interno di una popolazione estesa, le cause genetiche delle OFCs possono includere sia alleli causativi a bassa frequenza e alta penetranza che alleli di suscettibilità comuni, con bassa penetranza e interagenti con fattori ambientali (Watkins et al. 2014).

Nel descrivere l'eziologia delle OFCs risulta dunque utile mantenere la suddivisione tra schisi sindromiche, ad eziologia solitamente monofattoriale, e non-sindromiche, multifattoriali e complesse.

### 1.7.1. Etiologia delle schisi Sindromiche

Attualmente, sono state identificate e riportate all'interno del *database Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>) circa 275 sindromi con presenza di schisi orofacciali tra le caratteristiche primarie, causate da mutazioni a livello di un singolo locus genetico, anomalie cromosomiche o esposizione a teratogeni. Di queste, una grande proporzione (circa il 75%) ha una causa genetica stabilita; molte sono sindromi a trasmissione Mendeliana, legate a mutazioni di un singolo gene causale, riassunte in Tabella 2 (Dixon et al. 2011; Leslie & Marazita 2013). Approssimativamente, il 50% sono a trasmissione autosomica recessiva, il 40% autosomica dominante e il restante 10% a trasmissione *X-linked*; presentano tutte complicazioni alla semplice trasmissione Mendeliana, come penetranza incompleta, espressività variabile, *imprinting*, eterogeneità allelica (Shkoukani et al. 2014). Inoltre, diversi casi di trisomie dei cromosomi 13, 18 e 21 sono stati descritti come associati a CL/P, così come parziali delezioni e duplicazioni di altri cromosomi (Gabrielli et al. 2009; L A Brito et al. 2012); sembrano quindi essere numerose le regioni genomiche contenenti loci che, in eccesso o in insufficienza, possono portare a sviluppo di CL/P (Brito et al. 2012).

In particolare, la sindrome di van der Woude (VWS; OMIM #119300) e la sindrome Sindrome Popliteale del Pterygium (PPS; OMIM 119500), già descritte nel capitolo 1.3.6, sono entrambe causate da mutazioni all'interno del gene *IRF6* (Kondo et al. 2002); entrambe le patologie mostrano un *pattern* di trasmissione autosomico dominante; in particolare la VWS mostra alta

penetranza (89-99%). Centinaia di mutazioni missenso e non senso sono state identificate come legate a queste due patologie; l'80% delle mutazioni legate a VWS sono state localizzate all'interno degli esoni 3, 4, 7 e 9, codificanti per il dominio di *binding* proteico e il dominio di *binding* del DNA; mutazioni patogeniche all'interno di questi esoni causano perdita di funzionalità della proteina (fattore di trascrizione) codificata da questo gene (Kondo et al. 2002; Brito et al. 2012). Sebbene sia possibile stimare il rischio di ricorrenza per fratelli di individui affetti (attorno al 50%), non è possibile predire il grado di severità in un feto nel quale venga individuata una mutazione interna a *IRF6*; le mutazioni patogeniche interne al gene sembrano esercitare il loro effetto per la maggior parte durante lo sviluppo embriologico, confermando come *IRF6* giochi un ruolo fondamentale nello sviluppo craniofacciale; tuttavia, *IRF6* sembra esercitare un ruolo attivo anche successivamente alla nascita, poiché bambini affetti da VWS manifestano complicazioni successive al trattamento chirurgico per la riparazione della schisi con frequenza molto maggiore rispetto a bambini con nsOFCs (Brilo et al. 2012). Le mutazioni di *IRF6* legate a PPS sono solitamente localizzate all'interno dell'esone 4 del gene (Kondo et al. 2002); esiste dunque una forte correlazione genotipo-fenotipo associata a VWS e PPS, ma in quale modo le diverse mutazioni portino allo sviluppo di una patologia piuttosto che all'altra non è ancora noto (Brilo et al. 2012).

La maggior parte delle sindromi correlate a *cleft* sono rare, e interessano solo pochi casi su diverse migliaia di nati vivi. Tuttavia, buona parte delle attuali capacità di comprensione delle basi genetiche delle schisi orofacciali sono fortemente legate alle conoscenze delle forme sindromiche. L'identificazione dei geni causali di tali sindromi ha avuto, recentemente, notevole successo, ed è stata facilitata soprattutto dall'avanzare di tecnologie di sequenziamento, come l'*exome sequencing* (Dixon et al. 2011; Leslie & Marazita 2013).

**Tabella 2: Principali forme di *cleft-syndroms* monogeniche.**

<b>Cleft Type</b>	<b>Syndrome</b>	<b>Gene</b>
CL/P	Sviluppo di malformazioni, sordità e distonia autosomico dominante	<i>ACTB</i>
	Cancro gastrico familiare e CLP	<i>CDH1</i>
CL/P	Sindrome Cranio-frontonasale	<i>EFNB1</i>
	Sindrome di Roberts	<i>ESCO2</i>
	Sindrome di Kallmann	<i>FGFR1</i>
	Sindrome otopalatodigitale di tipo 1 e 2	<i>FLNA</i>
	Oloprosencefalia	<i>GLI2</i>
	Sindrome oro-facciale-digitale	<i>GLI3</i>
	Sindrome idroletale	<i>HYLS1</i>
	Sindrome popliteale del pterygium	<i>IRF6</i>
	Sindrome di Van der Woude	<i>IRF6</i>
	Sindrome di Opitz G/BBB	<i>MID1</i>
	Sindrome di Kabuki	<i>MLL2 KDM6A</i>
	Agenesia dentale con o senza schisi	<i>MSX1</i>
	Sindrome oro-facciale-digitale di tipo 1	<i>OFD1</i>
	Ritardo mentale <i>X-linked</i> e CL/P	<i>PHF8</i>
	Sindrome di Gorlin	<i>PTCH1</i>
	CLP - displasia ectodermica	<i>PVRL1</i>
	Sindrome di Bartsocas-Papas	<i>RIPK4</i>
	Oloprosencefalia	<i>SHH</i>
	Oloprosencefalia	<i>SIX3</i>
	Sindrome Brachio-oculo-facciale	<i>TFAP2A</i>
Oloprosencefalia	<i>TGIF</i>	
CL/P	Anchiloblefaron-displasia ectodermica-schisi	<i>TP63</i>
	Eterodattilia-displasia ectodermica-schisi	<i>TP63</i>
	Tetra-amelia con CLP	<i>WNT3</i>
CP	Sindrome oculo-facio-cardio-dentale	<i>BCOR</i>
	Sindrome di CHARGE	<i>CHD7</i>
	Sindrome multipla del pterygium	<i>CHRNA3</i>
	Sindrome di Stickler di tipo 2	<i>COL11A1</i>
	Sindrome di Stickler di tipo 3	<i>COL11A2</i>
	Sindrome di Stickler di tipo 1	<i>COL2A1</i>
	Desmosterolosi	<i>DHCR24</i>
	Sindrome di Smith-Lemli-Opitz	<i>DHCR7</i>
	Sindrome di Miller	<i>DHODH</i>
	Sindrome cranio-frontonasale	<i>EFNB1</i>
	Sindrome di Kallmann	<i>FGFR1</i>
	Sindrome di Apert	<i>FGFR2</i>
	Sindrome di Cruzon	<i>FGFR2</i>
	Sindrome di Larsen: atelostogenesis	<i>FLNB</i>
	Linfedema-distichiasi ereditario	<i>FOXC2</i>
	Sindrome di Bamforth-Lazarus	<i>FOXE1</i>
	Sindrome oro-facciale-digitale	<i>GLI3</i>
	Sindrome di Anderson	<i>KCNJ2</i>
	Sindrome di Kabuki	<i>MLL2</i>
	Sindrome di Cornelia de Lage	<i>NIPBL</i>
	Ritardo mentale <i>X-linked</i>	<i>PQBP1</i>
	Cleft Palate Isolato	<i>SATB2</i>
	Displasia diastrofica	<i>SLC26A2</i>
	Displasia campomelica	<i>SOX9</i>
	Pierre Robin Sequence	<i>SOX9</i>
	Sindrome di George	<i>TBX1</i>
	Schisi del palato <i>X-linked</i> e anchiloglossia	<i>TBX22</i>
	Sindrome di Treacher Collins	<i>TCOF1</i>
	Sindrome di Loeys-Dietz	<i>TGFBR1, TGFBR2</i>
	Sindrome di Saethre-Chotzen	<i>TWIST1</i>

Referenze alla letteratura inerenti le singole sindromi sono riportate nelle *Reviews* redatte da Dixon et al. 2011; Leslie & Marazita 2013.

### **1.7.2. Eziologia delle schisi Non-sindromiche**

Come affermato in precedenza, la maggior parte dei casi di schisi si presentano in assenza di ulteriori malformazioni e vengono definite forme non-sindromiche; costituiscono circa il 70% dei casi di CL/P e il 50% dei casi di CP (Leslie & Marazita 2013).

Studi effettuati sulla ricorrenza familiare, osservata nel 20-30% dei casi e con un rischio aumentato di 32 volte nei familiari di primo grado di un individuo affetto (Sivertsen et al. 2008), e il rapporto di concordanza dei gemelli, pari a 40-60% per i monozigotici e 3-5% per i dizigotici (Little & Bryan 1986), hanno fornito l'evidenza inequivocabile dell'importanza di una forte, ma non totale, componente genica nell'eziologia della schisi non-sindromiche (Leslie & Marazita 2013). D'altra parte, numerosi dati epidemiologici evidenziano il ruolo di diversi fattori di rischio ambientale nello sviluppo delle schisi (Dixon et al. 2011). L'eziologia delle schisi orofacciali non-sindromiche è dunque considerata sulla base di un modello *multifattoriale*, in cui fattori di rischio genetico di basso impatto individuale possono interagire con variabili ambientali. Questa combinazione di fattori rende estremamente difficoltosa l'analisi delle componenti genetiche delle forme non-sindromiche di OFCs, la cui eziologia non è ancora completamente delineata (Marazita & Mooney 2004; Merritt 2005).

#### **1.7.2.1. Fattori di rischio ambientale**

Numerosi sono i dati epidemiologici e sperimentali che suggeriscono come diversi fattori di rischio ambientale giochino una funzione fondamentale nello sviluppo delle OFCs: in particolare, i fattori più indagati sono l'esposizione al fumo di sigaretta, il consumo di alcool, carenze nutrizionali, assunzione di medicinali, esposizione a teratogeni e infezioni virali durante le fasi precoci della gravidanza.

##### Fumo in gravidanza:

L'esposizione al fumo di sigaretta da parte della madre in prima gravidanza è probabilmente il fattore ambientale più studiato nell'ambito delle OFCs, ed è stato dimostrato essere collegato in maniera considerevole con un aumento rischio sia di CL/P che di CP: in uno studio di meta-analisi di associazione tra fumo materno e rischio di OFCs non-sindromiche (Little et al. 2004) condotto sulla base dei dati raccolti in 24 precedenti studi di tipo caso-controllo, il rischio medio di sviluppare una schisi in popolazioni esposte è stato registrato con un aumento di circa il 20%, e in maniera lievemente maggiore per i CL/P rispetto ai CP. Tale associazione è probabilmente sottostimata, poiché nella maggior parte degli studi non è stato possibile considerare l'effetto del fumo passivo (Mossey et al. 2009).



L'effetto teratogeno del fumo è probabilmente dovuto all'influenza negativa di quest'ultimo sullo sviluppo embrionale: la nicotina esercita un effetto vasocostrittore sui vasi sanguigni uterini, riducendo il flusso sanguigno e quindi la quantità di nutrienti provenienti dal sangue materno e diretti agli spazi intervillosi della placenta. Il monossido di carbonio contenuto nelle sigarette determina a sua volta alti livelli di carbossiemoglobina sia nel sangue della madre che del feto, alterandone la capacità di trasportare ossigeno e determinando ipossia a livello fetale. L'ipossia e la carenza nutrizionale causate da monossido di carbonio e nicotina sono quindi responsabili di un ritardo nella crescita intrauterina, che può indurre schisi orofacciali o altre malformazioni in presenza di madri e/o figli geneticamente predisposti (Shaw et al. 1996; Moore et al. 2011).

#### Consumo di alcol in gravidanza:

Già noto come causa della Sindrome Alcolico Fetale, il ruolo del consumo di alcol in gravidanza nell'eziologia delle OFCs è ancora controverso, con associazioni positive in alcuni studi (Romitti et al. 2007; Chevrier et al. 2005; Bille et al. 2007) e non in altri (Meyer et al. 2003; Romitti et al. 2007). In studi su modelli murini, l'assunzione di alcol causa CL/P se somministrato intorno all'8° giorno di gestazione, tempo equivalente alle prime quattro settimane dopo il concepimento nell'uomo (Lipinski et al. 2010). Il contesto sociale in cui si inserisce il consumo di alcol in gravidanza è piuttosto complesso e, nella maggioranza dei casi, può sommarsi o confondere gli effetti derivanti da errorea alimentazione, fumo, stress e uso di droghe (Carmichael et al. 2007), rendendo difficile lo studio di associazione del solo alcol al rischio di sviluppare la patologia (Mossey et al. 2009).

#### Nutrizione materna:

Numerosi studi osservazionali suggeriscono un ruolo della nutrizione materna nello sviluppo delle schisi orofacciali; tale ipotesi è supportata dall'evidenza che i paesi sottosviluppati, dove si registrano alti tassi di malnutrizione e scarsa accessibilità alla supplementazione della dieta, spesso coincidono con popolazioni ad alta frequenza di OFCs (Mossey et al. 2009). La supplementazione multivitaminica della dieta materna durante il periodo precoce della gravidanza è stata correlata a riduzione del rischio di schisi orofacciali nella maggior parte degli studi; uno studio di meta-analisi (Johnson & Little 2008) ha associato il consumo di multivitaminici al 25% di riduzione della prevalenza alla nascita di *clefts*; tuttavia, accertare da questi studi quali tra i nutrienti contenuti nel multivitaminico esercitino effettivamente il ruolo protettivo, risulta difficoltoso (Mossey et al. 2009).

Tra i diversi fattori nutrizionali, uno dei più studiati è l'acido folico (AF), forma ossidata a sintetica di folato: con il termine folati si indica in maniera piuttosto generale un gruppo di vitamine B essenziali, normalmente assunte con la dieta, che giocano un ruolo fondamentale nei processi di

sintesi degli oligonucleotidi, nei processi di riparazione e di metilazione del DNA, oltre che nel metabolismo di amminoacidi come metionina e acido glutammico (National Academy Press 1998). Si tratta quindi di elementi vitaminici estremamente importanti nei processi di proliferazione e crescita cellulare, che sono alla base della corretta embriogenesi. Un adeguato apporto di folati durante il periodo periconcenzionale (che comprende il tempo subito antecedente la gravidanza e le prime settimane di gestazione) tramite supplementazione della dieta con acido folico, è fondamentale nella prevenzione di numerose malformazioni congenite, tra cui in particolare i difetti del tubo neurale (*Neural Tube Defects*, NTDs) (Shaw et al. 1995); esistono forti evidenze provenienti da *trials* clinici che l'acido folico abbia un effetto largamente preventivo sia sulla ricorrenza che sull'occorrenza dei NTDs, con una riduzione di prevalenza alla nascita di circa il 70% (*Vitamin Study Research Group* 1991). Numerosi studi osservazionali e caso-controllo sono stati effettuati per valutare l'effetto della supplementazione con AF nei confronti delle OFCs, con una generale dimostrazione indicativa di un potenziale ruolo preventivo dell'acido folico nei confronti di sviluppo di schisi; i dati collezionati rimangono però largamente inconcludenti, e il ruolo della supplementazione della dieta materna con acido folico nella prevenzione delle schisi orofacciali rimane tutt'ora incerto. La maggior parte degli studi analizza infatti popolazioni di dimensioni ridotte, e presenta elementi di confondimento determinati dalle differenti dosi di acido folico somministrate, e dall'uso di acido folico con integratori o di multivitaminici contenenti acido folico o di entrambi (Wehby & Murray 2010). Le più recenti meta-analisi che hanno cercato di stimare l'effetto medio dell'AF tra i diversi studi osservazionali, hanno effettivamente individuato una riduzione del rischio relativo, ma con risultati diversi tra CL/P e CP: Badovinac e colleghi (Badovinac et al. 2007) hanno stimato una riduzione del 28% nel rischio di CL/P e del 20% per CP utilizzando AF con integratori e/o multivitaminici, mentre Johnson e Little (Johnson & Little 2008) hanno calcolato una riduzione attorno al 18% di rischio di CL/P nell'uso di AF con integratori, ma nessuna riduzione di rischio di CP.

In alcuni paesi, in cui la fortificazione di grano e farine con AF è stata introdotta come obbligatoria, si è registrato un forte calo della frequenza delle NTDs (di circa il 31%), confermando il ruolo fortemente preventivo dell'assunzione di AF nei confronti di questi tipi di malformazioni; diversamente, non vi sono prove di evidenti cambiamenti nella prevalenza alla nascita delle OFCs. In Nord America, per esempio, , dove la *Federal Drug Administration* ha introdotto come obbligatoria la fortificazione del grano con AF dal 1998 (Dietrich et al. 2005), sono state riportate riduzioni (tra il 3-15%) nella prevalenza di CL/P, statisticamente non significative (Simmons et al. 2004; Canfield et al. 2005), mentre in Canada (Ray et al. 2003) e in Chile (López-Camelo et al. 2005) non è stato osservato alcun decremento nella prevalenza. Probabilmente, una valutazione più integrale dei potenziali cambiamenti della prevalenza, richiede periodi di studio più lunghi rispetto a quanto sia stato possibile effettuare fino al giorno d'oggi (Wehby & Murray 2010).

I risultati ottenuti dai diversi studi caso-controllo su supplementazione multivitaminica contenente acido folico (Hill et al. 1988; Shaw et al. 1995; Czeizel et al. 1999; Källén 2003; van Rooij et al. 2004; Badovinac et al. 2007), assunzione di folati con la dieta (Shaw et al. 1995; van Rooij et al. 2004; Little et al. 2008 part-I), e livelli plasmatici e eritrocitari di folati (Wong et al. 1999; van Rooij et al. 2003; Munger et al. 2004; Little et al. 2008, part II), sono a loro volta inconsistenti, e necessitano ulteriori approfondimenti (Mossey et al. 2009; Watkins et al. 2014).

Solo pochi studi sono infine stati realizzati sulla prevenzione della ricorrenza di OFCs tramite supplementazione con AF della dieta di madri con un figlio affetto da schisi; il decremento della ricorrenza riportato da questi studi, indipendentemente dalla rilevanza statistica, fluttua dal 24 al 100% (Wehby & Murray 2010); la meta-analisi di Johnson e Little (2008) stima, a partire da questi studi, una riduzione statisticamente significativa del 67% nel rischio di ricorrenza di CL/P, suggerendo che supplementazioni con alte dosi di AF ( $\geq 5\text{mg}/\text{die}$ ) abbiano un ruolo preventivo nei confronti della ricorrenza.

Vi sono diverse controversie inerenti i dosaggi ottimali di AF, e i potenziali effetti avversi che alte dosi possano avere sull'organismo se assunte a lungo termine (Troen et al. 2006; Pickell et al. 2011; Choi & Mason 2000). Numerose rimangono quindi le domande senza risposta: se l'acido folico sia realmente preventivo nei confronti delle OFCs, se lo sia nel prevenire l'occorrenza e/o la ricorrenza della patologia, se sia preventivo nei confronti di CL/P o CP o entrambi, e se per rendere effettiva la prevenzione occorranza alte o basse dosi di AF.

Oltre all'acido folico, altri elementi nutritivi sono stati correlati all'insorgenza delle schisi orofacciali, tra cui omocisteina, vitamina B6, zinco.

Il calo del livello dei folati è correlato all'aumento dei livelli plasmatici di omocisteina; livelli medi di omocisteina plasmatica sono stati riscontrati più alti in madri di neonati affetti da OFCs rispetto ai livelli di madri di bambini non affetti (Wong et al. 1999).

La vitamina B6, cofattore nel metabolismo dell'omocisteina, riduce l'occorrenza di OFCs negli animali (Miller 1972) e biomarcatori indicativi di deficienza di vitamina B6 sono stati associati ad aumento del rischio di *cleft* in Olanda (Wong et al. 1999) e nelle Filippine (Munger et al. 2004). La deficienza di vitamina B6 è inoltre tipica di alcune popolazioni Asiatiche, dove si ha un elevato consumo di riso brillato (alimento scarso di nutrienti e trattato con derivati del petrolio, che va ad impoverire l'organismo di vitamine del gruppo B): tali popolazioni sono le medesime dove si osserva alta frequenza di CL, CLP e CP (Munger et al. 2004).

Lo zinco è un ulteriore elemento estremamente importante nel corretto sviluppo fetale, e un *deficit* di questo nutriente è causa di *cleft* del palato e altre malformazioni negli animali (Warkany & Petering 1973). In Olanda si sono osservati livelli minori di zinco negli eritrociti di madri di individui affetti da OFCs (Krapels et al. 2004); nelle Filippine, dove la deficienza di zinco è

estremamente diffusa, alti livelli plasmatici di zinco materno sono correlati a un calo del rischio di OFCs, con una relazione di tipo dose-risposta (Tamura et al., 2005).

Altri nutrienti che sembrano poter avere un ruolo nello sviluppo delle schisi orofacciali sono la riboflavina (Warkany & Nelson 1940) e la Vitamina A (retinolo) (Rothman et al. 1995; Mitchell et al. 2003), sebbene la loro rilevanza all'interno della dieta materna rimanga incerta (Mossey et al. 2009).

#### Assunzione di Farmaci in gravidanza:

I farmaci antiepilettici in genere (in particolare acido valproico, diazepam, fenitoina e fenobarbital) sono associati ad incremento del rischio di malformazioni congenite, tra cui NTDs, malformazioni urogenitali e OFCs (Hernández-Díaz et al. 2000), e ad una riduzione dei livelli sierici di folati (Hiilesmaa et al. 1983). Il rischio di nascita di un figlio affetto da OFCs in madri trattate con farmaci antiepilettici durante la gravidanza è pari a 1-1,5%, circa 10 volte il rischio medio della popolazione (Elmazar & Nau 1992; Dravet et al. 1992; Wyszynski & Beaty 1996). Non è tuttavia chiaro l'effettivo meccanismo dell'interazione con i folati nell'aumentato rischio teratogeno in cui giocano probabilmente diversi e complessi fattori, tra cui la patologia epilettica in sé (Elmazar & Nau 1992; Matalon et al. 2002; Hernández-Díaz et al. 2000; Holmes et al. 2004).

Altri farmaci antagonisti dell'acido folico sono gli antiblastici metotrexato e aminopterin, riconosciuti come teratogeni e altamente sconsigliati in gravidanza; in particolare questi farmaci agiscono come inibitori dell'enzima Diidrofolato Reduttasi (DHFR), il cui ruolo è convertire l'acido folico in 5-metil-tetraidrofolato (5-metil-THF), la principale forma di folato metabolicamente attiva nell'organismo (Lambie & Johnson 1985). L'assunzione di questi farmaci durante il secondo e terzo mese dall'ultima mestruazione è stata associata ad aumentato rischio di schisi orofacciali, oltre ad altri difetti come NTDs, difetti cardiovascolari e malformazioni urogenitali. Il rischio si riduce notevolmente se, in caso di necessità di assunzione di tali farmaci, la quantità di acido folico somministrato tramite preparati multivitaminici viene aumentata (Hernández-Díaz et al. 2000).

Anche l'utilizzo in gravidanza di acido retinoico (metabolita che interviene nelle funzioni della vitamina A) e di alcuni farmaci corticosteroidi ha evidenziato un'associazione positiva con il rischio di schisi (Park-Wyllie et al. 2000), in particolare se assunti durante il primo trimestre di gravidanza (Hernández-Díaz et al. 2000; Lammer et al. 1985; Carmichael & Shaw 1999).

#### Altri fattori ambientali:

Alcune malattie materne e condizioni ostetriche sono state collegate allo sviluppo di schisi; ad esempio il diabete mellito nel periodo pre-concezionale (ma non gestazionale) conferisce un incremento di rischio per alcune gravi malformazioni congenite, tra cui anche CL/P e CP (Åberg et al. 2001; Correa et al. 2008). L'obesità materna (indice di massa corporea  $\geq 30$ ) in alcuni studi è

stata associata a rischio sia per CL/P che per CP, anche se la magnitudo del rischio è relativamente piccola, con un Odds Ratio che si aggira attorno a 1,3 (Cedergren & Källén 2005; Stott-Miller et al. 2010). La patogenesi associata a diabete e obesità è probabilmente simile poiché le pazienti obese tendono a sviluppare un'intolleranza al glucosio e un incremento della resistenza all'insulina (Watkins et al. 2014).

Un ampio numero di altri fattori ambientali è stato indagato in relazione allo sviluppo di OFCs, inclusi i contaminanti ambientali (come pesticidi, inquinamento, estrogeni presenti nelle acque) e l'esposizione lavorativa a sostanze potenzialmente tossiche come ad esempio solventi organici. Tuttavia, ad oggi, non è stata identificata nessuna evidenza che indichi una relazione causale tra l'esposizione a tali fattori e sviluppo di schisi orofacciali (Mossey et al. 2009; Watkins et al. 2014).

#### **1.7.2.1.1. Prevenzione Primaria delle schisi orofacciali**

L'identificazione di fattori di rischio ambientali facilmente modificabili rappresenta il primo *step* per attuare correttamente la prevenzione primaria, controllando lo stile di vita materno, migliorandone la dieta, somministrando multivitaminici e minerali, evitando l'uso di farmaci teratogeni e i fattori ambientali lavorativi che possono risultare dannosi per l'esito della gravidanza. La percentuale di schisi collegate al fumo materno, con alta prevalenza di donne fumatrici in età fertile, è stata stimata intorno al 22% (Little et al. 2004). Tuttavia, il legame con il fumo non è stato menzionato nel *report* internazionale su fumo e salute (Kaufman & Nichter 2001; *Office on Smoking and Health* 2001). In molti paesi del mondo l'uso del tabacco è aumentato rapidamente nelle donne in età fertile, bersaglio di molte campagne di *marketing* delle aziende produttrici di sigarette (Kaufman & Nichter 2002). La supplementazione di multivitaminici e minerali è sensibilmente associata a diminuzione di rischio del *cleft* ed è raccomandata non solo durante il periodo precoce della gravidanza, ma soprattutto al momento della pianificazione della stessa, a partire da 2-3 mesi antecedenti il concepimento, in modo che il livello plasmatico di folati sia ottimale già al momento dell'impianto dell'embrione. Tuttavia, sono stati riportati effetti collaterali nella supplementazione a lungo termine (Forman & Altman 2004), ed è dunque richiesto un approfondimento su quali specifici nutrienti e minerali, e a quali dosi, sia importante assumere per contrastare il rischio di malformazioni congenite (Mossey et al. 2009).

### 1.7.2.2. Fattori di rischio genetico

Un'ampia varietà di approcci è stata utilizzata per identificare i geni e i loci coinvolti nel *cleft* non sindromico: modelli animali, riarrangiamenti cromosomici, studi di *linkage*, studi di associazioni basati su approccio gene candidato, sequenziamento di geni candidati e studi di associazione *Genome-Wide* (*Genome-Wide Association Study*, GWAS). La maggior parte degli studi sulle schisi non-sindromiche è stata condotta su CL/P piuttosto che su CP; questo per via del maggior numero di casi, del più semplice accertamento clinico e del minore confondimento con casi sindromici che si correlano ai casi di CL/P piuttosto che non ai casi di CP (Dixon et al. 2011).

#### Studi di *linkage*:

Stimano la co-segregazione di un allele *marker* con un fenotipo di malattia in famiglie estese comprendenti più individui affetti o coppie di familiari di primo grado affetti. Poiché tanto più i *markers* si trovano vicini alla mutazione causa di patologia tanto più tendono a segregare con il fenotipo patologico, la locazione cromosomica del gene responsabile di patologia può essere ricercata all'interno di un limitato intervallo critico ricercando gli eventi di ricombinazione o stimando la presenza di incrementi di alleli condivisi da familiari affetti. Tale approccio ha avuto notevole successo nel mappamento di geni responsabili di rari disordini monogenici, tra cui anche le sindromi con schisi orofacciali. Al contrario, nello studio dei disordini complessi quali sono le schisi non-sindromiche, le analisi di *linkage* hanno incontrato numerose difficoltà a causa dell'alto grado di eterogeneità genetica e fenotipica comunemente osservato in questo tipo di disordine (Rahimov et al. 2012).

Più recentemente, sono state introdotte tecniche di indagine che si espandono all'interno dell'intero genoma umano, dette *whole genome-wide linkage scan*, e basate sull'uso di microsatelliti polimorfici come *markers*; ad oggi sono stati effettuati 13 *genome-wide linkage scan* che hanno identificato numerosi possibili loci di suscettibilità per nsCL/P, nessuno dei quali ha però mostrato un LOD (*Log of the Odds*) score significativo (Marazita et al. 2004; Leslie & Marazita 2013). E' dunque plausibile che nessuno dei geni osservati sia effettivamente causale per questa condizione patologica, o che i geni osservati abbiano effetti lievi e popolazione-specifici. Alternativamente, è possibile che questi studi abbiano un potere di risoluzione insufficiente per poter individuare varianti di più modesto effetto (ad esempio varianti che incrementino il rischio del 10-15%) (Rahimov et al. 2012). Una meta-analisi effettuata sui risultati di questi 13 *genome-wide linkage scan* ha rivelato LOD score significativi ed eterogenei per numerosi loci sui cromosomi 1p, 6p, 6q, 14q, 15q e 9q; un successivo *fine-mapping* della regione 9q21 ha identificato un gene candidato, **FOXE1**, come probabile causativo in quel locus (Marazita et al. 2004); ulteriori studi di *fine-mapping* sono tutt'ora in corso (Rahimov et al. 2012).

Un'ulteriore limitazione degli studi di *linkage* sulle schisi non-sindromiche è rappresentata dall'ampio spettro fenotipico della patologia, che comprende anche microforme e schisi minime. La maggior parte degli studi eseguiti ad oggi ha considerato come "affetti" soltanto quegli individui esibenti chiare caratteristiche di schisi; vi sono tuttavia crescenti consensi nell'ipotesi che anche fenotipi subclinici possano essere parte di un fenotipo "esteso" di *cleft*. Neiswanger e colleghi (Neiswanger et al. 2007) hanno studiato una famiglia estesa con alcuni membri con difetto occulto dell'*orbicularis oris*, inizialmente considerati non affetti, osservando un chiaro *pattern* di trasmissione Mendeliana solo nel momento in cui tali pazienti venivano inclusi nel *pedegree* come affetti. Tali considerazioni hanno non solo un notevole impatto nella valutazione del rischio clinico, ma sottolineano anche la necessità di un più accurato accertamento fenotipico negli studi futuri. Oltre ai difetti dell'*orbicularis oris*, anche anomalie dentali, anomalie nella struttura cerebrale o nella morfologia creniofacciale, e microforme di CL sembrano rappresentare fenotipi estesi di *cleft* estremamente promettenti per affinare le analisi di *linkage*, aiutando a spiegare i fenomeni di penetranza incompleta osservati in numerose famiglie dove una variante apparentemente eziologica è trasmessa da parte di un genitore senza fenotipo clinico di CL/P (Rahimov et al. 2012).

#### Studi di associazione gene candidato:

Differentemente dagli studi di *linkage*, gli studi di associazione possono essere condotti su ampi numeri di casi sporadici che occorrono come isolati, senza presenza di familiari affetti, con lo scopo di individuare alleli associati alla patologia: in breve, si tratta di ricercare un'alterazione significativa della frequenza di un allele o aplotipo in individui affetti che differisca dalla frequenza attesa nel caso non esista alcuna associazione tra il *marker* e il fenotipo di interesse (Rahimov et al. 2012). I *markers* associati, solitamente *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) o *copy number variations* (NCVs), possono essere direttamente causativi della patologia, oppure possono trovarsi in forte *linkage disequilibrium* (LD) con la vera variante eziologica. Gli studi di associazione sulle schisi orofacciali non-sindromiche vengono condotti utilizzando casistiche composte da individui affetti abbinati a individui controllo non imparentati (studi di associazione caso-controllo), oppure da una collezione di famiglie nucleari costituite da triadi genitori-figlio affetto (studi di associazione *family-based*).

La selezione dei geni candidati per lo studio tipicamente richiede una conoscenza *a priori* dei processi biologici coinvolti, e può utilizzare una varietà di risorse, tra cui:

- 1) Selezione di geni che si trovano all'interno di loci precedentemente identificati attraverso analisi di *linkage*, come nel caso già citato di *FOXE1*.

- 2) Selezione di geni coinvolti nell'embriologia del labbro e del palato (descritti nel capitolo 1.2.1.), individuati tramite studi di espressione genica e analisi di sviluppo condotte su modelli animali; lo studio pionieristico di Ardingher e colleghi (Ardinger et al. 1989) individuò, tramite questo tipo di selezione, il gene *TGFA* (*transforming growth factor, alpha*) come associato a rischio di CL/P. Un altro caso dove i modelli animali hanno mostrato la loro importanza è nello studio di *MSX1* (*homeobox msh-like 1*): topi *MSX1* nulli esibiscono *cleft palate* (Satokata & Maas 1994). Attualmente, importanti e nuove risorse per selezionare i geni candidati sono il *Craniofacial and Oral Gene Expression Network Database* (COGENE, <https://www.facebase.org/>), che cataloga i *pattern* di espressione genica a partire dagli stadi precoci dell'embriogenesi umana, e il *EMAGE database*, che cataloga informazioni sull'espressione genica durante lo sviluppo dell'embrione murino (<http://www.emouseatlas.org/emage/home.php>).
- 3) Selezione di geni coinvolti nel metabolismo di fattori putativi di rischio ambientale; ad esempio *MTHFR* (*methylenetetrahydrofolate reductase*), coinvolto nel metabolismo dei folati (Tolarova et al. 1998) e *RAR $\alpha$*  (*retinoid acid receptor, alpha*) che codifica per recettore nucleare dell'acido retinoico (Chenevix-Trench et al. 1992) sono stati studiati per valutarne l'associazione a CL/P.
- 4) Selezione di geni sulla base di anomalie cromosomiche in alcuni pazienti; alcuni esempi sono costituiti dall'identificazione dei geni *SUMO1* (*small ubiquitin-like modifier1*) (Alkuraya et al. 2006) e *FGFR2* (*fibroblast growth factor receptor 2*) (Osoegawa et al. 2008).
- 5) Selezione di geni sulla base del loro ruolo in sindromi che includono il *cleft* come parte del fenotipo. Il razionale su cui si basa quest'approccio è che mentre mutazioni rare e deleterie all'interno di un gene causano una sindrome mendeliana, le varianti comuni e meno deleterie dello stesso gene possono contribuire nello sviluppo di un meno severo *cleft* isolato (Stanier & Moore 2004). La sindrome di Van der Woude rappresenta un eccellente modello di questo tipo: mentre numerose mutazioni di *IRF6* sono state identificate come causa di VWS e PPS, variabili nell'intorno del gene sono state associate a CL/P non sindromico (Kondo et al. 2002; Zuccherò et al. 2004; Rahimov et al. 2008).

Tra tutti i loci identificati tramite approccio gene candidato e analisi di *linkage*, il gene *IRF6* è l'unico che è stato consistentemente associato a nsCL/P, come mostrato prima da Zuccherò e colleghi (2004) e successivamente da Rahimov e colleghi (2008); nello studio di Rahimov viene identificata una variante nucleotidica comune (nominata rs642961) all'interno di una sequenza regolatoria di *IRF6* (*enhancer* circa 10 kb a monte del gene), che viene over trasmessa nel nsCL/P (particolarmente nei ns CL) e il cui allele di rischio distrugge un sito di legame altamente

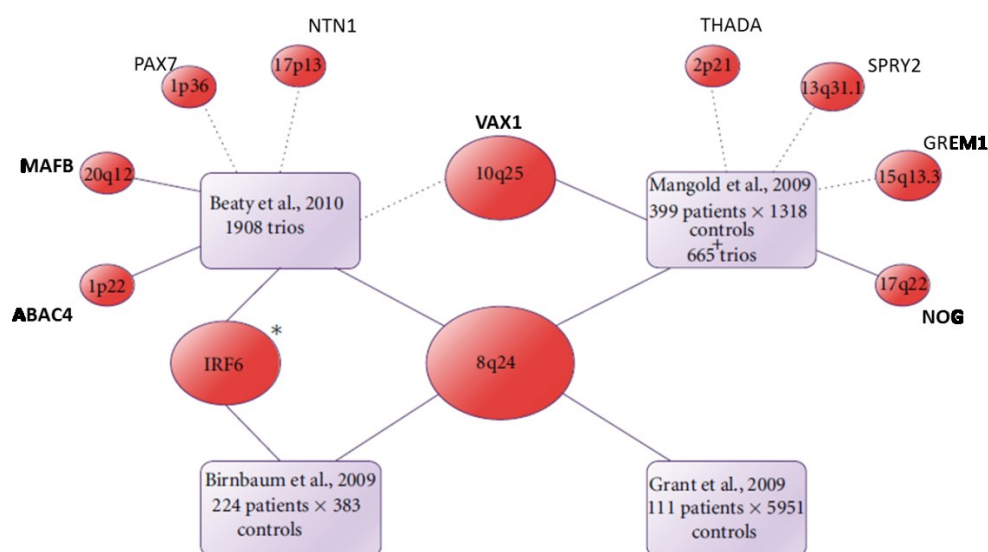


conservato per il fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$  (*Activating enhancer-binding Protein 2-alpha*, noto per essere coinvolto nella sindrome CLP autosomica dominante brachio-oculo-facciale), andando potenzialmente a disregolare i livelli di trascrizione di *IRF6* e conseguentemente, alterando i successivi *pathways* molecolari. La variante rs642961 è stata ripetutamente associata in altri studi condotti in Europa (Suzuki et al. 2000), America Latina (Rojas-Martinez et al. 2010; Luciano A Brito et al. 2012) e Asia (Pan et al. 2010; Zuccherò et al. 2004). Tuttavia il ruolo effettivo di rs642961 nello sviluppo embriologico e come predisponga a CL/P non è ancora stato chiarito.

#### Genome-wide association study (GWAS):

Con l'avvento delle tecnologie di genotipizzazione ad alta produttività (*high-throughput*), che permettono un'indagine più profonda a livello dell'intero genoma senza necessità di ipotizzare a priori geni candidati, lo scenario di indagine è profondamente cambiato, e notevoli contributi sono stati forniti alla comprensione dell'eziologia delle schisi non-sindromiche. Fino ad oggi sono stati effettuati quattro grandi studi GWA su CL/P non sindromici. Birnbaum e colleghi (Birnbaum et al. 2009) hanno effettuato il primo studio GWA caso-controllo su una popolazione tedesca, confermando l'impatto del locus 1q32 (contente il gene *IRF6*) e identificando una nuova associazione estremamente forte con il locus 8q24, corrispondente ad una zona di deserto genico; tale analisi è stata immediatamente replicata e confermata all'interno di uno studio analogo condotto negli Stati Uniti su una popolazione americana indipendente (Grant et al. 2009). In un terzo studio caso-controllo su popolazione europea, Mangold e colleghi (Mangold et al. 2010) hanno identificato ulteriori segnali significativi vicino ai geni *VAX1* (*ventral anterior homeobox1*) sul cromosoma 10q25 e *NOG* (*noggin*) sul cromosoma 17q22. Mangold e colleghi identificano inoltre una possibile interazione gene-gene tra *IRF6* e il gene *GREM1* (*gremlin1*), localizzato nella regione 15q13.3. Il quarto studio GWA, condotto dal GENEVA *Cleft Consortium* (Beaty et al. 2010), ha introdotto l'utilizzo di una casistica composta da triadi genitori-figlio affetto, includendo nello studio una varietà di famiglie provenienti da Europa e Asia; lo studio combinato delle due popolazioni ha confermato la precedente associazione identificata per 8q24 e 1q32 (*IRF6*), identificando inoltre 1p22 (contente *ABAC4*, *ATP-binding cassette, sub-family A member 4*) e 20q12 (*MAFB*, *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*) come nuovi loci di suscettibilità. Stratificando le due diverse popolazioni, si è osservato che i *markers* vicini a 1q32 (*IRF6*), 1p22 (*ABAC4*) e 20q12 (*MAFB*) raggiungevano significatività nella popolazione asiatica, mentre solo il segnale di 8q24 era formalmente significativo all'interno della popolazione europea. Studi successivi hanno mostrato come l'assenza di segnale GWAS all'interno della popolazione asiatica sia dovuto a un minore potere statistico correlato alla minor eterogeneità allelica di 8q24 nella popolazione asiatica rispetto a quella Europea. Per identificare ulteriori loci

di suscettibilità, Ludwig e colleghi (Ludwig et al. 2012) hanno successivamente effettuato uno studio di meta-analisi, combinando gli studi del GENEVA *Cleft Consortium* e di Mangold e colleghi. La combinazione dei dati ottenuti dallo studio Europeo caso-controllo e dagli studi su triadi Europee e Americane, e la successiva integrazione delle triadi Asiatiche, ha confermato l'associazione dei sei loci identificati negli studi precedenti e ha portato all'identificazione di ulteriori sei loci con rilevanza GWAS significativa: 1p36 (*PAX7*, *paired box 7*), 2p21 (*THADA*, *thyroid adenoma associated*), 3p11.1 (*EPHA3 ephrine receptor A3*), 8q21.3 (regione intergenica), 13q31.1 (*SPRY2*, *sprouty homolog 2*) e 17p13 (*NTN1*, *netrin 1*). L'analisi stratificata in base ai diversi fenotipi CL e CLP, ha inoltre evidenziato come 13q31.1 (*SPRY2*) associ esclusivamente con casi di CLP (e non di CL).



**Figura 24: Diagramma descrittivo delle principali associazioni con CL/P non sindromico identificate negli studi GWA** di Birnbaum et al. 2009; Grant et al. 2009; Mangold et al. 2009-2010; Beaty et al. 2010 che comprendono sia studi caso-controllo che studi basati su triadi. Le linee tratteggiate rappresentano associazioni *borderline* (che sono state confermate solo successivamente dalla meta-analisi di Ludwig et al. 2012, insieme a 3p11 e 8q21), mentre le linee solide rappresentano le associazioni che raggiungono il valore soglia GWAS ( $P < 10E-7$ ). (\*) Mangold et al. 2009-2010 identifica un'interazione gene-gene tra *IRF6* e *GREM1* (Brito et al. 2013).

Un ulteriore studio di replicazione su una casistica di triadi indipendenti europee e asiatiche condotto da Beaty e colleghi (Beaty et al. 2013), ha confermato ancora una volta l'associazione di *IRF6*, 8q24, *ABCA4* e *MAFB* e di *PAX7*, *NTN1*, *THADA*. L'associazione trovata da Ludwig e colleghi per *SPRY2* non è invece stata confermata. In questo studio sono inoltre stati identificati 4 addizionali possibili loci di associazione, contenuti i geni *COL8A1/FILIP1L* (*collagen alpha-VIII chain precursor*) sul cromosoma 3p12.2, *GADD45G* (*Gadd-Related Protein*) sul cromosoma 9q22.1, e *RBFOX3* (*RNA Binding Protein, Fox-1 Homolog*) sul cromosoma 17q 25.3.

A differenza dell'ampio numero di GWAS effettuati su nsCL/P, pochi sono gli studi genetici che sono stati effettuati su CP non sindromici, probabilmente a causa della minor prevalenza e maggiore difficoltà di accertamento. Alcuni SNPs identificati all'interno dei loci correlati a CL/P (1q32, 8q24, 10q25 e 17q22) sono stati testati in triadi CP, ma nessuno di questi è risultato statisticamente significativo (Mangold et al. 2010). Analogamente, un ulteriore studio GWA condotto da Beaty e colleghi (Beaty et al. 2011) su circa 500 triadi CP, non ha ottenuto risultati significativi testando l'associazione di *markers* genetici con il fenotipo, ma ha tuttavia ottenuto risultati interessanti effettuando i test di associazione sotto condizionamento dei fattori ambientali come fumo materno, consumo di alcol in gravidanza, supplementazione vitaminica, suggerendo una possibile interazione gene-ambiente per *TBK1*, *ZNF236*, *MLLT3*, *SMC2* e *BAALC*. L'unico gene di cui sia attualmente stata dimostrata l'associazione a CP non sindromico è *FAF1* (*Fas-associated factor1 gene*); Ghassibe-Sabbagh e colleghi (Ghassibe-Sabbagh et al. 2011) hanno dimostrato il coinvolgimento di *FAF1* tramite studi di associazione gene candidato su un'ampia casistica multietnica e hanno fornito approfondimenti sulla funzionalità del gene nello sviluppo condrogenico facciale tramite studi di espressione genica su modelli animali (*zebrafish*). L'assenza pressoché totale di sovrapposizioni tra loci coinvolti nel CL/P e quelli associati a CP suggerisce che questi fenotipi di schisi abbiano eziologie distinte, supportando la separazione storica di nsCL/P da nsCP (Leslie & Marazita 2013).

Il risequenziamento delle regioni codificanti dei geni GWAS candidati non sembra identificare variabili causali, enfatizzando l'idea che il nsCL/P possa essere più frequentemente associato a regioni regolatorie e non codificanti del genoma (Setó-Salvia & Stanier 2014). Indipendentemente dal successo indiscusso degli studi GWAS nell'identificazione di nuovi loci di suscettibilità, è necessario sottolineare come tali studi non siano in grado di spiegare in maniera esaustiva il contributo genetico e funzionale nell'eziologia delle schisi non-sindromiche. Si ritiene dunque probabile che interazioni di tipo gene-gene e gene-ambiente possano rappresentare un sostanziale elemento di rischio addizionale (Brito et al. 2012).

#### **1.7.2.2.1. Approfondimento della patogenesi molecolare**

Gli studi di espressione genica, gli studi dei casi sindromici, e gli studi GWA hanno fornito le indicazioni su quelli che sono molteplici geni e loci presumibilmente implicati nella patogenesi delle schisi non-sindromiche, e alcuni di questi sembrano possedere una plausibile funzionalità biologica.

##### **IRF6 (interferon regulatory factor 6):**

Il gene *IRF6* è stato identificato inizialmente poiché implicato in VWS e PPS (Kondo et al. 2002), e successivamente è stato correlato a nsCL/P (Zuccherò et al. 2004; Rahimov et al. 2008); è l'unico gene per il quale sia stata identificata una variante con attività funzionale (rs642961). Il ruolo di *IRF6* è supportato anche da analisi di modelli animali: recenti studi hanno mostrato che topi mutanti per *Irf6* esibiscono epidermide iperproliferativa che non porta correttamente a termine la differenziazione finale; *IRF6* rappresenta dunque una chiave determinante per la proliferazione/differenziazione dei cheratinociti e ricerche successive hanno mostrato il ruolo di *IRF6* anche nella formazione del periderma orale, la cui regolazione spazio-temporale è essenziale nell'assicurare l'appropriata adesione palatale. Recentemente una combinazione di studi su modelli murini, analisi di espressione, CHIP (*chromatine immunoprecipitation*) e saggi *luciferase reporter* hanno mostrato come *IRF6* sia un *target* diretto di p63 (che attiva la trascrizione di *IRF6* tramite elementi *enhancer*), la quale è coinvolta in numerose sindromi che includono CLP come caratteristica associata (Dixon et al. 2011).

##### **MAFB (V-Maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog B):**

Il gene *MAFB* codifica per un fattore di trascrizione (*basic leucine zipper TF*) coinvolto nello sviluppo e nella differenziazione dei cheratinociti; nel topo, *Mafb* è altamente espresso a livello dei processi palatini e del MEE durante la fusione del palato (Beaty et al. 2010). Identificato dallo studio GWAS del GENEVA *Cleft Consortium* (con alta significatività GWAS nella popolazione asiatica), gli alti livelli di associazione di *markers* (rs13041247 e rs11696257) localizzati sul cromosoma 20q12 vicino a *MAFB* sono stati replicati in diversi altri studi indipendenti. Il sequenziamento esonico di *MAFB* ha portato all'identificazione di una mutazione missenso H131Q (rs121912307), presente nel 3,5% dei casi CL/P nelle Filippine e solo nello 0,7% dei controlli. Localizzata a livello di un tratto poli-istidina, la funzione di H131Q non è ancora nota; tuttavia, analisi di predizione bioinformatica attribuiscono a tale variante un ruolo putativamente deleterio nella funzione della proteina (Leslie & Marazita 2013).

#### **ABCA4 (ATP-Binding Cassette, Sub-Family A, Member 4):**

*ABCA4* codifica per un fattore di trasportatore di ATP-binding cassette. Molteplici *markers* interni al gene e a livello della regione 3' hanno mostrato associazione nello studio GENEVA *Cleft Consortium*, sempre con elevata significatività a livello della popolazione asiatica (in particolare rs560426), e studi di replicazione hanno confermato l'associazione. Studi di espressione murini non hanno però identificato alcuna espressione di *Abca4* a livello dei processi palatini durante l'embriogenesi; il picco di segnale in *ABCA4* potrebbe dunque essere un surrogato per altre varianti eziologiche di altri geni vicini. Beaty e colleghi sottolineano come l'analisi delle triadi CL/P mostra forte associazione con *markers* non solo interni al gene *ABCA4* ma anche nell'intorno del vicino gene *ARHGAP29* (*Rho GTPase activating protein 29*), espresso durante lo sviluppo della regione craniofacciale (Leslie et al. 2012) e candidato nella patogenesi del *cleft*. *ARHGAP29* codifica per una proteina che media la regolazione ciclica di piccole proteine leganti GTP, che sono coinvolte in numerose funzioni critiche per lo sviluppo craniofacciale collegate a modellamento cellulare, migrazione, interazioni cellula-cellula e proliferazione (Leslie & Marazita 2013).

#### **VAX1 (ventral anterior homeobox 1):**

Regolatore della trascrizione contenente un dominio *homeobox* di *binding* al DNA. I *markers* vicini e interni a *VAX1* sono stati identificati sia nello studio di Mangold e colleghi (2010) che in quello condotto dal GENEVA *Cleft Consortium* (Beaty et al. 2010): gli stessi due SNPs (rs7078160 e rs4752028) sono stati evidenziati come over-trasmessi nei casi di CL/P di entrambi gli studi. *Vax1* è ampiamente espresso durante lo sviluppo diverse strutture craniofacciali e modelli murini *knockout* per *VAX1* sviluppano *cleft palate* (Dixon et al. 2011; Leslie & Marazita 2013).

#### **Locus 8q24:**

Il locus a livello del cromosoma 8q24 contiene un'ampia zona di deserto genico (circa 640kb), correlata con forte significatività a molteplici patologie complesse tra cui nsCL/P, cancro alla prostata, cancro colonrettale, cancro alla vescica e cancro al seno. La regione 8q24 è stata fortemente associata a nsCL/P nelle popolazioni caucasiche e replicata indipendentemente in tutti gli studi GWAS. Il gene più vicino a questa regione è l'oncogene *MYC*, che interagisce direttamente con l'estremità del locus 8q24. *Myc* è inoltre fortemente espresso nella mandibola e nella mascella allo stadio E14.5 dell'embriogenesi, ed è rischioso per la formazione delle cellule della cresta neurale. Numerose regioni con dimostrata attività *enhancer* nei tessuti craniofacciali sono stati identificati a livello del locus 8q24, supportando l'ipotesi che tale regione contenga elementi regolari multipli *cis-acting* critici per il corretto sviluppo craniofacciale (Uslu et al. 2014; Leslie & Marazita 2013).

### **PAX7 (paired box 7):**

Fattore di trascrizione con funzione nello sviluppo della cresta neurale, tramite regolazione dell'espressione di *markers* come *Slug*, *Sox9* e *Sox10* (dimostrata in modelli murini). È espresso a livello dei processi palatini, della cartilagine di Meckel e in varie strutture nasali, incluso l'epitelio nasale. Topi mutanti per *Pax7* hanno malformazioni della mascella e del naso, confermando il ruolo di questo fattore nello sviluppo craniofacciale. Nell'uomo, numerosi *markers* sono stati identificati attorno a *PAX7* sia tramite approccio GWAS (Beaty et al. 2010) che nello studio di meta-analisi di Ludwig e colleghi (2012), suggerendo un ruolo importante di varianti comuni di questo gene nell'eziologia delle schisi non-sindromiche (Leslie & Marazita 2013).

### **NOG (noggin):**

Proteina secreta, lega e inattiva *Tgfβ3*; mutazioni a carico del gene causano malformazioni nella fusione ossea, soprattutto a livello delle mani e della testa, e studi animali ne hanno confermato l'espressione a livello craniofacciale durante l'embriogenesi (Brito et al. 2013).

### **THADA (thyroid adenoma associated):**

La funzione di questo gene non è tutt'ora nota; si è osservato che mutazioni sono correlati a tumori della tiroide (Brito et al. 2013; Leslie & Marzita 2013).

### **SPRY2 (sprouty homolog 2):**

Proteina citoplasmatica, colocalizzata con proteine a livello del citoscheletro. Probabilmente agisce come antagonista FGF; è espresso livello craniofacciale durante lo sviluppo embriologico del topo (Brito et al. 2013; Leslie & Marzita 2013).

### **MSX1 (msh homeobox 1) e BMP (Bone morphogenetic proteins):**

Perdita di funzione del gene *Msx1* causa CP in topi; nell'uomo, una mutazione non senso di *Msx1* è stata correlata ad agenesia dentale e casi di *mixed cleft* in una famiglia tedesca, suggerendo un ruolo importante per *Msx1* nell'eziologia delle schisi (Rahimov et al. 2012). *Msx1* rappresenta un *target downstream* delle Bone Morphogenetic Proteins (*BMPs*), molecole segnale appartenenti alla superfamiglia TGFβ, che agiscono come potenti regolari della formazione e riparazione di osso e cartilagine e proliferazione cellulare durante lo sviluppo embrionico. Le *BMPs* regolano la proliferazione cellulare nel mesenchima anteriore del palato, e mantengono l'integrità nella porzione posteriore dell'epitelio palatale. Durante lo sviluppo dei denti, il segnale *BMP* è implicato in quasi tutti i processi dell'odontogenesi (Carreira et al. 2014). *Msx1* è necessario per

l'espressione di *Bmp4* e *Bmp2*; nei topi, perdita di funzione di *Bmpr1a* nei primordi craniofacciali causa CL/P, mentre una deficienza di *Bmp4* risulta in CL. Tali evidenze mostrano come i segnali *Bmp* abbiano distinte funzioni sia nello sviluppo del labbro che del palato secondario.

### **GREM1 (gremlin 1):**

Glicoproteina membro della famiglia *CAN domain*, antagonista extracellulare delle *BMPs*; svolge la sua azione antagonista tramite legame diretto alle BMP. Nello studio GWA condotto da Mangold e colleghi (2010), il locus 15q13.3 viene identificato come promettente candidato di suscettibilità a ncCL/P, con particolare attenzione allo SNP rs1258763, localizzato in una regione intergenica tra *GREM1* e *FMN1 (Formin 1)*; nello studio di Boehringer e colleghi (Boehringer et al. 2011), il medesimo SNP viene investigato come *marker* genetico nelle variazioni della normale morfologia facciale, mostrando un'associazione significativa con la larghezza del naso. Al fine di identificare varianti causali che possano avere un ruolo funzionale nella patogenesi delle schisi, in un recente studio basato sull'approccio di ri-sequenziamento genico, Al Chawa e colleghi (Al Chawa et al. 2014) hanno investigato le regioni codificanti di *GREM1* in 196 pazienti affetti da schisi e 196 controlli, senza rilevare alcuna variante interna al gene che possedesse un ruolo putativamente causale. Tuttavia, i pazienti mostrano un eccesso di varianti rare interne al gene rispetto ai controlli. Tale risultato, unito all'evidenza di espressione di *Grem1* durante lo sviluppo embrionario craniofacciale murino, incrementa l'ipotesi che *GREM1* sia coinvolto nello sviluppo del *cleft* tramite l'azione di polimorfismi nelle regioni regolatorie nell'intorno del gene piuttosto che nelle regioni codificanti dello stesso.

### **WNT (wingless-type MMTV integration site family):**

Sebbene non individuati all'interno degli studi GWA, varianti interne ai geni *WNT* sono state riportate come associate a nsCL/P, e mutazioni di *WNT3* causano tetra-amelia con CLP autosomica recessiva. Sebbene l'evidenza del coinvolgimento delle molecole segnale *Wnt* non sia forte, questi dati hanno promosso ulteriori indagini sui geni coinvolti nel *pathway* delle molecole segnale *Wnt* come candidati per lo sviluppo del labbro e del palato: studi in modelli murini hanno dimostrato che *Wnt9b* ha un ruolo chiave nello sviluppo del labbro (mutazioni di *Wnt9b* causano CLP nel topo), e che il *pathway* canonico delle molecole *Wnt* è attivato durante la morfogenesi facciale dei topi. Inoltre, *Msx1* e *Msx2* sono stati dimostrati essere *target downstream* del *pathway Wnt* durante la formazione e fusione del labbro (Dixon et al. 2011).

### **TGFA (transforming growth factor alpha) e TGFβ3 (transforming growth factor beta):**

Come descritto precedentemente, la superfamiglia dei fattori di crescita TGF e i corrispettivi recettori giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo craniofacciale. *TGFA* è stato il primo gene riportato come associato a nsCL/P (Ardinger et al. 1989); è fortemente espresso a livello del MEE al momento della fusione dei processi palatini, e promuove la biosintesi di matrice extracellulare. In aggiunta, gli alleli di *TGFA* sono tra i pochi fattori genetici che hanno mostrato interazione significativa con fattori ambientali come fumo di sigaretta e uso di vitaminici. Anche *Tgfβ3* è stato identificato in numerosi studi animali come fattore fondamentale nello sviluppo del palato di topi e polli, e alcune varianti genetiche di *TGFβ3* sono state associate a nsCL/P (Rahimov et al. 2012).

### **Sonic Hedgehog (SHH) pathway:**

Pathway coinvolto in numerosi aspetti dello sviluppo embrionale e della morfogenesi craniofacciale, come dimostrato da numerose malformazioni craniofacciali (tra cui l'olopresencefalia) causate dalla perturbazione di questa cascata di segnali estremamente conservata. *Shh* sono ampiamente espresse dall'ectoderma che ricopre le strutture dei primordi facciali e l'intera via è fondamentale nella regolazione dell'organogenesi nei vertebrati: nel differenziamento delle dita e degli arti, nell'organizzazione del sistema nervoso, dei denti e nello sviluppo craniofacciale (Rahimov et al. 2012).

### **FOXE1 (forkhead box E1):**

Membro di una famiglia di fattori di trascrizione coinvolta in maniera primaria nello sviluppo embriologico. Topi con deficienza di *Foxe1* esibiscono CP e malformazioni alla tiroide; come precedentemente discusso, il ruolo di *FOXE1* nell'eziologia del nsCL/P è stato individuato da una meta-analisi effettuata su 13 *genome-wide linkage scan*, e un risequenziamento mirato ha identificato mutazioni missenso di *FOXE1* in tre pazienti non imparentati. Associazioni significative sono state riportate anche da alcuni studi di associazione in diverse popolazioni, sebbene non siano state identificate varianti comuni in zone codificanti del gene (Rahimov et al., 2012).

### **EPHA3 (ephrin receptor A3):**

I recettori Eph costituiscono il più ampio gruppo conosciuto di tirosin chinasi e sono coinvolti in importanti processi dello sviluppo; mentre il segnale *EphB/ephrinB* è critico per la morfogenesi craniofacciale, il contributo del segnale *EphaA/ephrinA* tutt'ora incerto. *EPHA3* è stato identificato dai recenti studi GWAS come possibile gene associato a nsCL/P.



### ***FAF1 (Fas associated factor 1):***

Unico gene attualmente associato all'eziologia del nsCP, codifica per una *Fas-binding protein* mediatrice dell'apoptosi cellulare. È stato identificato tramite l'individuazione di una traslocazione presente in una famiglia multigenerazionale affetta da PRS e CP, caratterizzata dalla presenza di un *breakpoint* sul cromosoma 1p33 che interrompeva il gene *FAF1* a livello del primo introne; studi di associazione su casistiche europee di CP non-sindromiche hanno confermato l'associazione di un polimorfismo intronico del gene (rs3827730) a rischio per nsCP. Il ruolo di questo fattore all'interno dello sviluppo craniofacciale non è tutt'ora ben noto; diversi dati sperimentali suggeriscono l'esistenza di un legame tra *FAF1* e il segnale NF-kB: l'espressione di *FAF1* sembra infatti prevenire la traslocazione di NF-kB nel nucleo, permettendo l'espressione di *SOX9* (*SRY-related homeobox gene9*) che a sua volta promuove l'espressione di *COL2A1* (*Collagen, typell, alpha-1*), due fattori espressi durante condensazione mesenchimale precedente alla condrogenesi nella formazione della mandibola. Tali ipotesi sono state supportate da studi su *Zebrafish* con mutazioni di *FAF1* in cui l'espressione di *SOX9* e *COL2A1* risultava ridotta. Difetti di *FAF1* potrebbero quindi essere correlati ad errori nella differenziazione cellulare della condrogenesi nello sviluppo della mandibola, a cui conseguirebbe il fallimento della corretta chiusura del palato (Ghassibe-Sabbagh et al. 2011).

### **1.7.2.3. Interazioni gene-ambiente**

Le analisi di interazioni gene-ambiente (GxE) rivestono un ruolo estremamente importante; la stima degli effetti principali di geni o ambiente può infatti venire influenzata se non si tiene conto dell'interazione tra essi. Inoltre, la comprensione dei processi di patogenesi è facilitata dagli studi che esaminano il ruolo dell'ambiente e, in particolare, determinano i potenziali interventi in termini di salute pubblica per prevenire l'occorrenza e/o la ricorrenza di schisi, particolarmente in sottogruppi di popolazioni geneticamente suscettibili (Mossey et al. 2009; Rahimov et al. 2012).

Uno degli ultimi studi che ha individuato un'interazione GxE, e all'interno di un contesto GWA, è lo studio di Beaty e colleghi (Beaty et al. 2013), dove i geni *GRID2* e *ELAVL2* vengono identificati come significativamente associati a nsCL/P solo quando si considera la loro interazione con il fattore ambientale fumo di sigaretta.

Altri geni e i fattori principali che sono stati investigati negli studi di interazione GxE includono: *TGFA* e il fumo di sigaretta, *TGF $\beta$ 3* con alcol e fumo di sigaretta, *MSX1* con alcol e fumo, *RARA* e assunzione di materna vitamina A (Mossey et al. 2009).



Oltre a MTHFR, altri geni del ciclo dei folati candidati negli studi di interazione includono *MTHFD*, *MTR*, *MTRR*, *CBS*, *BHMT* e *BHMT2* (Wehby & Murray 2010). Il ciclo dei folati è strettamente collegato al ciclo dell'omocisteina, un aminoacido che si forma in seguito alla demetilazione della metionina, processo fondamentale nei meccanismi di regolazione genica di metilazione del DNA. L'omocisteina, che se accumulata nell'organismo ha effetti tossici (iperomocisteinemia), viene convertita attraverso due diverse vie metaboliche:

- 1) Rimetilazione dell'omocisteina in metionina: reazione catalizzata dall'enzima citoplasmatico 5-metiltetraidrofolato-omocisteina S-metiltransferasi, detto anche Metionina Sintasi (MTR), che utilizza il 5-metiltetraifolato (5-metil-THF), come donatore di gruppi metilici per convertire l'omocisteina in metionina. Co-fattore fondamentale per MTR è la vitamina B12 (cobalamina). La reazione catalizzata da MTR è dunque la seguente:



- 2) Transulfurazione dell'omocisteina in cisteina: catalizzata dall'enzima cistationina beta-sintasi (CBS), una liasi Vitamina B6-dipendente, che coniuga l'omocisteina con una serina.

L'iperomocisteinemia rappresenta dunque il principale segnale di una carenza di folati, vitamina B12 o vitamina B6 nell'organismo, ma può essere causata anche ridotta attività degli enzimi coinvolti nei meccanismi di rimetilazione e transulfurazione dell'omocisteina.

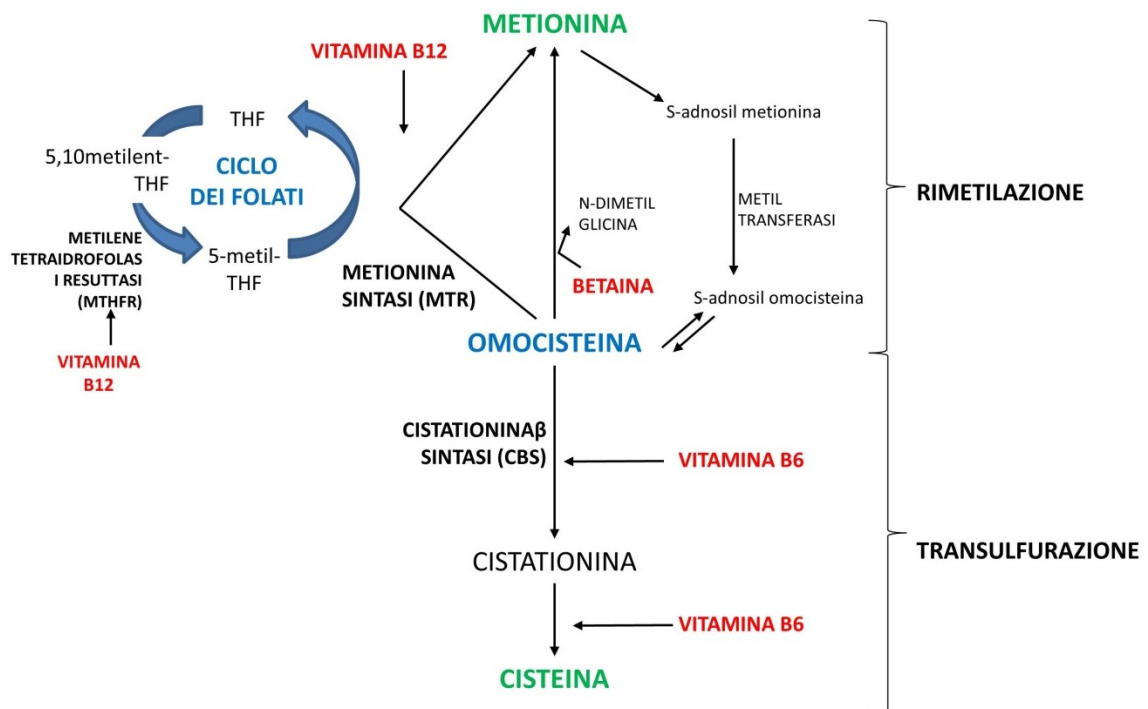


Figura 26: Metabolismo dell'omocisteina.

Wong e colleghi (Wong et al. 1999), hanno mostrato come madri di bambini affetti da CLP avessero livelli di omocisteina maggiori rispetto ai controlli, accompagnati ad alti livelli plasmatici ed eritrocitemici di folati; si è dunque ipotizzato che la causa dell'iperomocisteinemia fosse correlata a un difetto dell'enzima CBS (Rubini et al. 2005).

Sempre correlato al metabolismo dell'omocisteina è il gene *MTRR* (o *MSR*), che codifica per l'enzima metionina sintasi reduttasi: durante la reazione di rimetilazione dell'omocisteina da parte dell'enzima MTR, la cobalamina (o vitamina B12) può ossidarsi, rendendo inattivo l'enzima (che ha attività cobalamina-dipendente). La rigenerazione della funzionalità dell'enzima richiede una metilazione riduttiva della cobalamina catalizzata da MTRR, durante la quale S-adenosilmetionina (SAM) viene utilizzata come donatore metilico. Difetti nel gene MTRR sono associati a diverse patologie e, in particolare, è stato identificato uno SNP interno al gene (rs1801394) che determina sostituzione di una isoleucina con una metionina (I22M), associato ad un notevole incremento del rischio di spina bifida (tipologia di NTD) (Wilson et al. 1999; OMIM\*602568).

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

---

Le schisi orofacciali non-sindromiche, eziologicamente distinte in nsCL/P (*non-syndromic cleft lip with or without cleft palate*) e nsCP (*non-syndromic cleft palate*), rappresentano uno dei difetti congeniti più frequenti al mondo, e costituiscono la seconda causa di mortalità infantile nei paesi sottosviluppati. Il trattamento di tali anomalie richiede numerosi interventi a livello multidisciplinare, con notevole impatto sia sullo stile di vita dell'individuo e della famiglia, che sulla società in termini di costi medici a lungo termine. L'eziologia delle schisi non-sindromiche è estremamente complessa e di natura multifattoriale, e non ancora completamente delineata. Studi di associazione gene-candidato e recenti studi di associazione *genome-wide* (GWAS) hanno identificato varianti comuni associate a incrementato rischio di nsCL/P, definendo numerosi loci di suscettibilità alla patologia; tuttavia il risequenziamento delle regioni codificanti dei geni GWAS candidati non sembra identificare variabili causali, enfatizzando l'idea che il *cleft* non sindromico possa essere più frequentemente associato alle regioni regolative non codificanti nell'intorno di tali geni, e che interazioni di tipo gene-ambiente possano rappresentare un sostanziale elemento di rischio aggiuntivo.

Il presente studio si è dunque focalizzato sull'individuazione di specifiche varianti genetiche interne a loci di suscettibilità per nsCL/P e nsCP, mediante una serie di studi di associazione *family-based* effettuati su un'ampia casistica composta da più di mille triadi europee. In questo modo, partendo da loci precedentemente identificati da studi GWA e studi gene-candidato, è stato possibile indagare il potenziale ruolo funzionale delle varianti selezionate e la presenza di interazione con diversi fattori di rischio ambientale, con lo scopo di raccogliere informazioni che possano contribuire al potenziamento delle strategie di prevenzione primaria, volte a ridurre l'occorrenza di tale malformazione.

### 3. MATERIALI E METODI

---

## 3.1. Campionamento

### 3.1.1. Casistica Europea

Famiglie con figli affetti da nsCL/P o nsCP sono state identificate tramite EUROCRAN (*European Collaboration on Craniofacial Anomalies*, <http://www.eurocran.org/>), un progetto di collaborazione tra ricercatori in 11 paesi Europei: Bulgaria, Danimarca, Inghilterra, Scozia, Estonia, Ungheria, Olanda, Slovacchia, Slovenia, Italia e Spagna.

L'approvazione da parte del comitato etico è stata conseguita da ciascun gruppo partecipante al progetto prima dell'inizio dello studio, ed è stato raccolto il consenso informato in forma scritta per ogni soggetto partecipante; il consenso per la raccolta di campioni dei bambini minorenni affetti è stato ottenuto tramite i genitori. Tra il 2001 e il 2005 le famiglie sono state invitate consecutivamente al reclutamento per lo studio tramite i centri chirurgici partecipanti, nel periodo concomitante al primo intervento chirurgico del bambino affetto da schisi. La diagnosi di CL/P o CP non-sindromico è stata confermata nel centro chirurgico per ogni soggetto affetto; bambini con sindromi riconosciute o Sequenza di Pierre Robin sono stati esclusi dallo studio.

I bambini con meno di un anno di vita sono stati reclutati immediatamente prima dell'intervento chirurgico primario; i protocolli sui trattamenti della riparazione delle schisi specificavano come la riparazione del *cleft lip* veniva eseguita attorno ai 3-4 mesi di età, mentre le riparazioni del *cleft palat* avvenivano intorno ai 6-9 mesi di vita.

E' stato richiesto alle madri dei soggetti affetti di completare un questionario creato specificatamente per lo studio EUROCRAN, la cui compilazione è avvenuta tramite intervista personale alle madri da parte di un medico del centro chirurgico. Le principali aree di richiesta di informazioni del questionario includevano: stato educativo della madre, gruppo etnico di appartenenza, storia familiare di entrambi i genitori, storia medica e riproduttiva della madre, supplementazione della dieta materna in gravidanza, assunzione di farmaci, esposizione a pesticidi, erbicidi o solventi, consumo di cibi che sono fortificati in alcuni paesi dell'Europa (pane, cereali e latte), fumo attivo e passivo, assunzione di alcol. Fattori interni allo stile di vita di particolare interesse sono rappresentati da supplementazione di acido folico in periodo periconcezionale e esposizione al fumo durante la gravidanza. La supplementazione di acido folico è stata definita come assunzione di AF o multivitaminici contenenti AF (quantità minima 0,4mg/die) per almeno un mese durante il periodo periconcezionale (da tre mesi prima a tre mesi dopo il concepimento). L'esposizione materna al fumo è stata definita come consumo di almeno una sigaretta al giorno durante il periodo periconcezionale.



Campioni di sangue o di cellule della desquamazione boccale (*buccal SWAB*) sono stati prelevati per ciascuna madre, padre e figlio per estrarne il DNA. Un protocollo inerente le metodologie di raccolta e trasporto dei campioni è stato definito in accordo da parte dei membri del progetto EUROCRAN ed è stato distribuito a tutti i centri medici partecipanti. L'estrazione e lo stoccaggio del DNA sono stati eseguiti seguendo un protocollo comune sviluppato sempre in accordo da parte dei membri del progetto, ed è stato effettuato presso i centri di ricerca di Dublino (Irlanda) e Lubiana (Slovenia). La titolazione dei campioni di DNA è stata effettuata tramite uso di tecnologia NanoDrop (PeqLab Thermo Scientific).

La collaborazione all'interno del progetto ha portato alla raccolta finale di 866 triadi, di cui 319 (36,84%) provenienti dall'Olanda, 161 (17,78%) dai paesi del Regno Unito (Inghilterra e Scozia), 161 (18,59%) dall'Italia, 9 (1,04%) dalla Spagna, 65 (7,51%) dalla Slovacchia, 76 (8,78%) dall'Ungheria, 22 (2,54%) dall'Estonia, 37 (4,27%) dalla Bulgaria e 23 (2,66%) dalla Slovenia.

La stratificazione della casistica totale per fenotipo di schisi (illustrata in tabella 3) mostra come le schisi del labbro con o senza schisi del palato rappresentino il fenotipo più frequente all'interno della popolazione d'indagine, con una frequenza di circa il 70%, mentre le palatoschisi isolate rappresentano il restante 30%. Le schisi del labbro e del palato sono inoltre più frequenti rispetto alle schisi isolate del solo labbro. Osservando la stratificazione della casistica in base al genere del probando, si osserva come i soggetti affetti da nsCL/P siano prevalentemente di sesso maschile, con un valore di *Sex Ratio* pari a 1,89, mentre soggetti affetti da palatoschisi isolate abbiano maggiore frequenza all'interno del genere femminile, con un *Sex Ratio* pari a 0,66. Le frequenze di fenotipi di schisi e rapporto tra sessi si allineano con i valori riportati nella letteratura epidemiologica, descritta nei capitoli precedenti.

**Tabella 3: stratificazione della casistica EUROCRAN in base a fenotipo di schisi e genere del probando.**

	n, triadi	%	maschi	femmine	SR
nsCL/P	623	72,0	278	147	1,89
nsCL	224	25,9	96	53	1,81
nsCLP	399	46,1	182	94	1,94
nsCP	243	28,0	61	92	0,66
nsOFC	866	100%	617	386	1,60

SR – *Sex ratio*

### 3.1.2. Casistica Italiana

Dopo approvazione da parte del comitato etico, nel periodo 2000-2004, soggetti affetti da nsOFC sono stati identificati tramite tre centri Italiani di trattamento delle schisi orofacciali: l’Ospedale Sant’Anna di Ferrara, l’Ospedale San Paolo di Milano e l’Ospedale Santa Chiara di Pisa. Il 90% dei genitori reclutati erano di nazionalità Italiana (57% dal nord di Italia, 21% dal centro Italia, e 22% dal sud d’Italia), mentre il 10% dei genitori era proveniente da altri Stati. Tutti i soggetti affetti sono stati esaminati da un clinico per confermare la diagnosi di CL/P o CP non-sindromico. Dopo l’ottenimento di uno specifico consenso informato in forma scritta, i genitori sono stati intervistati in maniera estremamente dettagliata su storia familiare, storia medica, esposizione a fattori ambientali (i medesimi indagati nel progetto EUROCRAN) e demografici; successivamente sono stati invitati a fornire un campione di sangue periferico o di *buccal SWAB* per gli studi. Il DNA è stato estratto seguendo protocolli *standard* e titolato mediante misurazione dell’assorbimento  $A_{260}$  tramite utilizzo di spettrofotometro GeneQuant (Pharmacia Biotech, **GE Healthcare Life Sciences**).

È stato ottenuto un totale di 217 triadi genitori-probando, i cui dettagli fenotipi e di rapporto tra sessi sono illustrati in tabella 4. Anche in questo caso, le frequenze fenotipiche di schisi e i rapporti tra sessi sono coerenti a quanto osservato negli studi epidemiologici ad oggi pubblicati in letteratura.

Tabella 4: stratificazione della casistica ITALCLEFT in base a fenotipo di schisi e genere del probando.

	n, triadi		maschi		
	n, triadi	%	maschi	femmine	SR
nsCL/P	156	71,8	107	49	2,18
nsCL	39	17,9	25	14	1,78
nsCLP	117	53,9	82	35	2,34
nsCP	61	28,1	31	30	1,03
nsOFC	217	100,0	138	79	1,74

SR – Sex ratio

## 3.2. Genotipizzazione

### 3.2.1. Genotipizzazione tramite PCR e corsa elettroforetica

La genotipizzazione della casistica per il polimorfismo interno al gene *CBS* (CBS844ins68bp), in cui l'allele variante presenta un'inserzione di 68bp nell'esone8, è stata effettuata tramite amplificazione PCR (*polymerase chain reaction*), utilizzando i *primers* oligonucleotidici:

CBS844F: 5'-CTGGCCTTGAGCCCTGAA- 3'

CBS844R: 5'-GGCCGGGCTCTGGACTC-3'

La PCR è stata effettuata utilizzando 5µl di DNA genomico a 10ng/µl in una mix con volume totale di 15µl contenente i *primers* a concentrazione 20mM ciascuno, dNTPs 2,5mM l'uno, 50mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer 10X e 0,5 U TaqPolimerasi (*Taq* DNA Polymerase kit, Invitrogen). L'amplificazione è stata effettuata tramite l'utilizzo del termociclatore AB2700 (Applied Biosystem) mediante un programma di 36 cicli illustrato in tabella 5:

Tabella 5: programma di amplificazione utilizzato per la genotipizzazione di CBS844ins68

	3 Tmp x 1			3 Tmp x 10			3 Tmp x 25			2 Holds	
Temperature (°C)	94.0°	62.0°	72.0°	94.0°	60.0°	72.0°	94.0°	58.0°	72.0°	72.0°	4.0°
Time (min)	2:10	0:30	0:30	0:15	0:30	0:30	0:15	0:50	0:30	2:00	∞

Il prodotto di PCR, allestita in piastre 96 *well* (Life Technologies), è stato fatto correre su gel di poliacrilamide all'8% per 75 min a 160V, e le bande sono risultate visibili in seguito a colorazione argentica (*silver staining*); il genotipo per ciascun soggetto in esame è stato discriminato in base al peso molecolare dell'amplificato, corrispondente a 184 bp in assenza dell'inserzione (allele D) e 252 bp in presenza dell'inserzione (allele I), come illustrato in figura 27.

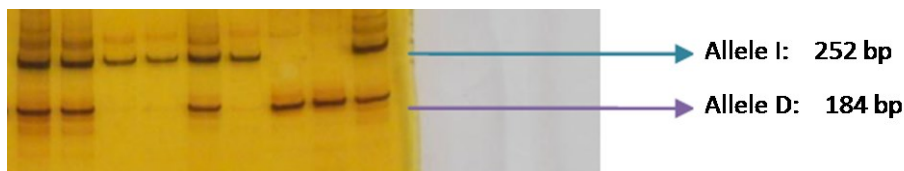


Figura 27: esempio di discriminazione allelica per il polimorfismo CBS844ins68 in base a peso molecolare delle bande amplificate in seguito a reazione di PCR e corsa elettroforetica su gel 8% di poliacrilamide.

Analogamente, la genotipizzazione della casistica per il polimorfismo interno al gene *HLA-G* (HLA-G 14bp ins/del), in cui l'allele variante presenta un'inserzione di 14bp, è stata effettuata tramite amplificazione PCR (*polymerase chain reaction*), utilizzando i *primers* oligonucleotidici:

GE14HLAG: 5'- GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3'

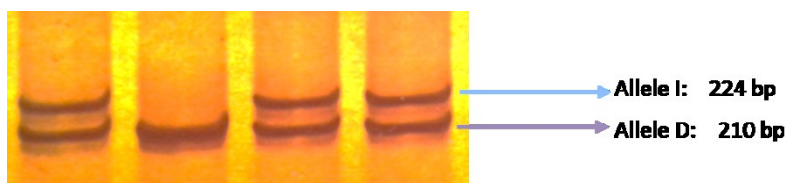
RHG4: 5'- GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA –3'

La PCR, allestita in piastre 96 *well* (Life Technologies), è stata effettuata utilizzando 5µl di DNA genomico a 10ng/µl in una mix con volume totale di 25µl contenente i *primers* a concentrazione 20mM ciascuno, dNTPs 2,5mM l'uno, 50mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer 10X e 0,5 U TaqPolimerasi ricombinante (*Taq* DNA Polymerase kit, Invitrogen). L'amplificazione è stata effettuata tramite l'utilizzo del termociclatore AB2700 (Applied Biosystem) mediante un programma di 36 cicli illustrato in tabella X:

**Tabella 6: programma di amplificazione utilizzato per la genotipizzazione di HLA-G 14bp ins/del**

	3 Tmp x 1			3 Tmp x 10			3 Tmp x 25			2 Holds	
Temperature (°C)	94.0°	64.0°	72.0°	94.0°	63.0°	72.0°	94.0°	62.0°	72.0°	72.0°	4.0°
Time (min)	2:10	0:30	0:30	0:15	0:30	0:30	0:15	0:50	0:30	2:00	∞

Il prodotto di PCR è stato fatto correre su gel di poliacrilamide all'8% per 75 min a 160V, e le bande sono risultate visibili in seguito a colorazione argentica (*silver staining*); il genotipo per ciascun soggetto in esame è stato discriminato in base al peso molecolare dell'amplificato, corrispondente a 210 bp in assenza dell'inserzione (allele D) e 224 bp in presenza dell'inserzione (allele I), come illustrato in figura 28.



**Figura 28: esempio di discriminazione allelica per il polimorfismo HLA-G 14bp ins/del in base a peso molecolare delle bande amplificate in seguito a reazione di PCR e corsa elettroforetica su gel 8% di poliacrilamide.**

### 3.2.2. Genotipizzazione tramite RealTime PCR

La Real Time PCR effettuata tramite utilizzo di sonde TaqMan permette di realizzare saggi di discriminazione allelica in presenza di *single nucleotide variants* (SNV, o *single nucleotide polymorphism*, SNPs). Il protocollo prevede che l'attività 5' endonucleasica della DNA Taq Polimerasi distacchi un oligonucleotide sonda durante la PCR: le sonde TaqMan sono oligonucleotidi di circa 20-30bp, con un valore di T<sub>m</sub> (temperatura di *melting*) aumentato di circa 10°C, che contengono un fluorocromo con funzione di *reporter* sulla base in 5' (VIC/FAM) e un fluorocromo con funzione di *quencher* (solitamente TAMRA) in 3'. Tali oligonucleotidi non sono estendibili in quanto modificati chimicamente all'estremità 3' e la vicinanza del *quencher* al *reporter* impedisce l'emissione della fluorescenza mentre la sonda è intatta. Quando la sonda viene distaccata dalla sequenza *target* ad opera della DNA polimerasi, fluoroforo e *quencher* vengono separati e il fluoroforo è libero di emettere fluorescenza, in maniera direttamente proporzionale al numero di sonde attaccate alla sequenza *target*, e quindi alla quantità di ampliconi all'interno della provetta di reazione. Man mano che la reazione procede e il numero di ampliconi aumenta, aumenta anche la fluorescenza, fino al raggiungimento del *plateau*.

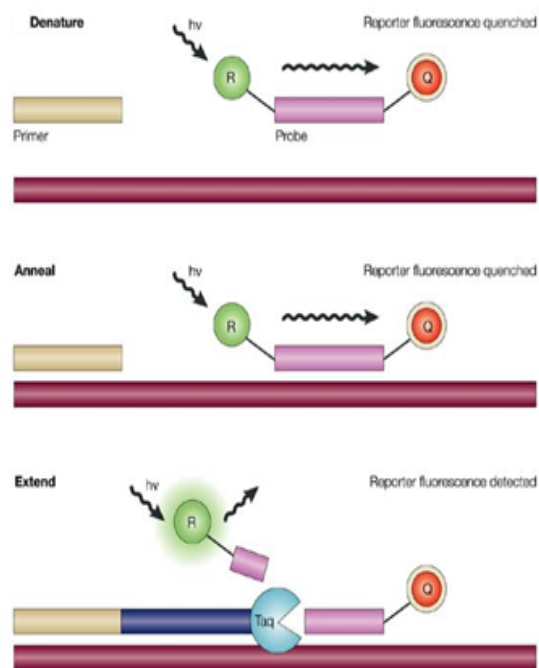
Per ciascuno SNP analizzato nel presente studio è dunque stato utilizzato un saggio di discriminazione allelica (TaqMan SNP genotyping Assay, Applied Biosystem), all'interno del quale la sonda marcata con il reporter VIC era progettata per legare l'allele maggiore del polimorfismo, mentre la sonda marcata con il reporter FAM per legare l'allele minore. La procedura prevede l'impiego di 4 µl Master Mix 2x (TaqMan PCR universal MasterMix, Applied Biosystem), alla quale vengono aggiunti 0.1 µl di TaqMan probe 40x (contenente i primers di amplificazione e le sonde TaqMan allele-specifiche) e 3.9 µl di DNA genomico alla concentrazione di 1 ng/µl, per un volume totale di 8 µl. La reazione viene allestita in apposite piastre da 96 well (Applied Biosystem), sigillate termicamente con film plastico, e l'amplificazione avviene attraverso l'uso del termociclatore AB7300 (Applied Biosystem), dotato di specifico Software System. Il programma di PCR prevede una prima fase di denaturazione (95°C per 10 minuti) seguita da 50 cicli di amplificazione (92°C per 15 secondi + 60°C per 1 minuto), seguite dalle letture ottiche dell'emissione di fluorescenza dei reporter VIC e FAM.

Per la genotipizzazione degli SNPs interni ai geni *GREM1*, *IRF6*, *FAF1*, *SOX9*, *SFSWAP*, *MMP19* e *MTRR* sono stati utilizzati saggi di discriminazione allelica *predesigned*, forniti direttamente dalla ditta (Applied Biosystem, Life Technologies). Per la genotipizzazione della variante HLA-G +3142C>G, non presente tra i prodotti *predesigned* forniti dalla ditta, è invece stato necessario richiedere la fabbricazione di una *assay custom*: la sequenza contenente il polimorfismo di interesse è stata ricavata dal *web tool* GenomeBrowser, ed è stata fornita alla ditta produttrice

evidenziando lo SNP di interesse, indicando quale allele si intendesse marcare con il reporter VIC e quale con il reporter FAM tramite la dicitura [VIC/FAM] e sostituendo con la lettera “N” i polimorfismi non di interesse presenti nella sequenza in analisi che potrebbero dare aspecificità nel legame delle sonde alla sequenza *target*. La sequenza fornita alla ditta Life Technologies come base per la creazione dell’*assay custom* HLA-G +3142C>G corrisponde a:

```
5' -ctcactgtgactgatatgaatgttcatgaatatttttctgtagtgtgaaacagctgcc
ctgtgtgggactgagtggcaagtcccttgtgacttcaagaaccctgactNctcttNtg
cagagaccagcccaNccctNtgNccaccatgaccctcttctctcatgctgaactgcattcc
tccccaatcaccttctNttccagaaaagggctgggatgtctccgNctctgtctcaa
atgtgtgt [C/G] cactgagctataacttacttctgtattaaaattagaatctNagtNt
ttaNtttttcaaattatttccaagagagattgatNggttaattaaaggagaagattcctg
aaatttgagagacaaaataaatggaagacatgagaactttccacagtacacgtgttctt
gtgctgatttgttgcaggagaggagagatagatggggctgcgccagtggggtgctcaggcc
acatgaactttatgtggtc-3'
```

La sonda specifica per l’allele C è dunque stata marcata con il reporter VIC, mentre la sonda specifica per G è stata marcata per il reporter FAM.



**Figura 29: illustrazione schematica del funzionamento del saggio di discriminazione allelica basato su utilizzo di TaqMan SNP genotyping Assay**

### 3.3. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

L'*electrophoretic mobility shift assay* è un saggio di mobilità elettroforetica utilizzato per studiare le interazioni tra presunti fattori di trascrizione e i possibili oligonucleotidi da essi legati, basato sull'utilizzo di sonde ds marcate (biotina in 5') che vengono incubate con fattori di trascrizione ricombinanti o provenienti da estratti nucleari di colture cellulari.

All'interno di questo studio, tale saggio è stato allestito per verificare funzionalmente l'attività putativa di legame del fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$  nella sequenza contenente lo SNP rs17015183 (collocato nell'intorno del gene *IRF6*).

Sono state disegnate sonde *single strand* (ss) biotinilate all'estremità 5', corrispondenti alla sequenza contenente lo SNP (tramite l'utilizzo di programmi on-line quali PRIMER3), rispettivamente per l'allele maggiore A e per l'allele minore C (per ciascun allele sono state disegnate una sequenza *forward* e una *reverse*, entrambe biotinilate all'estremità 5'). Sequenze analoghe ma non marcate (definite "sonde fredde") sono state disegnate per i saggi di competizione. Le sonde marcate e fredde sono state ordinate alla ditta Tema Ricerca, IDT. Sequenze complementari sono state fatte allineare utilizzando i programmi per termociclatore riportati in figura 30, in modo da ottenere rispettivamente due sonde marcate *double strand* (ds) e due sonde fredde ds.

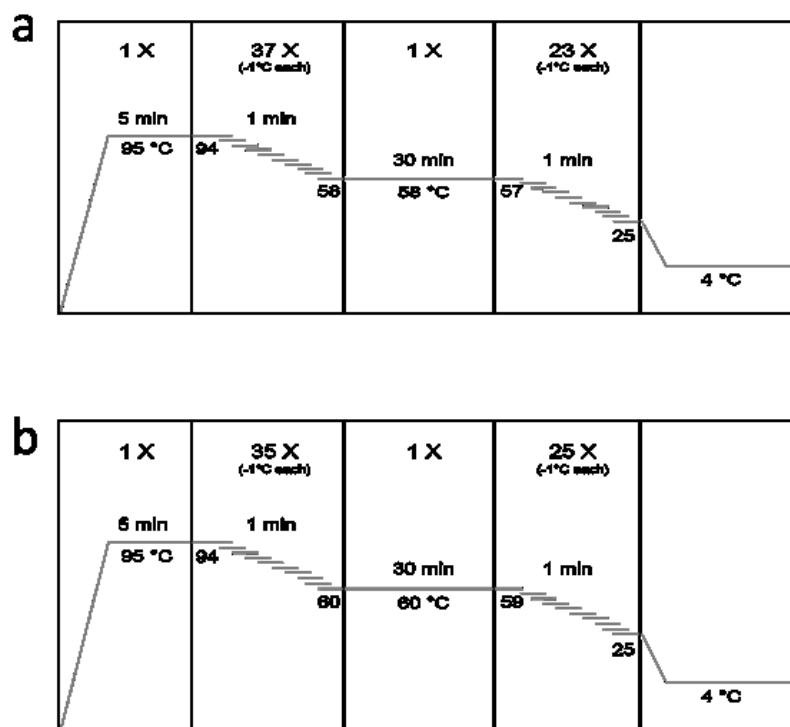


Figura 30: programmi di termociclazione utilizzati per l'annealing di oligonucleotidi ss complementari, contenuti rispettivamente l'allele A (fig. A) e l'allele C (fig.C).

L'immagine X mostra le sequenze per le rispettive sonde ds A e C.

rs17015183 A allele probe

5' -GAAATACTCCCCTTGGGGAATGAAAAAG- 3'  
3' -CTTTATGAGGGGAACCCCTTACTTTTTTC- 5'

rs17015183 C allele probe

5' -GAAATACTCCCCTTGGGGCATGAAAAAG- 3'  
3' -CTTTATGAGGGGAACCCCGTACTTTTTTC- 5'

**Figura 31: sonde oligonucleotidiche utilizzate nel saggio EMSA; differiscono tra loro solo per lo SNP rs17015183 (in grassetto). Il sito di legame putativo per il fattore AP-2  $\alpha$  è sottolineato.**

Il saggio EMSA è stato realizzato utilizzando il Pierce Biotechnology LightShift® EMSA Optimization & Control Kit ed il Chemiluminescent Detection Module (Pierce). 40 ng di proteina ricombinante umana AP-2 $\alpha$  (Active Motif) sono stati incubati con 5 fmol di sonda ds biotinilata all'estremità 5' in 20 $\mu$ l di *binding reaction* contenente 2 $\mu$ l di Pierce 10X *Binding Buffer*, 10 $\mu$ l di 50% Glicerolo, 1 $\mu$ l di 1% NP-40 e 1 $\mu$ g di poly(di-dC) per prevenire legame aspecifico. Per gli esperimenti di competizione, 1pmol di sonda fredda ds non marcata è stata aggiunta alla reazione precedentemente alla sonda marcata. Ciascuna reazione di *binding* è stata lasciata incubare per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo un pre-run di 30-60min a 100V di un mini gel al 5% di poliacrilamide, i campioni sono stati caricati nei pozzetti e si è effettuata corsa elettroforetica in 0,5X TBE Buffer per 65 minuti a 100V, a 4°C per evitare surriscaldamento della vaschetta elettroforetica. I campioni sono stati trasferiti su una membrana di nylon carica positivamente (Boherring Mannheim) tramite un *elettroblotting* di 80 minuti a 380 mA utilizzando un apparato standard di trasferimento per mini gel (utilizzando sempre 0,5X TBE buffer a 4°C). A trasferimento completato, il DNA è stato crosslinkato alla membrana utilizzando la funzione "auto crosslink" del Stratalink® 1800 UV-light Crosslinker (Stratagene). La membrana è stata quindi trattata utilizzando le soluzioni di *blocking, washing and working* (luminolo and horseradish perossidasi, HRP) seguendo le istruzioni fornite dal kit (Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module). L'emissione chemiluminescente delle sonde oligonucleotidiche marcate con biotina è stata visualizzata tramite utilizzo di Chemidoc XRS+ system (Bio-Rad), dotato di specifico Image Lab™ Software.



### 3.4. *Analisi Bioinformatiche*

Le analisi bioinformatiche realizzate all'interno del presente studio hanno utilizzato diversi *tool* per selezionare le varianti da analizzare, e in particolare per la ricerca di varianti che avessero ruolo funzionale nell'intorno dei geni *GREM1* e *IRF6*.

Le sequenze genomiche dei geni di interesse (e l'analisi dei siti multiconservati) sono state indagate tramite utilizzo del *UCSC Human Genome Browser – hg19 assembly tool* (Kent et al. 2002).

Le informazioni inerenti i polimorfismi noti sono state ricavate dal database bsSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>).

La localizzazione delle isole di disequilibrio è stata effettuata tramite utilizzo del *software Haploview (version 3, release R2, analysis Panel CEU+TSI)*, completamente compatibile con il progetto *HapMap* e il *Perlen Genotype Browser* (Barrett et al. 2005).

La predizione dei siti di *binding* per i fattori di trascrizione è stata realizzata tramite l'utilizzo di due diversi tool informatici: TESS (*Transcriptional Element Search System*) era un'applicazione (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) che utilizzava stringhe consenso e matrici posizionali di peso contenute nei database TRANSFAC, Jaspar, IMD e CBIL-GibbsMat. TESS analizzava sequenze di DNA con una lunghezza massima di 2000 bp, sia singole che multiple. L'*output* della ricerca era espresso in diversi formati, tra i quali Excel. Nel 2012 il TESS website è stato rimosso, e le successive analisi di predizione del legame dei fattori di trascrizione sono state effettuate mediante l'utilizzo di un diverso tool, ALGEN-PROMO 3.0, un laboratorio virtuale per lo studio dei siti di legame per fattori di trascrizione all'interno di sequenze di DNA, che utilizza la versione 8.3 del database TRANSFAC (Messeguer et al. 2002; Farré et al. 2003).

### 3.5. *Analisi statistiche*

#### 3.5.1. *Equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE)*

In seguito a genotipizzazione della casistica per ciascuna variante analizzata nello studio, sono state calcolate le frequenze alleliche e genotipiche, ed è stato verificato che tali frequenze non discostassero dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

In una popolazione in equilibrio di Hardy-Weinberg la variabilità genetica rimane costante di generazione in generazione in assenza di forze perturbanti (come campionamento, immigrazione ed emigrazione, selezione). Ovviamente le mutazioni alterano la composizione del *pool* genetico delle nuove generazioni (Snustad e Simmons 2010).

Per un locus biallelico (A,a), le frequenze genotipiche vengono definite sulla base delle frequenze alleliche secondo la relazione di Hardy-Weinberg:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

dove  $p^2$  è la frequenza degli omozigoti AA,  $2pq$  è la frequenza degli eterozigoti Aa e  $q^2$  è la frequenza degli omozigoti aa. Nel caso in cui gli alleli siano più di due il principio di Hardy-Weinberg sarà espresso dal quadrato del polinomio, con tanti termini quanti sono gli alleli.

Per verificare che la popolazione analizzata sia in equilibrio genico di Hardy-Weinberg, si utilizza il test del  $\chi^2$ :

$$\chi^2_{[gl]} = \sum \frac{(\text{numero osservato} - \text{numero atteso})^2}{\text{numero atteso}}$$

dove 'gl' sono i gradi di libertà calcolati come (n-1), ovvero il numero di parametri che vengono stimati nell'analisi dei dati meno uno.

La popolazione analizzata per una data variante si discosta dall'equilibrio di Hardy-Weinberg quando le frequenze genotipiche osservate all'interno della popolazione si manifestano in maniera significativamente diversa dalle frequenze genotipiche attese (ovvero, quando il P-value relativo al  $\chi^2$  risulta inferiore a 0,05); se  $P > 0,05$  allora la popolazione analizzata è in equilibrio genico.

### 3.5.2. Calcolo dei limiti di confidenza

In statistica inferenziale quando si stima un parametro, la semplice individuazione di un singolo valore è spesso non sufficiente. È opportuno allora accompagnare la stima di un parametro con un intervallo di valori plausibili, che viene definito intervallo di confidenza.

Se U e V sono variabili casuali con distribuzioni di probabilità che dipendono dal parametro  $\theta$ :

$$\Pr (U < \theta < V) = \beta$$

Dove  $\beta$  è un numero tra 0 e 1, e l'intervallo casuale (U, V) è l'intervallo di confidenza. I valori estremi dell'intervallo di confidenza si chiamano limiti di confidenza. C'è un metodo agevole per il calcolo degli intervalli di confidenza attraverso il test di verifica d'ipotesi, secondo l'impostazione di Neyman. L'intervallo di confidenza non sarà che un parametro  $\theta$  che si ottiene determinando anzitutto un test, con livello di significatività  $1 - \beta$ , per saggiare l'ipotesi  $\theta = \theta_0$  contro l'ipotesi  $\theta \neq \theta_0$ . L'insieme di tutti i valori  $\theta_0$  per cui si accetterebbe l'ipotesi nulla costituisce un intervallo di confidenza di livello  $\beta$ . Un intervallo di confidenza al 95% si può quindi ricavare da un test di verifica d'ipotesi di significatività (P) 5%. I limiti di confidenza al 95% delle frequenze alleliche e genotipiche sono stati calcolati impiegando la seguente formula:

$$95\% \text{ C.I.} = p \pm 1.96 \cdot \sqrt{p \cdot (1-p) / N - 1 / 2N}$$

Dove p è la frequenza allelica o genotipica e N è il numero di osservazioni eseguite.

### 3.5.3. Calcolo dell'Odds Ratio

Negli studi volti a verificare l'esistenza di un'associazione statistica tra due distinte condizioni, si possono formulare due diverse ipotesi: 1) che vi sia associazione; 2) che non vi sia associazione tra le due variabili.

Le misure per quantificare l'entità di tale associazione sono numerose e la più utilizzata è il "rapporto incrociato" o "Odds ratio" (OR). Con il termine "odds" in statistica s'intende il rapporto tra la probabilità p di un evento e la probabilità (1-p) dell'evento complementare:

$$\text{Odds} = \frac{p}{(1-p)}$$

Il rapporto tra due "odds" è detto Odds ratio:

$$\frac{\frac{p}{(1-p)}}{\frac{q}{(1-q)}} = \frac{p \times (1-q)}{q \times (1-p)}$$

Nel nostro caso l'Odds ratio può essere calcolato utilizzando la seguente formula:

$$\frac{\frac{a}{b}}{\frac{c}{d}} = \frac{a \times d}{c \times b}$$

Dove si considerano a,b,c e d come:

	Presenza Condizione1	Assenza Condizione1
Presenza Condizione2	a	b
Assenza Condizione2	c	d

L'Odds Ratio può assumere valori tra zero e infinito:

OR < 1 associazione negativa

OR = 1 assenza di associazione

OR > 1 associazione positiva

Per verificare se i risultati dell'OR sono significativi si può calcolare l'intervallo di confidenza (CI) al 95%. Infatti se all'interno di questo intervallo è presente il valore 1, il risultato dell'OR non è significativo in quanto l'OR potrebbe assumere anche il valore 1 che significa assenza di associazione. Per calcolare l'intervallo di confidenza bisogna prima procedere al calcolo dell'errore standard (s):

$$s = \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}$$

Successivamente si calcola il logaritmo naturale dell'OR e si utilizza la costante pari a 1,96 per  $\alpha=0,05$  che corrisponde ad un CI al 95%:

$$IC_{95\%} = \ln OR \pm (1,96 \times s)$$

In questo modo si ottengono due valori che rappresentano il limite superiore e quello inferiore dell'intervallo al 95% del logaritmo naturale dell'OR. Per ottenere i limiti dell'intervallo al 95% dell'OR si eleva la costante "e" a ciascuno dei due valori ottenuti precedentemente. Così facendo si ottiene il limite superiore e quello inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% dell'OR. A questo punto basta verificare la presenza del valore 1 all'interno dell'intervallo, se l'1 è presente il valore di OR non è significativo, in caso contrario è significativo.

### 3.5.4. Analisi delle triadi

Le triadi composte da genitori e figlio affetto, descritte sulla base di un polimorfismo biallelico, con alleli A e B, sono riconducibili a 15 composizioni, come riportato in Tabella 7. Le coppie di genitori si presentano in 6 diverse combinazioni, Mating Types, MT. Ogni componente della triade (mo: madre; fa: padre; ch: figlio affetto) viene indicato con 2, 1 o 0 a seconda del numero di alleli varianti (ad esempio, allele variante A) presenti all'interno del suo genotipo (AA: 2; AB: 1; BB: 0).

Tabella 7: combinazioni genotipiche per una triade composta da madre, padre e figlio affetto

	<i>mo</i>	X	<i>fa</i>	>	<i>ch</i>	<i>MFC</i>	<i>Mating type</i>	<i>Allele trasmesso</i>
1	AA	X	AA	>	AA	222	1	
2	AA	X	AB	>	AA	212	2	A
3	AB	X	AA	>	AA	122	2	A
4	AA	X	AB	>	AB	211	2	B
5	AB	X	AA	>	AB	121	2	B
6	AA	X	BB	>	AB	201	3	
7	BB	X	AA	>	AB	021	3	
8	AB	X	AB	>	AA	112	4	A+A
9	AB	X	AB	>	AB	111	4	A+B
10	AB	X	AB	>	BB	110	4	B+B
11	AB	X	BB	>	AB	101	5	A
12	BB	X	AB	>	AB	011	5	A
13	AB	X	BB	>	BB	100	5	B
14	BB	X	AB	>	BB	010	5	B
15	BB	X	BB	>	BB	000	6	

### 3.5.5. *Transmissium Disequilibrium Test (TDT)*

Il *Transmission Disequilibrium Test (TDT)* sviluppato da Spielman nel 1993 (Spielman et al. 1993), è un test che valuta il *linkage* tra trasmissione della malattia e un marcatore genetico, impiegando una casistica composta da triadi di soggetti affetti e relativi genitori. Si tratta di un test di *linkage* in presenza di associazione. L'ipotesi nulla del TDT è che il marcatore e la malattia non siano in *linkage*. Ai fini dell'applicazione del test sono informative solo le coppie di genitori che comprendono almeno un soggetto eterozigote per il marcatore, *mating types* 2, 4 e 5, mentre *mating types* 1, 3, 6 non sono informative e vanno quindi eliminate dall'analisi.

Vengono conteggiate le triadi informative (212, 122, 2x112, 111, 011 e 101) nelle quali si verifica la trasmissione (T), ad esempio dell'allele A, al figlio affetto e le triadi (211, 121, 2x110, 111, 010, 100) nelle quali l'allele A non viene trasmesso (NT) e quindi viene trasmesso B.

Assumendo trasmissione mendeliana del gene, secondo l'ipotesi nulla per la quale non sussiste *linkage* tra l'allele marcatore e il gene causativo della malattia, o che non vi sia associazione tra allele marcatore e malattia, T si distribuisce binomialmente rispetto a T+NT, secondo il parametro 0.5. Nella popolazione in esame l'allele marcatore, in questo caso A, si trasmette casualmente senza relazione con lo *status* del figlio, sia esso affetto o non affetto dalla patologia in esame. Il TDT valuta questa ipotesi nulla, che ha una distribuzione statistica che approssima quella del  $\chi^2$  McNemar Test, con 1 grado di libertà. Il valore della statistica TDT si calcola secondo la formula:

$$TDT = (T-NT)^2 / (T+NT)$$

In pratica, il TDT valuta se la trasmissione dell'allele marcatore dal genitore eterozigote al figlio affetto è casuale. L'ipotesi alternativa è invece che ci sia una trasmissione sbilanciata verso l'uno o l'altro allele in relazione allo *status* del probando. La presenza di strutturazione nella popolazione in esame non causa distorsioni nella trasmissione dell'allele e quindi il test è applicabile anche in presenza di stratificazione, condizione che non consente invece l'applicazione di test secondo modelli caso-controllo.

### 3.5.6. Analisi logaritmico-lineare dei rischi relativi

L'analisi log-lineare, diversamente dal TDT che si limita ad analizzare solo alcune triadi informative, considera tutti i possibili 15 tipi di triadi (Weinberg et al. 1998). La distribuzione dei 15 tipi di triadi, nell'ipotesi che le frequenze genotipiche del polimorfismo in esame siano in equilibrio di Hardy-Wienberg (HWE) o non lo siano (noHWE), è illustrata in Tabella:

Tabella 8:distribuzione delle 15 possibili triadi in base a presenza o assenza di HWE

FC	type	no HWE	HWE
222	1	$\mu_1$	$p^4$
212	2	$\mu_2$	$p^3(1-p)$
211	2	$\mu_2$	$p^3(1-p)$
122	2	$\mu_2$	$p^3(1-p)$
121	2	$\mu_2$	$p^3(1-p)$
201	3	$\mu_3$	$p^2(1-p)^2$
021	3	$\mu_3$	$p^2(1-p)^2$
112	4	$\mu_4$	$p^2(1-p)^2$
111	4	$\mu_4$	$2p^2(1-p)^2$
110	4	$\mu_4$	$p^2(1-p)^2$
101	5	$\mu_5$	$p(1-p)^3$
100	5	$\mu_5$	$p(1-p)^3$
011	5	$\mu_5$	$p(1-p)^3$
010	5	$\mu_5$	$p(1-p)^3$
000	6	$\mu_6$	$(1-p)^4$

All'interno dei nuclei familiari costituiti da genitori e figli, la presenza in questi ultimi di alleli associati a rischio per una specifica patologia, determina una distorsione della distribuzione delle triadi, rispetto a quella presente nella popolazione generale. E' possibile considerare che, i figli portatori di almeno una copia dell'allele in esame, indicato con A, abbiano un rischio aumentato di C1 volte di risultare affetti, mentre i figli omozigoti per l'allele in esame abbiano un rischio aumentato di C2 volte. I parametri C1 e C2 possono essere interpretati direttamente come rischi relativi (RR) e possono essere stimati mediante un modello che ne approssimi al massimo la conta dei 15 diversi tipi di triadi. Questa operazione è possibile mediante l'uso di un programma di Regressione Poissoniana disponibile nel pacchetto statistico STATA ed in altri *software* statistici. Considerando il logaritmo della frequenza teorica di ogni tipo di triade è possibile avviare una analisi log-lineare. Riferendosi, per esempio, alla triade MFC=111, postulando che le frequenze genotipiche non siano in HWE, si ottiene:

$$\log(\lambda_{111}) = \log(2C_1\mu_4) = \log(\mu_4) + \log(2) + \log(C_1).$$

Le frequenze delle triadi possono pertanto essere espresse utilizzando il modello log-lineare con un indicatore variabile per stabilire se il figlio porta un allele A ed un indicatore variabile per lo stato di portatore di due alleli A. Nel calcolo eseguito dal programma di regressione Poissoniana viene aggiunto il coefficiente costante  $\ln(2)$  (variabile offset dell'analisi) per la sola triade MFC=111 (viene aggiunto il valore 0 a tutte le altre triadi).

$$\ln(\lambda_{MFC}) = \gamma_i + \ln(2)I_{MFC=111} + \beta_1 I_{C=1} + \beta_2 I_{C=2}$$

I parametri  $\beta_1$  e  $\beta_2$  sono i logaritmi dei RR per lo stato di portatore rispettivamente di uno o due alleli A. I logaritmi delle frequenze  $\mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4, \mu_5, \mu_6$  sono indicati rispettivamente come  $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \gamma_5, \gamma_6$ , sono stimati nel modello come termini costanti o stratificati. Nel caso in cui le frequenze genotipiche della variante genetica in esame siano in HWE le frequenze possono essere espresse come:

$$P(HW) = p^{M+F} (1-p)^{4-(M+F)} = \left(\frac{p}{1-p}\right)^{M+F} (1-p)^4$$

Se si considera il logaritmo di ciascuna delle probabilità, l'espressione viene semplificata ad una funzione lineare della somma M+F corrispondente al numero complessivo di alleli A portati dalla madre e dal padre.

$$\log[P(HW)] = \log\left(\frac{p}{1-p}\right)(M+F) + 4\log(1-p) = K_1(M+F) + K_2$$

La stratificazione secondo il mating type può essere sostituita mediante aggiustamento secondo una variabile continua contenente il valore M+F, ed il modello log-lineare può essere espresso come:

$$\ln(\lambda_{MFC}) = \alpha + K_1(M+F) + \ln(2)I_{MFC=111} + \beta_1 I_{C=1} + \beta_2 I_{C=2}$$

Il coefficiente  $K_1$  della variabile M+F stima il logit della frequenza ( $p$ ) dell'allele A nella popolazione. Il modello log-lineare consente di incorporare anche variabili esprimenti gli effetti degli alleli della madre. Il genotipo materno è potenzialmente importante per lo sviluppo embrionale in quanto interagisce con l'esposizione a fattori di rischio ambientale (farmaci e nutrienti) e può influenzare l'ambiente intrauterino. Considerando M1 e M2 i rischi relativi allo stato di portatore rispettivamente di uno o due alleli A, i rischi relativi possono essere espressi come:



$$\ln(\lambda_{MFC}) = \gamma_i + \ln(2)I_{MFC=111} + \beta_1 I_{C=1} + \beta_2 I_{C=2} + \beta_3 I_{M=1} + \beta_4 I_{M=2}$$

Nel modello log-lineare applicato allo studio delle triadi gli effetti dei genotipi della madre e quello dei figli viene stimato in modo completamente indipendente e, in assenza di *imprinting* parentale, non vi è effetto di confondimento. In alternativa al modello log-lineare che prevede il calcolo degli effetti relativi allo stato di portatore di uno o due alleli A, possono essere sviluppati modelli specifici per effetti recessivi, dosedipendenti e dominanti. I modelli recessivi sono ottenuti semplicemente rimuovendo il termine che stima l'effetto di un allele, che viene assunto essere uguale al riferimento.

I modelli dose-dipendenti sono ottenuti usando variabili continue contenenti il numero di alleli A nella madre e nel figlio e stimando l'effetto do regressione. I modelli dominanti sono ottenuti stimando l'effetto di una singola variabile indicante la presenza di almeno un allele A. Applicando il pacchetto statistico STATA sono state composte matrici di dati riportanti svariati dati necessari per l'analisi:

- il numero di alleli A nella madre (mo), nel padre (fa) e nel figlio (ch)
- il tipo di mating type - le variabili t2, t3, t4, t5 e t6 relativi alla condizione di non HWE delle frequenze genotipiche
- il numero complessivo M+F di alleli A nella madre e nel padre (mofa)
- le variabili m1 e m2 indicanti se la madre porta uno o due alleli A - le variabili c1 e c2 indicanti se il figlio porta uno o due alleli A
- il valore di offset, pari a 0 per tutte le triadi tranne la triade MFC=111 per la quale il valore è ln(2)
- il valore totn, relativo al numero osservato di ciascuna delle 15 triadi.

Il modello log-lineare, relativo alla condizione di HWE, è stato applicato usando la funzione POISSON. Quando per un certo *mating type* non ci sono triadi il numero anziché 0 viene inserito come mancante.

### 3.5.7. Analisi log-lineare dell'interazione gene-ambiente (GEI)

Il modello log-lineare consente anche di stimare l'interazione tra geni e l'esposizione a fattori di rischio ambientale. L'analisi d'interazione gene-ambiente (*gene-environment interaction* GEI) viene ottenuta dicotomizzando le triadi a seconda che siano state esposte o meno al fattore ambientale oggetto di studio, calcolando i rischi relativi ai diversi genotipi nella madre e nel figlio nelle condizioni di esposizione e di non-esposizione, e calcolando infine i rapporti di rischio. Questi rapporti forniscono una misura del grado di interazione. Nel caso si assuma un effetto dominante dell'allele A oggetto di analisi, si applica l'espressione seguente, nella quale la variabile relativa all'esposizione al fattore di rischio ambientale viene indicata come IE.

$$\ln(\lambda_{MFC}) = \gamma_i + \beta_1 I_{C \geq 1} + \beta_2 I_{M \geq 1} + \ln(2) I_{MFC=111} + \\ \gamma'_i I_E + \beta_3 I_{C \geq 1} I_E + \beta_4 I_{M \geq 1} I_E$$

Gli effetti dell'allele A nella madre e nel figlio sono stimati dalle variabili  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , nella condizione di non-esposizione, mentre variabili  $\beta_3$  e  $\beta_4$  sono relative agli effetti dell'allele A nelle triadi esposte, e sono una misura diretta del grado di interazione tra genotipo ed ambiente.

Implementando il modello nel programma STATA vengono usate le variabili md e cd per valutare, nell'ipotesi di dominanza, l'effetto dell'allele A rispettivamente nella madre e nel figlio. Le variabili mdn, mde, cdn e cde invece indicano l'effetto nella madre o nel figlio a seconda che vi sia stata esposizione (mde, cde) o non esposizione (mdn, cdn) al fattore di rischio ambientale. Le differenze tra i valori di RR riscontrati in presenza o in assenza di esposizione al fattore di rischio ambientale, sono state analizzate applicando il test del  $\chi^2$  con 1 grado di libertà.

### 3.5.8. Test esatto di Fisher

Il test esatto di Fisher è un test per la verifica d'ipotesi utilizzato nell'ambito della statistica non parametrica in situazioni con due variabili nominali e campioni piccoli. Porta il nome del suo ideatore Ronald Fisher. Questo test non parametrico è usato per verificare se i dati dicotomici di due campioni riassunti in una tabella di contingenza 2x2 siano compatibili con l'ipotesi nulla (H0) che le popolazioni di origine dei due campioni abbiano la stessa suddivisione dicotomica e che le differenze osservate con i dati campionari siano dovute semplicemente al caso. Se i campioni sono sufficientemente grandi (e nessuna cella ha un valore inferiore a 5) allora si può usare il test chi quadrato con 1 grado di libertà. Mentre quest'ultimo test è esatto solo asintoticamente per dimensioni molto grandi dei campioni, il presente test proposto da Fisher è, come dice il nome, sempre esatto. Il test esatto di Fisher richiede due variabili nominali divise ciascuna in due sole categorie. Ad esempio la prima variabile potrebbe essere il "sesso" con le due categorie "donna" e "uomo" e la seconda variabile potrebbe essere "segue un dieta" con le due categorie "si" e "no". Si ipotizza in questo caso che la percentuale di uomini che segue una dieta sia uguale alla percentuale tra le donne. Nella tabella di contingenza le lettere a, b, c e d indicano i valori nelle celle e n è la somma totale.

	malato	sano	totale
esposto	a	b	a+b
non esposto	c	d	c+d
totale	a+c	b+d	n

Ronald Fisher dimostrò che la probabilità di ottenere tali valori (vincolati alle somme di riga e colonna realmente osservati) segue la variabile casuale ipergeometrica ed è pari a:

$$p = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!a!b!c!d!}$$

Questa formula dà le probabilità esatte di osservare i valori a, b, c, d (dati a+b, a+c, c+d, b+d) qualora fosse vera l'ipotesi nulla.

### 3.5.9. *Correzione di Yates*

La correzione di Yates viene applicata nel caso di tabelle 2x2 che presentino: la numerosità complessiva (n)5. La correzione si attua con la formula:

$$\chi^2 = \frac{(|ad - cb| - n/2)^2 n}{n_1 n_2 n_A n_B}$$

### 3.5.10. *Correzione di Bonferroni*

La correzione di Bonferroni è un aggiustamento statistico per i confronti multipli. In generale, se abbiamo k test significativi indipendenti, a livello  $\alpha$ , la probabilità p di non avere differenze significative in tutti i test è semplicemente il prodotto delle probabilità individuali:  $(1 - \alpha)^k$ .

Al fine di garantire che il test di significatività complessiva sia ancora a livello  $\alpha$ , bisogna adattare il livello di significatività  $\alpha'$  delle prove individuali.

Ciò comporta la seguente relazione tra il globale e il livello di significatività individuale:

$$(1 - \alpha')^k = 1 - \alpha.$$

Questa equazione può essere facilmente risolto per

$$\alpha': \alpha' = 1 - (1 - \alpha)^{1/k},$$

che per i piccoli  $\alpha$  si riduce a:  $\alpha' = \alpha / k$

## 4. RISULTATI

---

## 4.1. Studi di associazione gene-candidato a nsOFC

### 4.1.1. Associazione di una variante del gene CBS a nsOFC

E' stato dimostrato che la corretta espressione del gene *CBS* (21q22.3) è fondamentale per l'ottenimento di un ambiente uterino ottimale per lo sviluppo embrionico; alleli suscettibili di *CBS* sono dunque stati proposti come candidati nell'eziologia del *cleft*, sia come fattori di rischio genetico (che alterano il ciclo di transulfurazione dell'omocisteina nell'embrione) che come fattori di rischio ambientale geneticamente controllati (che alterano l'ambiente intrauterino) (Rubini et al. 2005; Martinelli et al. 2011).

E' stato riportato in letteratura un polimorfismo comune (MAF 5-10%), costituito da un'inserzione di 68 bp nell'esone 8 (c.[833T>C;844ins68] successivamente abbreviato come c.844ins68): si tratta di una duplicazione del sito 3' di *splicing* dell'introne 7 e il 5' dell'esone 8a livello della giunzione introne/esone, che genera un secondo sito di *splicing* 3'. Le due ripetizioni differiscono per la presenza della mutazione 833T>C, causa di deficienza di CBS; il riarrangiamento porta due sequenze GGGG a trovarsi vicine tra loro, causando silenziamento del sito 3' prossimale. Solo il sito 3' distale è attivo, e la mutazione 833T>C viene eliminata nel processo di *splicing*, generando un trascritto normale (Romano et al. 2002). Nonostante la trascrizione di un trascritto normale, tale variante genica è stata associata a decremento di omocisteina totale plasmatica (tHcy) dopo carico di metionina, e un precedente studio effettuato sulla casistica italiana di triadi genitori-probanda (progetto ITALCLEFT) ha mostrato associazione di c.844ins68 a rischio di nsCL/P, in particolar modo evidenziando una over- trasmissione dell'allele variante da parte della madre eterozigote al figlio affetto (Rubini et al. 2005). Abbiamo quindi effettuato uno studio di associazione gene-candidato *family-based* sulla più estesa casistica del progetto EUROCRAN per confermare i risultati ottenuti nell'analisi della corte Italiana. La genotipizzazione è stata eseguita tramite PCR e discriminazione allelica effettuata in base al peso molecolare delle bande osservate in seguito a corsa elettroforetica. L'allele variante contenente l'inserzione è stato nominato "I" mentre l'allele maggiore è stato convenzionalmente chiamato "D". Le triadi con genotipizzazione incompleta sono state escluse dallo studio, e 270 triadi sono risultate informative per le analisi di associazione (Tabella 9). Le frequenze alleliche e genotipiche osservate non si discostano significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE).

Tabella 9: Triadi genotipizzate per la variante CBS844ins68 informative per le analisi di associazione family-based.

nsOFC	nsCL/P	nsUCL/P	nsBCL/P	nsCL	nsCLP	nsCP
270	206	94	18	80	126	64

Abbiamo indagato la trasmissione dell'allele contenente l'inserzione dai genitori ai figli affetti tramite analisi *Transmissum Disequilibrium Test* (TDT), stratificando in base ai fenotipi clinici di schisi. I valori di TDT sono riportati in tabella 10.

**Tabella 10: analisi TDT perc.844ins68, stratificando in base al fenotipo di cleft e al genere del probando.**

	T	NT	$P_{TDT}$
<b>nsOFC</b>	138	132	0,715
<i>maschi</i>	86	69	0,172
<i>femmine</i>	53	63	0,353
<b>nsCL/P</b>	102	104	0,889
<i>maschi</i>	73	58	0,190
<i>femmine</i>	<b>29</b>	<b>46</b>	<b>0,049</b>
<b>nsCL</b>	36	44	0,371
<i>maschi</i>	12	22	0,086
<i>femmine</i>	12	22	0,086
<b>nsCLP</b>	66	60	0,593
<i>maschi</i>	49	36	0,158
<i>femmine</i>	17	24	0,274
<b>nsCP</b>	36	28	0,317
<i>maschi</i>	12	11	0,834
<i>femmine</i>	23	17	0,342

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele I viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele I non viene trasmesso). *P-value* significativi in rosso.

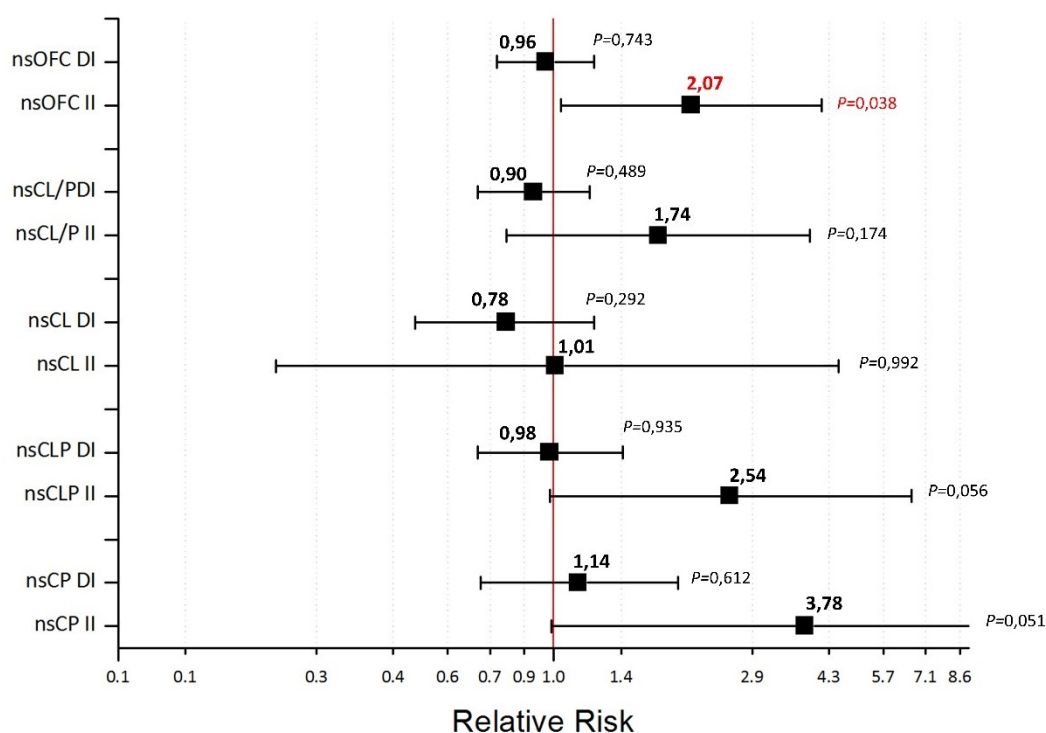
L'allele contenente l'inserzione non mostra over-trasmissione in nessuno dei casi analizzati; valori significativi non sono stati riscontrati nemmeno considerando la trasmissione rispettivamente materna e paterna (non illustrata). Le analisi sono state successivamente stratificate in base ad assunzione di acido folico e ad esposizione al fumo di sigaretta da parte della madre nel periodo precoce della gravidanza e in base (Tabella 11).

**Tabella 11: analisi TDT perc.844ins68, stratificando in base ai fenotipi di cleft del probando in relazione ad assunzione di Acido Folico e ad esposizione a fumo.**

	AF	T	NT	$P_{TDT}$	Fumo	T	NT	$P_{TDT}$
<b>nsOFC</b>	+	100	89	0,423	+	35	37	0,813
	-	42	38	0,654	-	107	96	0,440
<b>nsCL/P</b>	+	74	73	0,934	+	26	30	0,593
	-	27	26	0,890	-	75	73	0,869
<b>nsCL</b>	+	30	34	0,617	+	6	10	0,317
	-	5	8	0,405	-	30	34	0,617
<b>nsCLP</b>	+	44	39	0,583	+	20	20	1,000
	-	22	18	0,527	-	45	39	0,512
<b>nsCP</b>	+	25	16	0,159	+	8	7	0,796
	-	24	26	0,777	-	27	21	0,386

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele I viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele I non viene trasmesso al figlio affetto). AF - assunzione di acido folico da parte della madre.

Anche stratificando per i fattori di rischio ambientale non si osserva alcuna over-trasmissione dell'allele con l'inserzione dai genitori ai figli affetti. Lo spettro di indagine è stato dunque approfondito mediante analisi log-lineare, che ha consentito di ricavare i Rischi Relativi (RR) correlati alla presenza dell'allele variante I all'interno del genotipo del figlio affetto e della madre. Una prima analisi è stata effettuata in maniera ristretta al genotipo del figlio affetto, considerando un modello codominante (o dose-dipendente) che confronta i valori di rischio ottenuti in presenza di un genotipo eterozigote DI (singola dose) o omozigote II (doppia dose), con il genotipo omozigote DD. I valori di RR ottenuti da questa prima analisi sono mostrati nel grafico 1.



**Grafico 1: Rischi relativi del genotipo del figlio affetto secondo un modello codominante.** Valori significativi in rosso.

Questa prima analisi evidenzia una significativa associazione a rischio di nsOFC pari a 2,07 in presenza di un genotipo omozigote II (95% CI: 1,04-4,12;  $P=0,038$ ). Valori di rischio con significatività statistica *borderline* sono osservabili anche nei fenotipi nsCLP (RR=2,54; 95% CI: 0,98-6,63;  $P=0,056$ ) e nsCP (RR=3,78; 95% CI:= 0,99-14,37;  $P=0,051$ )

Considerando la presenza di associazione a rischio solo per il genotipo II, le successive analisi sono state effettuate secondo un modello recessivo, dove l'unico genotipo considerato di rischio corrisponde all'omozigote per la variante in esame (rischio di II confrontato con DI+DD). I valori di rischio sono stati quindi calcolati sia in relazione al genotipo del figlio affetto (Grafico 2), che in relazione al genotipo materno (Grafico 3).



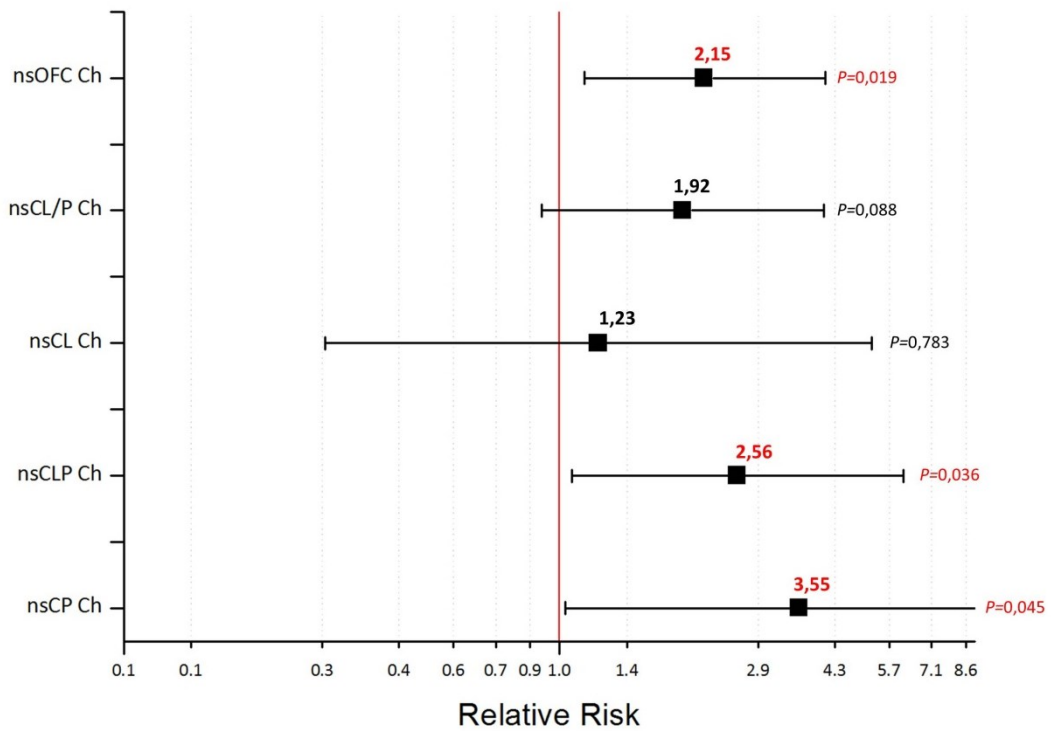


Grafico 2: Rischi relativi del genotipo del figlio affetto secondo un modello recessivo. Valori significativi in rosso.

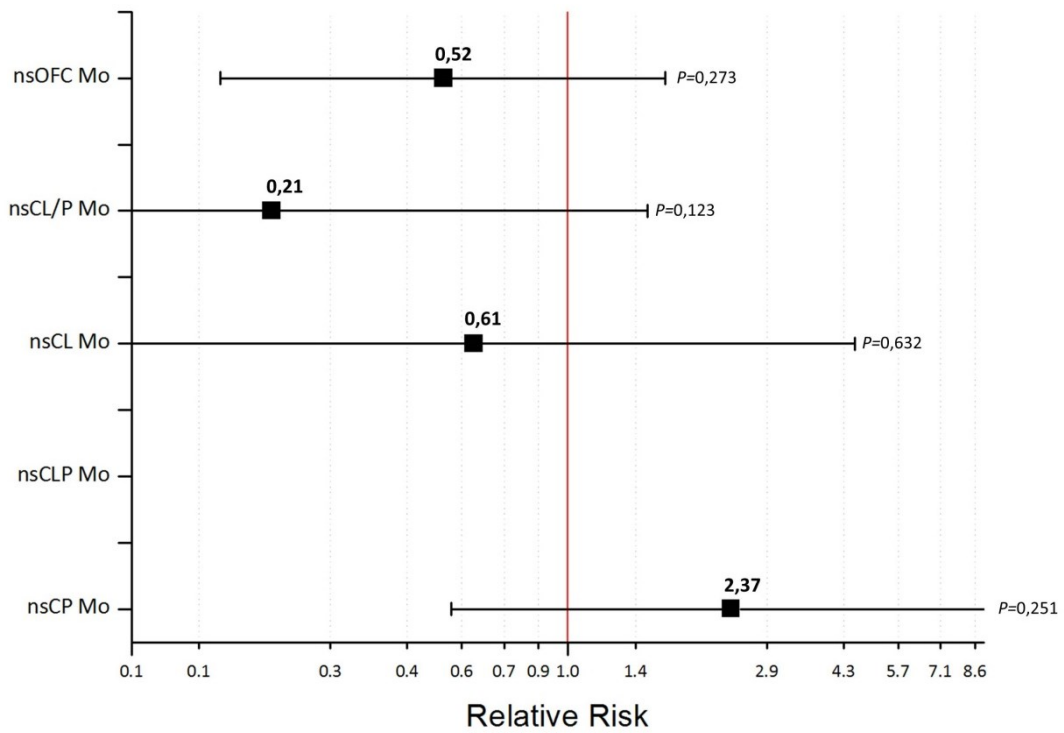
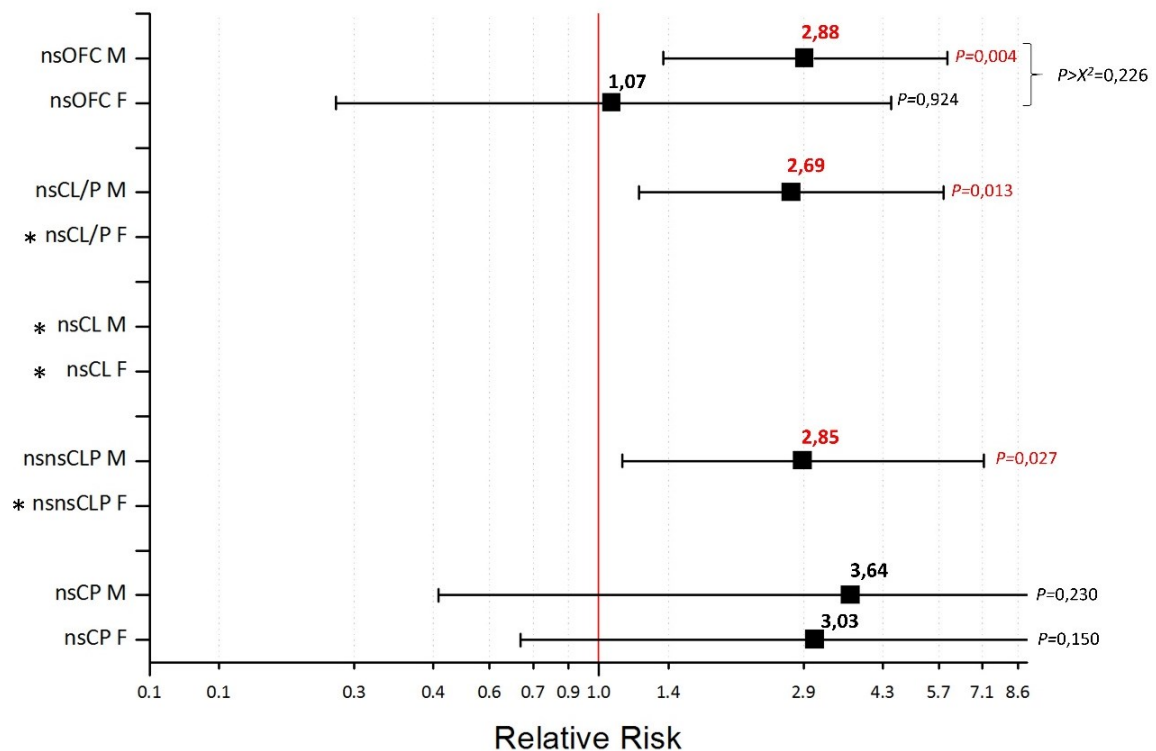


Grafico 3: Rischi relativi del genotipo materno secondo un modello recessivo. Valori significativi in rosso.

I rischi correlati al genotipo del figlio si confermano, incrementando rispettivamente il valore a 2,15 nel caso di nsOFC (95% CI: 1,14-4,08;  $P=0,019$ ), a 2,56 nel caso di nsCLP (95% CI: 1,07-6,16;  $P=0,036$ ) e a 3,55 per nsCP (95% CI: 1,03-12,24;  $P=0,045$ ). Il genotipo materno non appare invece correlato a rischio di nascita di un figlio affetto.

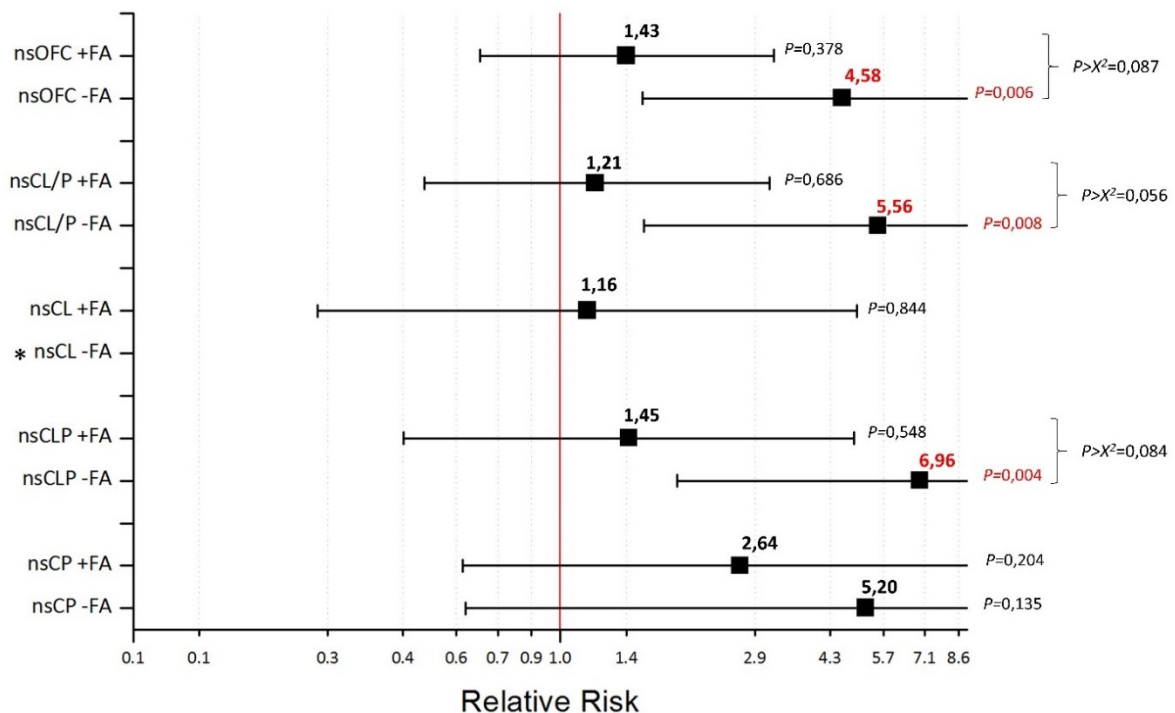
Appurata l'associazione a rischio in presenza di figli con genotipo omozigote per l'inserzione (II), si è indagata l'interazione di tale genotipo con determinati fattori ambientali. L'analisi dell'interazione gene-ambiente (*gene-environment interaction* GEI) viene convenzionalmente eseguita applicando il modello log-lineare, dicotomizzando la casistica a seconda dell'esposizione o non-esposizione al fattore di rischio in esame e indagando la presenza di una differenza statisticamente significativa ( $\chi^2$ ,  $P>\chi^2$ ) tra esposti e non esposti. Una prima indagine è stata effettuata considerando il genere del figlio affetto (Grafico 4): si sono dunque confrontati i diversi valori di rischio relativi alle categorie maschi e femmine (il concetto di "esposto" e "non esposto" viene adattato in base all'esposizione al genere maschile o femminile relativo al figlio affetto della triade).



**Grafico 4: Rischi relativi del genotipo II del figlio affetto considerando il genere.** M – maschio. F – femmina. Valori significativi segnati in rosso. \*Valori di RR non calcolabili.

Osservando il grafico, appare evidente come il confronto dell'associazione a rischio tra i due generi sia sbilanciato nei confronti nel sesso maschile: i maschi affetti da nsOFC (RR=2,88; 95% CI: 1,39-5,98;  $P=0,004$ ), nsCL/P (RR= 2,69; 95% CI: 1,23-5,86;  $P=0,0139$ ) e nsCLP (RR= 2,85; 95% CI: 1,13-7,91;  $P=0,027$ ) mostrano associazioni a rischio significative; sebbene il valore di  $P>\chi^2$  (calcolabile solo per nsOFC) non conferma la significatività della differenza dei rischi tra maschi e femmine, il *trend* osservabile suggerisce una maggiore associazione a rischio nei confronti del genere maschile.

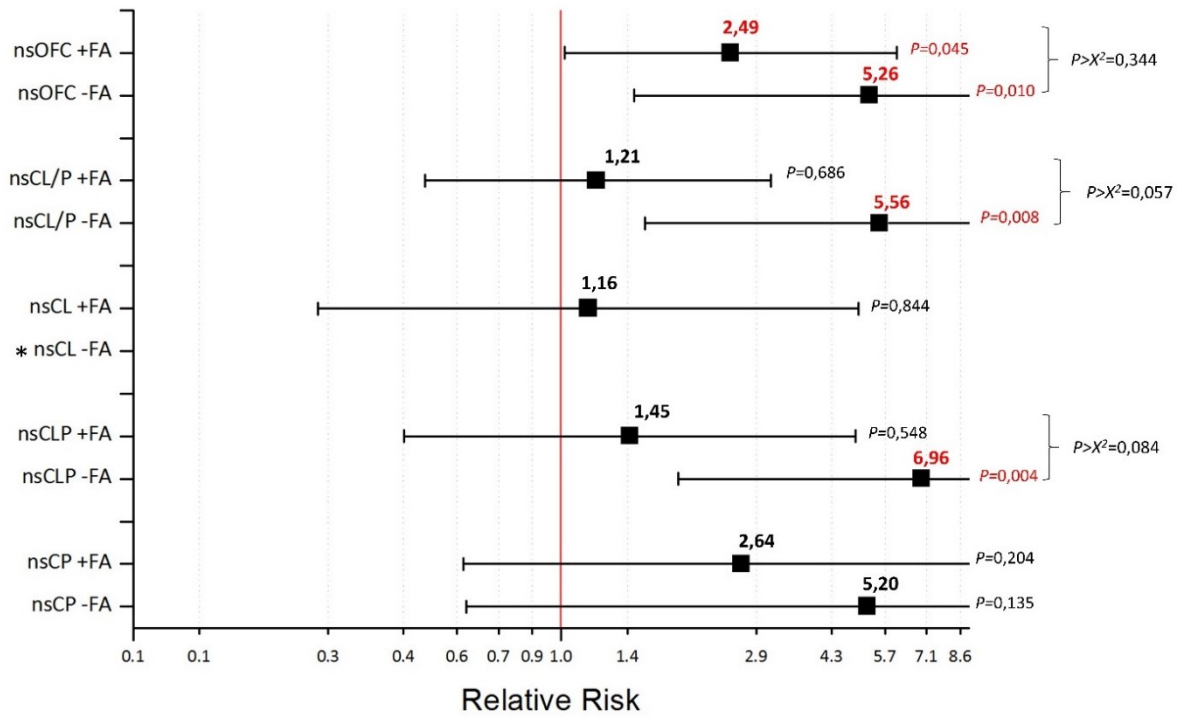
Il successivo fattore ambientale preso in esame consiste nella supplementazione con acido folico o multivitaminici della dieta materna nel periodo precoce della gravidanza: il confronto è stato eseguito tra esposti (triade in cui la madre ha assunto acido folico) e non esposti (triadi in cui la madre non ha assunto acido folico).



**Grafico 5: Rischi relativi del genotipo II del figlio considerando l'esposizione a supplementazione di acido folico in gravidanza precoce.** FA– *folic acid*. Valori significativi segnati in rosso. \*Valori di RR non calcolabili.

Nel caso in cui le madri non abbiano supplementato la dieta con acido folico, si assiste ad un notevole aumento del rischio di nsOFC, ed in particolare di nsCL/P (RR=5,56; 95% CI: 1,57-19,65;  $P=0,008$ ) e nsCLP (RR=6,96; 95% CI: 1,88-25,73;  $P=0,004$ ); i valori di  $P>\chi^2$  risultano *borderline*, suggerendo un *trend* di incremento di rischio per le forme più gravi di schisi nel caso in cui la madre non assuma acido folico in gravidanza in presenza di un figlio con genotipo II.

Considerando i dati precedentemente ottenuti abbiamo stratificato ulteriormente l'analisi per genere, per indagare l'eventualità di un ulteriore aumento del rischio in figli maschi con genotipo II le cui madri non abbiano assunto acido folico durante la gravidanza precoce (Grafico 6).



**Grafico 6: Rischi relativi del genotipo II di figli maschi considerando l'esposizione a supplementazione di acido folico in gravidanza precoce.** FA– *folic acid*. Valori significativi segnati in rosso. \*Valori di RR non calcolabili.

Coerentemente alle precedenti osservazioni, i dati ottenuti mostrano come una mancata supplementazione della dieta materna sembri determinare sbilanciamento del rischio di sviluppo di schisi nei figli maschi: anche in questo caso i valori di  $P > \chi^2$  non sono significativi ma *borderline*; tuttavia, i singoli valori di rischio nei casi di mancata supplementazione hanno valori di RR alti e con *P-value* estremamente significativi, in particolar modo nel caso di nsCL/P (RR=5,56; 95% CI: 1,57-19,65;  $P=0,008$ ) e nsCLP (RR= 6,96; 95% CI: 1,88-25,73;  $P=0,004$ ).

L'ultimo fattore ambientale preso in esame corrisponde all'esposizione al fumo di sigaretta da parte della madre durante la gravidanza; l'analisi GEI condotta sull'interazione tra il genotipo II del figlio e l'esposizione al fumo da parte della madre non ha però evidenziato alcuna differenza di rischio tra triadi con madre fumatrice e triadi con madre non fumatrice, e l'indagine non è stata ulteriormente approfondita.

#### 4.1.2. Studio di associazione di varianti del gene HLA-G a nsOFCs

Il mantenimento dell'ambiente intrauterino è indispensabile per il corretto sviluppo embrionale. Un ruolo estremamente importante è rappresentato dall'interfaccia materno-fetale, a livello della quale devono instaurarsi una serie di meccanismi di tolleranza del sistema immunitario materno nei confronti del feto. HLA-G (*human leukocyte antigen-G*), appartenente al complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (MHC-I), è una glicoproteina primariamente espressa a livello dell'interfaccia materno-fetale, dove gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività citotossica delle cellule *Natural Killer* materne, promuovendo i meccanismi di immunotolleranza. Alterazioni della funzionalità di HLA-G sono state ampiamente correlate a casi di abortività spontanea ricorrente, e a fallimenti nell'impianto di embrioni tramite fertilizzazione in vitro (Aldrich et al. 2001). Sebbene non vi siano evidenze sperimentali riportate in letteratura, vi sono ampi sospetti che le interazioni a livello dell'interfaccia materno-fetale giochino un ruolo importante nell'eziologia delle nsOFCs, e che varianti del gene *HLA-G* possano essere associate a rischio di sviluppare la malformazione.

Una delle varianti comuni più conosciute del gene *HLA-G* (locus 6p21.3) è rappresentata da rs66554220: si tratta un'inserzione di 14bp (insATTGTTCATGCCT) a livello del 3'-UTR dell'esone 8, più comunemente chiamata HLA-G 14bp del/ins. Si presume che l'allele contenente l'inserzione (convenzionalmente chiamato "I"; mentre l'allele maggiore viene indicato come "D") determini la creazione di un sito di *splicing* alternativo, che al momento della trascrizione causa la rimozione di 92bp dal 3'-UTR, riducendo la stabilità dell'mRNA e conseguentemente i livelli di espressione della glicoproteina HLA-G. Tale variante è stata associata a diverse condizioni patologiche, tra cui anche l'aborto ricorrente (Shankarkumar et al. 2011).

Una seconda variante nota del gene HLA-G corrisponde a rs1063320, più comunemente indicata come +3142C>G, localizzato anch'essa nell'esone 8; si suppone che la presenza della guanina in posizione +3142 influenzi l'espressione di HLA-G aumentando l'affinità di questa regione con alcuni microRNA (miR-148a, miR-148b, miR-152) che ne decrementano la disponibilità per la trascrizione. Questo polimorfismo è stato identificato come in completo *linkage di disequilibrium* con l'allele 14bp ins e associato a pre-eclamsia (Larsen et al. 2010).

Abbiamo dunque effettuato uno studio di associazione su entrambi i polimorfismi, per indagarne un'eventuale correlazione all'eziologia di nsOFC. Lo studio è stato eseguito sulle 217 triadi italiane genitori-figlio affetto appartenenti alla casistica del progetto ITALCLEFT e su 100 triadi italiane del progetto EUROCRAN.

La casistica è stata genotipizzata per la variante HLA-G 14bp del/ins tramite PCR, corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide e discriminazione allelica basata sul peso molecolare delle bande osservate. Le triadi con genotipizzazione incompleta sono state escluse dallo studio; 222 triadi sono risultate informative (Tabella 12). Le frequenze genotipiche sono risultate pari al 33% per il genotipo DD, 46% per il genotipo DI e 22% per il genotipo II, con frequenze alleliche pari al 56% per D e 44% per I. In particolare, nei genitori si osserva una frequenza del 57% per l'allele D e del 43% per l'allele I, mentre nei figli le frequenze alleliche corrispondono al 55% per D e 45% per I. Le frequenze osservate non si discostano significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

**Tabella 12: Triadi genotipizzate per la variante HLA-G 14bp ins/del informative per le analisi di associazione *family-based*.**

nsOFC	nsCL/P	nsUCL/P	nsBCL/P	nsCL	nsCLP	nsCP
222	160	113	47	41	119	62

Il TDT per HLA-G 14bp ins è stato calcolato in riferimento alla trasmissione dell'allele variante I dai genitori al figlio affetto. La tabella 13 mostra i valori di TDT ottenuti stratificando in base al fenotipo di schisi, considerando anche i sottofenotipi di nsCL/P Unilaterale e Bilaterale.

**Tabella 13: analisi TDT per HLA-G 14bp ins, stratificando in base al fenotipo di *cleft* e al genere del probando**

	<b>T</b>	<b>NT</b>	<b>P<sub>TDT</sub></b>
<b>nsOFC</b>	110	93	0,233
<i>maschi</i>	70	57	0,249
<i>femmine</i>	40	36	0,646
<b>nsCL/P</b>	82	65	0,161
<i>maschi</i>	60	42	0,075
<i>femmine</i>	22	23	0,881
<b>nsUCL/P</b>	<b>63</b>	<b>41</b>	<b>0,031</b>
<i>maschi</i>	<b>52</b>	<b>26</b>	<b>0,003</b>
<i>femmine</i>	11	15	0,433
<b>nsBCL/P</b>	19	24	0,446
<i>maschi</i>	8	16	0,102
<i>femmine</i>	11	8	0,491
<b>nsCL</b>	23	16	0,262
<i>maschi</i>	16	9	0,162
<i>femmine</i>	7	7	1,000
<b>nsCLP</b>	59	49	0,366
<i>maschi</i>	44	33	0,210
<i>femmine</i>	15	16	0,857
<b>nsCP</b>	28	28	1,000
<i>maschi</i>	10	15	0,317
<i>femmine</i>	18	13	0,369

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele I viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele I non viene trasmesso al figlio affetto). P-values significativi segnati in rosso.:

Gli unici valori significativi di over-trasmissione dell'allele I si osservano nel sottotipo nsUCL/P (T/NT =63/41;  $P_{TDT}=0,031$ ), ed in particolare all'interno del genere maschile (T/NT = 52/26;  $P_{TDT}=0,003$ ).

Grazie alle informazioni fenotipiche estremamente dettagliate che sono state raccolte durante il reclutamento delle famiglie coinvolte nel progetto ITALCLEFT, è stato possibile utilizzare dati ampiamente esaustivi sul periodo esatto di supplementazione della dieta materna (pre o post concenzionale), e il TDT è stato condotto considerando tre distinti gruppi di assunzione di AF: pre-concenzionale (madi che hanno cominciato ad assumere AF circa 3 mesi prima del concepimento), post-concenzionale (madi che hanno cominciato ad assumere AF solo una vota scoperta la gravidanza) e assenza di supplementazione. I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 14.

**Tabella 14: analisi TDT per HLA-G 14bp ins, stratificando in base a tre diverse modalità di assunzione di acido folico: in periodo pre-concenzionale, in periodo post-concenzionale e in caso di mancata assunzione.**

	AF	T	NT	$P_{TDT}$
nsOFC	pre Conc.	10	6	0,317
	post Conc.	25	26	0,889
	No	75	61	0,230
nsCL/P	pre Conc.	10	3	0,052
	post Conc.	16	16	1,000
	No	56	44	0,230
nsUCL/P	pre Conc.	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0,008</b>
	post Conc.	10	12	0,670
	No	45	28	<b>0,047</b>
nsBCL/P	pre Conc.	3	3	1,000
	post Conc.	6	4	0,527
	No	11	16	0,336
nsCL	pre Conc.	4	0	<b>0,046</b>
	post Conc.	3	5	0,480
	No	15	10	0,317
nsCLP	pre Conc.	6	3	0,317
	post Conc.	13	11	0,683
	No	41	34	0,419
nsCP	pre Conc.	0	3	0,083
	post Conc.	9	10	0,819
	No	19	17	0,739

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele I viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele I non viene trasmesso al figlio affetto).  $P$ -values significativi segnati in rosso.

L'unica associazione estremamente significativa che si osserva corrisponde al sottogruppo degli UCL/P in cui la madre ha assunto acido folico in periodo pre-concenzionale: in questo caso si osserva una over-trasmissione dell'allele I dai genitori al figlio affetto (T/NT = 7/0;  $P_{TDT}=0,008$ ).

**Tabella 15: analisi TDT per HLA-G ins stratificando in base ai fenotipi di *cleft* e all'esposizione al fumo di sigaretta da parte della madre nel periodo precoce della gravidanza.**

	<i>Fumo</i>	<i>T</i>	<i>NT</i>	<i>P<sub>TDT</sub></i>
<b>nsOFC</b>	+	21	30	0,208
	-	<b>89</b>	<b>63</b>	<b>0,035</b>
<b>nsCL/P</b>	+	16	24	0,206
	-	<b>66</b>	<b>41</b>	<b>0,016</b>
<b>nsUCL/P</b>	+	10	14	0,414
	-	<b>53</b>	<b>27</b>	<b>0,004</b>
<b>nsBCL/P</b>	+	6	10	0,317
	-	13	14	0,847
<b>nsCL</b>	+	3	5	0,480
	-	20	11	0,106
<b>nsCLP</b>	+	14	19	0,384
	-	46	30	0,066
<b>nsCP</b>	+	5	6	0,763
	-	23	22	0,881

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele I viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele I non viene trasmesso al figlio affetto). *P*-values significativi segnati in rosso.

L'analisi TDT effettuata stratificando la popolazione in base all'esposizione al fumo di sigaretta (Tabella 15) ha mostrato trasmissione dell'allele variante a figli affetti da schisi in presenza di madri non fumatrici ( $T/NT = 89/63$ ;  $P_{TDT}=0,035$ ); in particolare, l'associazione si riscontra all'interno dei nsCL/P ( $T/NT = 66/41$ ;  $P_{TDT}=0,016$ ), con valori estremamente significativi nel sottogruppo dei nsUCL/P ( $T/NT = 52/26$ ;  $P_{TDT}=0,003$ ), mentre non si osserva alcuna associazione nei casi di schisi bilaterale.

Gli studi di interazione con l'ambiente sono stati condotti considerando oltre ai fattori di rischio convenzionali (genere, supplementazione con AF, esposizione al fumo di sigaretta), anche parametri più specifici della gravidanza, che permettano di fornire un'immagine più rappresentativa del possibile ruolo di varianti del gene *HLA-G* nell'eziologia delle schisi non sindromiche.

In particolare, sono stati considerati rispettivamente i parametri relativi la lunghezza della gravidanza e della genitura del probando. Il valore soglia per la lunghezza della gravidanza è stato fissato alla 38 settimana (probandi vengono considerati nati "pretermine" in gravidanze di lunghezza inferiore o uguale alle 38 settimane e nati "a termine" per in gravidanze superiori o uguali alle 39 settimane). In relazione alla genitura, la casistica è invece stata dicotomizzata tra figli affetti nati come primogeniti (1) e figli affetti non primogeniti (>1).

I risultati dell'analisi TDT per entrambi i parametri sono riportati in Tabella 16.



Tabella 16: analisi TDT per HLA-G ins stratificando in base ai fenotipi di *cleft* e parametri specifici della gravidanza: lunghezza gravidanza e genitura.

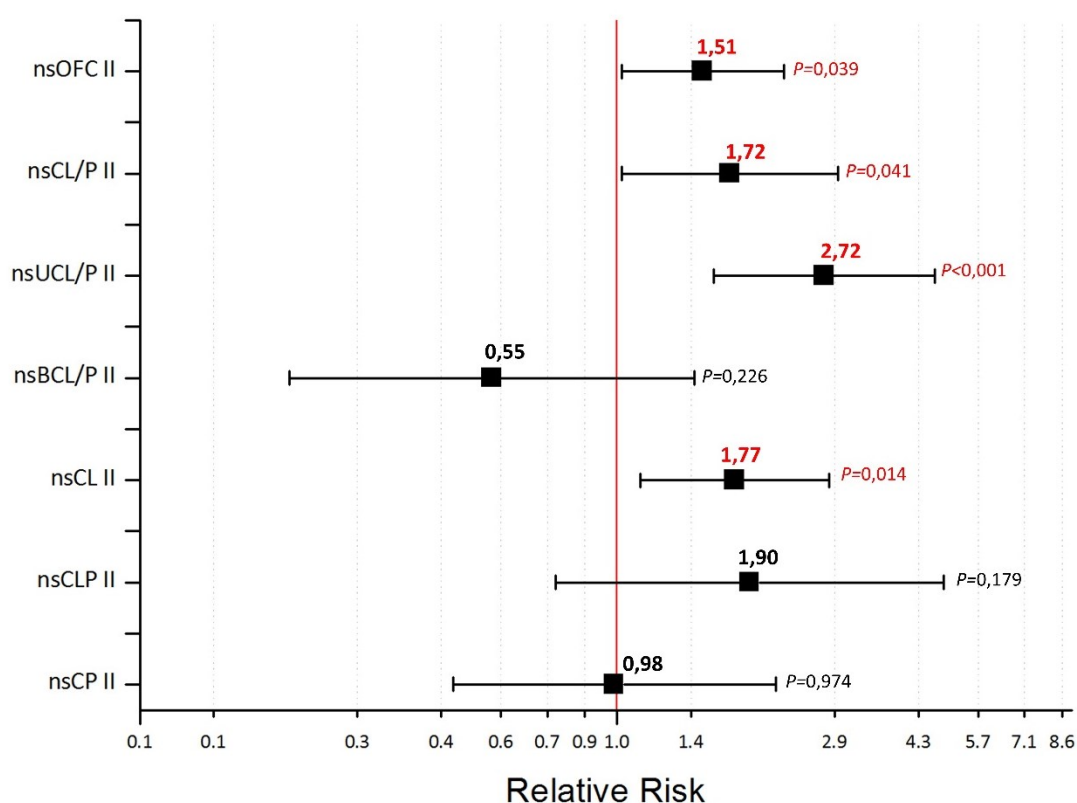
	Lunghezza gravidanza	T	NT	$P_{TDT}$	Genitura	T	NT	$P_{TDT}$
nsOFC	≤ 38 settimane	27	44	0,044	1	64	40	0,019
	≥ 39 settimane	79	48	0,006	>1	26	37	0,166
nsCL/P	≤ 38 settimane	19	32	0,069	1	49	27	0,012
	≥ 39 settimane	59	30	0,002	>1	21	30	0,208
nsUCL/P	≤ 38 settimane	12	18	0,273	1	39	18	0,005
	≥ 39 settimane	47	22	0,003	>1	14	17	0,590
nsBCL/P	≤ 38 settimane	7	14	0,127	1	10	9	0,819
	≥ 39 settimane	20	18	0,371	>1	7	13	0,180
nsCL	≤ 38 settimane	8	2	0,058	1	14	6	0,074
	≥ 39 settimane	12	12	1,000	>1	6	8	0,593
nsCLP	≤ 38 settimane	11	30	0,003	1	35	21	0,0614
	≥ 39 settimane	47	18	<10 <sup>-3</sup>	>1	15	22	0,250
nsCP	≤ 38 settimane	8	12	0,371	1	15	13	0,705
	≥ 39 settimane	20	18	0,746	>1	5	7	0,564

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele I viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele I non viene trasmesso al figlio affetto). 1 – figlio affetto primogenito. >1 – figlio affetto non primogenito.  $P$ -values significativi segnati in rosso.

I dati ottenuti mostrano un'interessante trasmissione allelica opposta tra le gravidanze pretermine e le gravidanze a termine: mentre nei casi di gravidanze con lunghezza inferiore o uguale alle 38 settimane l'allele I tende a non essere trasmesso dai genitori al figlio affetto (T/NT = 27/44;  $P_{TDT}=0,044$ ), nei casi di gravidanza maggiore delle 38 settimane l'allele I è significativamente over-trasmesso nei figli affetti da schisi non sindromiche (T/NT = 79/48;  $P_{TDT}=0,006$ ). Il medesimo effetto appare estremamente significativo nel gruppo delle nsCLP, dove si osserva un rapporto T/NT = 11/30 ( $P_{TDT}=0,003$ ) nei nati pretermine e un rapporto T/NT = 47/18 ( $P_{TDT}<0,001$ ). Analogamente, si osserva un effetto di opposta trasmissione allelica anche nell'analisi TDT effettuata in base alla genitura: mentre i figli primogeniti affetti tendono ad ereditare l'allele I dai genitori, con valori estremamente significativi nel gruppo nsUCL/P (T/NT = 39/18;  $P_{TDT}=0,005$ ), nel caso di figli non primogeniti è possibile osservare un *trend* di minor trasmissione dell'allele variante.

Il calcolo dei rischi relativi legati ai genotipi materni e del figlio affetto è stato eseguito tramite analisi log-lineare, seguendo un modello codominante (che considera come genotipo di rischio sia DI che II). I genotipi materni non sono risultati rilevanti e sono dunque stati esclusi dalle successive analisi. L'analisi del rischio relativo dei figli affetti ha invece evidenziato la presenza di associazione a rischio in doppia dose, ovvero in presenza di genotipo omozigote per la variante in analisi (genotipo II), con valori significativi solo nel caso delle schisi unilaterali del labbro con o senza schisi del palato (RR = 2,39; 95% CI: 1,15-4,97;  $P=0,019$ ).

Un successivo calcolo dei rischi relativi legato al genotipo dei soli figli affetti considerando un modello recessivo (II come unico genotipo di rischio, confrontato con DI+DD) ha confermato l'associazione tra inserzione 14bp e il rischio di sviluppare nsCL/P (RR = 1,72; 95% CI: 1,02-2,90;  $P=0,041$ ); tale associazione emerge in maniera estremamente significativa nel caso delle forme di nsUCL/P (RR = 2,72; 1,59-4,63;  $P<0,001$ ). L'allele contenente l'inserzione tende dunque a segregare con i fenotipi di schisi unilaterali, nelle quali il rischio relativo è il doppio rispetto a quanto si osserva nei casi bilaterali (RR = 0,55; 95% CI: 0,23-1,45;  $P=0,226$ ) (Grafico 7).



**Grafico 7: Rischi relativi del genotipo II di figli affetti considerando un modello recessivo.** Valori significativi segnati in rosso.

Considerando i dati ottenuti, le successive analisi gene-ambiente (GEI) sono state condotte seguendo un modello esclusivamente recessivo, ed escludendo il gruppo dei nsCP.

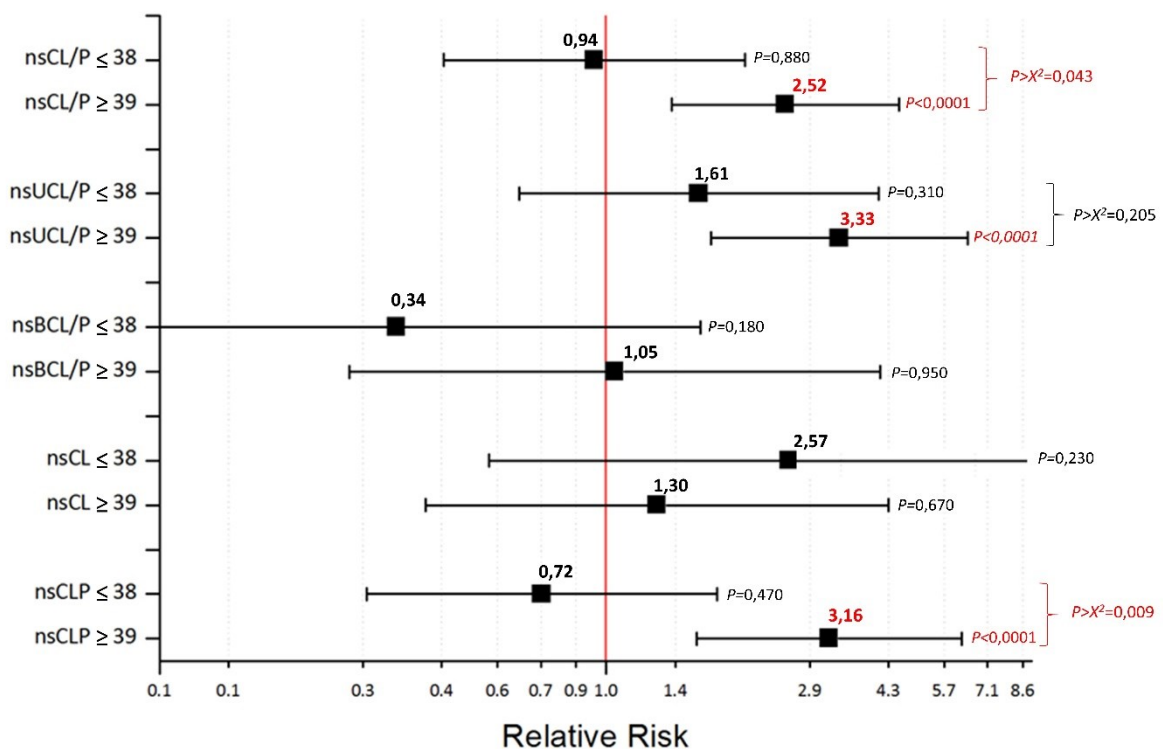
L'analisi GEI relativa al genere del probando non ha riportato alcuna differenza significativa nell'associazione a rischio di schisi tra sesso maschile e femminile. Allo stesso modo, anche l'analisi inerente l'esposizione materna al fumo di sigaretta non ha mostrato differenze significative dell'associazione a rischio. Per quanto riguarda l'analisi dell'assunzione di acido folico nel periodo peri-concenzionale, è stato necessario dividere l'analisi in tre distinti *step*, poiché la regressione log-lineare considera casistiche dicotomiche, mentre per quanto concerne la

supplementazione di AF la casistica ITALCLEFT è stata suddivisa in tre gruppi: assunzione di acido folico pre-concezionale, post-concezionale e mancata assunzione di acido folico. Abbiamo quindi effettuato il calcolo del RR confrontando:

- 1) Mancata assunzione con assunzione pre e post concezionale (noFA vs preFA+posFA)
- 2) Assunzione pre-concezionale con assunzione post-concezionale e mancata assunzione (preFA vs postFA+noFA)
- 3) Assunzione post-concezionale con assunzione pre-concezionale e mancata assunzione (postFA vs preFA+noFA).

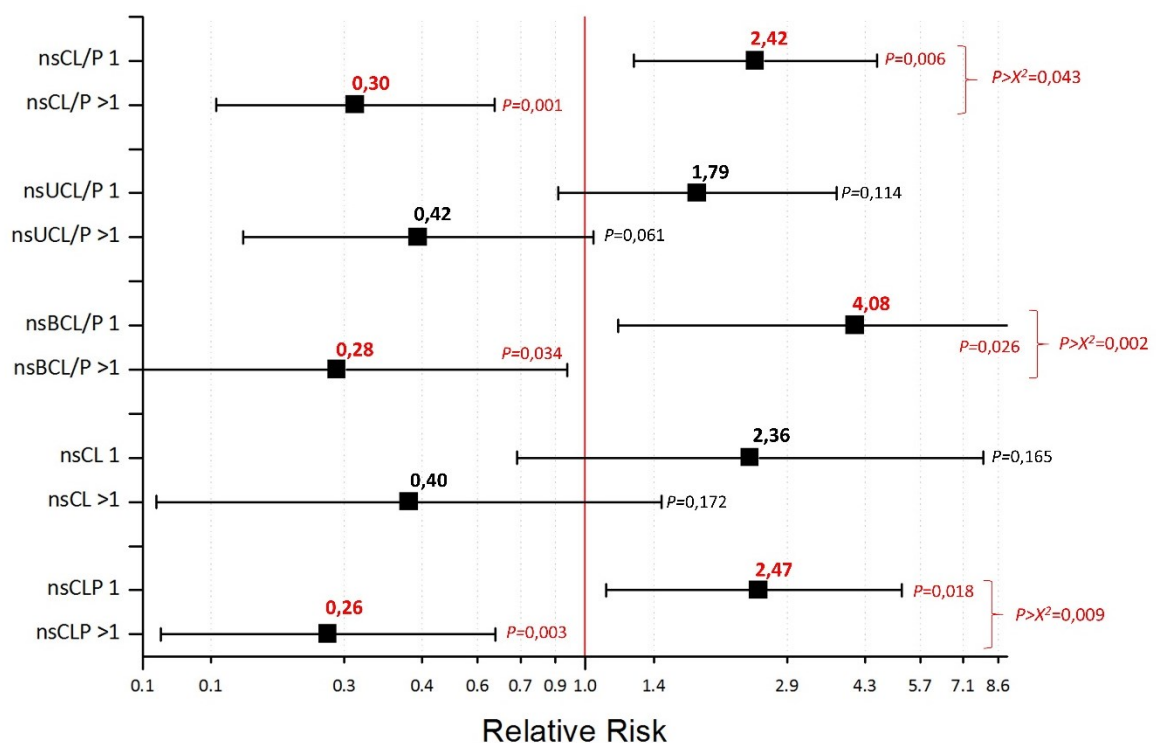
Anche in questo caso, nessuno dei tre *step* ha mostrato valori significativi di associazione della variante 14bp con supplementazione di acido folico.

L'analisi GEI inerente la lunghezza della gravidanza ha invece confermato i risultati ottenuti dall'analisi TDT (Grafico 8): l'associazione tra il genotipo II e nsCL/P si manifesta in maniera esclusiva in soggetti nati da gravidanze di durata maggiore o uguale alle 39 settimane (RR = 2.52; 95% CI: 1,40-4,52;  $P < 0,0001$ ), con un effetto specifico per le forme più gravi di schisi (nsCLP), in cui il RR sale a 3,16 (95% CI: 1,59-6,26;  $P = 0,009$ ): la differenza di RR tra nati a termine e nati pretermine assume inoltre un valore significativo  $P > X^2 = 0,009$ .



**Grafico 8: Rischi relativi legati al genotipo II di figli affetti in relazione alla lunghezza della gravidanza.** ≤38 – gravidanza inferiore a 39 settimane. ≥39 - gravidanza superiore a 38 settimane. Valori significativi in rosso.

L'analisi GEI dei RR considerando la genitura risulta in un'evidente associazione opposta a rischio a seconda che il probando sia o meno primogenito, confermando nuovamente i dati ottenuti dall'analisi TDT: l'associazione tra il genotipo II e rischio di nsCL/P appare infatti correlata esclusivamente ai casi di primogenitura, con un rischio pari a 2,42 (95% CI: 1,28-4,56;  $P=0,006$ ) mentre nei casi in cui il probando non corrisponde al primogenito si osserva un'associazione inversa al rischio (RR = 0,30; 95% CI: 0,14-0,60;  $P=0,001$ ). In aggiunta, l'effetto appare tanto più evidente nelle forme più gravi di schisi, tra cui nuovamente le nsCLP, dove l'associazione a rischio relativa ai primogeniti corrisponde ad un valore RR =2,47 (95% CI: 1,12-5,20;  $P=0,018$ ) e nei non primogeniti a RR=0,26 (95% CI:0,11-0,63;  $P=0,003$ ), con differenza significativa  $P>\chi^2=0,009$ .



**Grafico 9: rischi relativi legati al genotipo II di figli affetti in relazione alla genitura.** 1- probando primogenito. >1 – probando non primogenito. Valori significativi segnati in rosso.

In base a tali dati, sorge il dubbio che lunghezza della gravidanza e genitura del probando possano essere parametri correlati all'interno della popolazione oggetto del nostro studio. Per valutare la presenza di un eventuale relazione tra le due condizioni, è stato effettuato il calcolo dell'Odds Ratio (OR) considerando:

- numero di probandi primogeniti nati pretermine = 45
- numero di probandi primogeniti nati a termine = 75
- numero di probandi non primogeniti nati pretermine = 21
- numero di probandi non primogeniti nati a termine =44

La proporzione tra primogeniti nati pretermine/nati a termine risulta  $=45/(45+75) = 0,38$  (ossia il 38% dei primogeniti nasce pretermine).

La proporzione tra non primogeniti nati pretermine/nati a termine risulta  $= 21/(44+21) = 0,32$  (ossia il 32% dei non primogeniti nasce pretermine).

Da cui si ricava un valore OR = 1.26 (95% CI: 0.66-2.38;  $P>0,05$ ).

Tale valore non supporta l'esistenza di una correlazione intrinseca tra genitura e lunghezza della gravidanza, e porta a supporre che entrambi i fattori siano legati ad interazione con il genotipo II di HLA-G 14bp del/ins.

Nei casi di nsCLP si osservano i valori più significativi: associazione del genotipo omozigote II a rischio pari a 3,1 in caso di gravidanza con lunghezza superiore alle 38 settimane e, contemporaneamente, un'associazione a rischio pari a 2,47 nel caso di probando primogenito.

Per valutare la natura dell'interazione dei due parametri in presenza della variante HLA-G 14bp ins, abbiamo effettuato due nuove analisi TDT ristrette al gruppo di triadi con figli affetti da nsCLP. Nel primo caso, convenzionalmente nominato "AND", abbiamo considerato il livello di trasmissione della variante dai genitori ai figli affetti suddividendo la casistica fra triadi con probandi presentanti entrambe le condizioni in esame (primogeniti nati a termine, tot. 36) e le altre tipologie di triade (con figli primogeniti nati pretermine + figli non primogeniti nati pretermine + figli non primogeniti nati a termine, tot 73). Nel secondo caso, convenzionalmente nominato "OR", abbiamo considerato il livello di trasmissione della variante suddividendo la casistica fra triadi con almeno una delle due condizioni in esame (figli primogeniti nati a termine + figli primogeniti nati pretermine + figli non primogeniti nati a termine, tot 90) e triadi dove non vi è presenza di nessuna delle varianti in esame (figli non primogeniti nati pretermine, tot 19).

**Tabella 17: analisi TDT per HLA-G 14bp ins ristretta al gruppo nsCLP in relazione ai parametri della gravidanza (lunghezza gravidanza e genitura).**

		nsCLP			
		T	NT	$\chi^2$	$P_{TDT}$
<b>"AND"</b>	+	28	11	7,41	0,006
	-	34	30	0,25	0,617
<b>"OR"</b>	+	58	30	8,91	0,003
	-	4	11	3,27	0,071

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele I viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele I non viene trasmesso al figlio affetto). "AND" – presenza di entrambe le condizioni considerate di rischio (primogenitura e gravidanza a termine). "OR" – presenza di almeno una delle due condizioni considerate di rischio (primogenitura e gravidanza a termine). P-values significativi segnati in rosso.

L'analisi TDT mostra come i livelli di trasmissione dell'allele variante non siano particolarmente diversi tra i due sistemi di dicotomizzazione della casistica; i valori più significativi si osservano nel caso "OR", ovvero considerando la presenza di almeno una delle due condizioni correlate alla gravidanza in esame; inoltre, nel gruppo "-" del caso "OR" (ovvero nelle triadi in cui il probando non è primogenito ed è nato prematuramente) si assiste nuovamente ad una minore trasmissione dell'allele I rispetto all'allele D (sebbene la trasmissione non sia significativa, probabilmente per causa del basso numero di casi in esame). Non si assiste dunque ad un effetto additivo in presenza delle due condizioni di rischio della gravidanza, ma ad un effetto presumibilmente di ridondanza.

La genotipizzazione della casistica ITALCLEFT per il secondo SNP, +3142C>G, è stata realizzata tramite l'uso di un saggio di discriminazione allelica *custom* (TaqMan SNP genotyping Assay). Le triadi con genotipo incompleto sono state eliminate dallo studio, e 167 triadi sono risultate informative per gli studi di associazione (Tabella 18). Le frequenze genotipiche sono risultate pari al 18% per il genotipo CC, al 51% per il genotipo CG e al 31% per il genotipo omozigote variante GG. Le frequenze alleliche corrispondono al 56% per l'allele maggiore C, e al 44% per l'allele variante G, senza differenze significative nelle frequenze alleliche tra genitori e figli affetti. Il calcolo del Chi quadro (con correzione di Yate) ha mostrato che la popolazione non si discosta dall'equilibrio di Hardy Weinberg.

**Tabella 18: Triadi genotipizzate per la variante HLA-G +3142C>G informative per le analisi di associazione *family-based*.**

nsOFC	nsCL/P	nsUCL/P	nsBCL/P	nsCL	nsCLP	nsCP
167	125	63	16	48	77	42

Il calcolo del TDT è risultato in un rapporto T/NT = 92/75 ( $P_{TDT}=0,188$ ) per le nsOFCs in generale, e non ha evidenziato alcuna over-trasmissione allelica nemmeno nei diversi fenotipi di schisi; il polimorfismo +3142C>G è stato dunque escluso dallo studio.

### 4.1.3. Ricerca di varianti funzionali nell'intorno del gene *GREM1*

Il gene *gremlin1* (*GREM1*), localizzato sul cromosoma 15q13.3 e codificante una glicoproteina antagonista delle BMPs, è considerato un promettente gene candidato nello studio dell'eziologia delle nsOFCs. In particolare, il recente studio GWA di Mangold e colleghi (2010) ha mostrato l'associazione dello SNP rs1258763 (G>A) a rischio di nsCL/P e un recente lavoro di replicazione realizzato da Ludwig e colleghi (Ludwig et al. 2014) ha confermato la forte associazione di questo polimorfismo a nsCL/P nella popolazione europea.

L'analisi predittiva del legame di fattori di trascrizione in presenza dell'allele di rischio di rs1258763 non mostra alcuna alterazione nel legame di fattori di trascrizione noti per coinvolgimento nello sviluppo delle schisi. Lo SNP rs1258763 è localizzato all'interno di un'isola di disequilibrio (LD *block*) di 17 kb (identificata tramite il software *Haploview*); queste osservazioni portano a ipotizzare che lo SNP rs1258763 costituisca in realtà un *marker* trasmesso in forte *linkage* con un'altra variante dotata di attività funzionale e coinvolta nella patogenesi delle schisi.

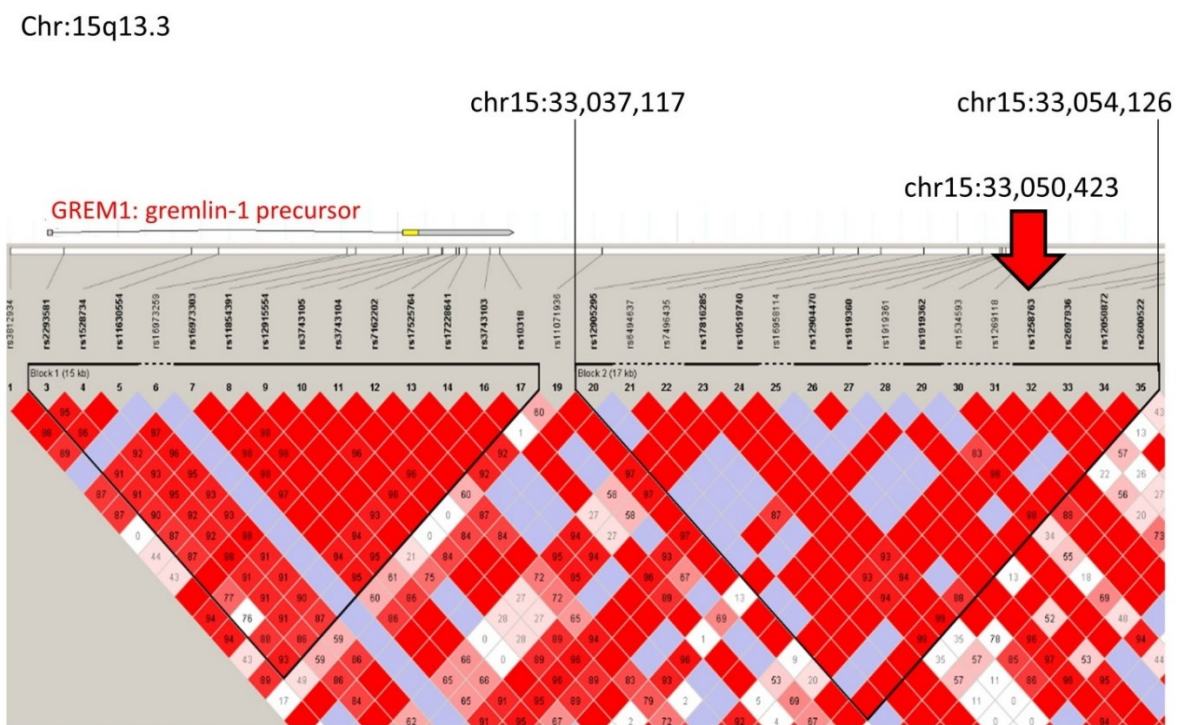
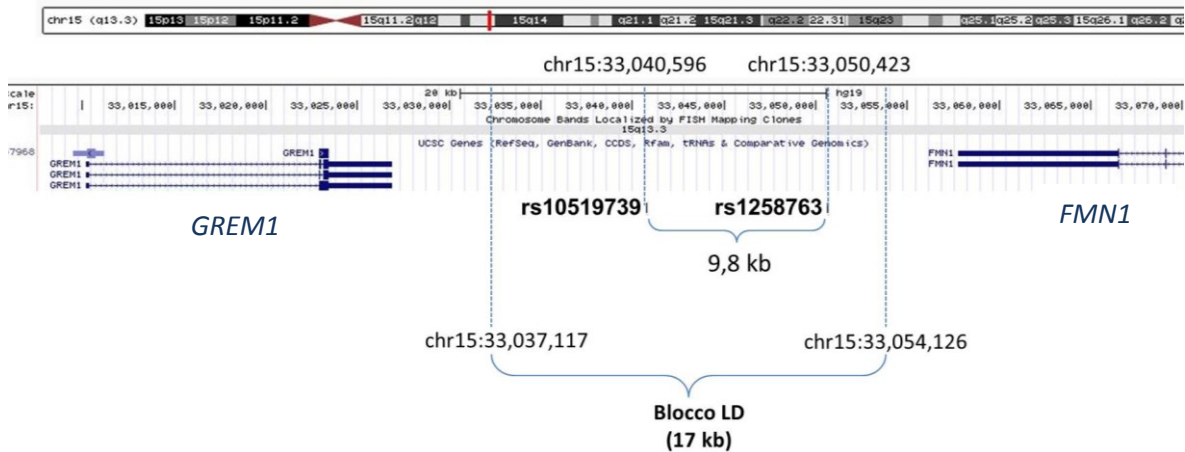


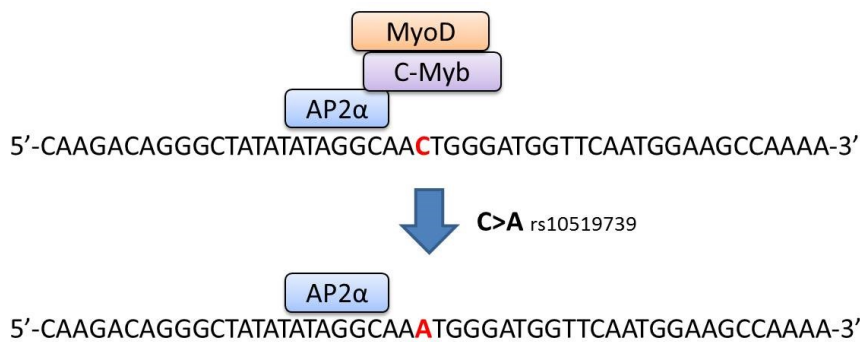
Figura 32: Isola di disequilibrio di 17 kb all'interno del quale si trova lo SNP rs1258763, a valle del gene *GREM1*. Immagine ottenuta utilizzando il software *Haploview*.

Abbiamo dunque investigato tramite approccio bioinformatico (utilizzando il *tool* informatico *Genome Browser*) le regioni conservate (*multispecies conserved sequences*, MCSs) interne all'isola di disequilibrio di 17 kb, identificando un nuovo SNP, rs10519739 (C>A), localizzato 9,8 kb a monte di rs1258763 (Figura 33).



**Figura 33:** Localizzazione dello SNP rs10519739 9,8 kb a monte di rs1258763; entrambi gli SNP si trovano all'interno dell'isola di disequilibrio di 17 kb, tra i geni *GREM1* e *FMN1*.

L'analisi predittiva del legame di fattori di trascrizione (effettuata utilizzando il programma ALGEN – PROMO 3.0) mostra che l'allele minore di rs10519739 cancella un sito di legame per il fattore di trascrizione MyoD ed uno per c-Myb (Figura 34). C-Myb è un fattore di trascrizione correlato al controllo della proliferazione, al differenziamento e alla sopravvivenza cellulare, ed è associato con la regolazione delle cellule staminali (Ramsay et al. 1992; Oh & Reddy 1999; Cheasley et al. 2011). In più, c-Myb modula l'espressione di alcuni geni associati a nsCL/P, tra cui *MSX1* (Karafiati et al. 2005; Zhang et al. 2002) e *PAX7* (Vadasz et al. 2013), durante lo sviluppo della cresta neurale.



**Figura 34:** rappresentazione grafica dell'alterazione del legame dei fattori di trascrizione c-Myb e MyoD in presenza dell'allele minore di rs10519739.



L'attività putativamente funzionale dell'allele minore di questo SNP, che potrebbe influenzare la regolazione del gene *GREM1*, lo rende un eccellente candidato come possibile nuova variante di rischio per nsOFC, esplicativa dell'associazione del *marker* rs1258769 a rischio di schisi non sindromiche.

Abbiamo dunque condotto studi di associazione *family-based* genotipici e aplotipici utilizzando la casistica del progetto EUROCRAN, ossia la medesima casistica utilizzata dal gruppo di Mangold e colleghi (in collaborazione con il nostro gruppo di ricerca) nella realizzazione dello studio GWA che ha portato all'identificazione di rs1258769 tramite genotipizzazione mediante l'utilizzo di spettrometria di massa MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) (Sequenome Inc.); la genotipizzazione del nuovo SNP rs10519739 è stata invece realizzata sulle casistiche EUROCRAN e ITALCLEFT tramite l'uso di un saggio di discriminazione allelica (TaqMan SNP genotyping Assay). Lo studio di rs1258763 consiste quindi in un'estensione dell'analisi effettuata precedentemente in collaborazione con il gruppo di Mangold, nella quale i risultati di associazione non erano stati stratificati in base a fenotipo clinico e genere del figlio affetto.

La tabella sottostante mostra il numero di triadi appartenenti alla casistica del progetto EUROCRAN genotipizzate per i due diversi SNPs, suddivise in base al fenotipo di schisi. Le percentuali ottenute dalla stratificazione fenotipica sono estremamente simili per i due diversi SNPs.

**Tabella 19: Numero di triadi genitori-figlio affetto incluse nello studio.**

	nsOFC (%)	nsCL/P (%)	nsCL (%)	nsCLP (%)	nsCP (%)
<b>rs1258763</b>	542	396 (73%)	143 (26%)	253 (47%)	129 (24%)
<b>rs10519739</b>	880	614 (70%)	225 (26%)	390 (44%)	233 (26%)

La frequenza dell'allele minore per rs10519739 (A) è stata osservata pari a 2,73%, senza differenze di frequenza significative tra genitori (2,97%) e figli affetti (2,19%). Una frequenza dell'allele minore così bassa si riflette sulle frequenze genotipiche, che risultano pari a 94,7 % per il genotipo CC, 5,2 % per AC e solo 0,1% per il genotipo omozigote variante AA (con percentuali simili considerando separatamente frequenze di genitori e figli). Il basso numero di genotipi eterozigoti e omozigoti per la variante riduce notevolmente il numero di triadi informative per gli studi di associazione, che sono risultate solamente 92 (Tabella 20).

**Tabella 20: Triadi informative per le analisi di associazione family-based della variante rs10519739.**

nsOFC	nsCL/P	nsUCL/P	nsBCL/P	nsCL	nsCLP	nsCP
92	66	23	7	24	42	26

Il numero ridotto di triadi utilizzabili per il calcolo del TDT di rs10519739 rappresenta quindi una conseguenza della bassa frequenza dell'allele variante, che rende più difficoltoso ottenere risultati statisticamente significativi, nonostante l'ampiezza della casistica utilizzata nello studio

Tabella 21: analisi TDT per rs1258763 e rs10519739, stratificati in base al fenotipo di *cleft* e al genere del probando.

	rs1258763 G>A			rs10519739 C>A		
	T	NT	$P_{TDT}$	T	NT	$P_{TDT}$
<b>nsOFC</b>	<b>287</b>	<b>187</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>32</b>	<b>60</b>	<b>0,004</b>
<i>maschi</i>	116	89	0,059	<b>17</b>	<b>34</b>	<b>0,017</b>
<i>femmine</i>	<b>171</b>	<b>98</b>	<b>&lt;0,001</b>	15	25	0,114
<b>nsCL/P</b>	<b>225</b>	<b>140</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>25</b>	<b>41</b>	<b>0,049</b>
<i>maschi</i>	79	60	0,107	<b>13</b>	<b>27</b>	<b>0,027</b>
<i>femmine</i>	<b>146</b>	<b>80</b>	<b>&lt;0,001</b>	12	14	0,695
<b>nsCL</b>	<b>78</b>	<b>52</b>	<b>0,023</b>	<b>7</b>	<b>17</b>	<b>0,041</b>
<i>maschi</i>	27	18	0,180	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>0,046</b>
<i>femmine</i>	51	34	0,065	3	5	0,480
<b>nsCLP</b>	<b>147</b>	<b>88</b>	<b>&lt;0,001</b>	18	24	0,355
<i>maschi</i>	52	42	0,302	9	15	0,221
<i>femmine</i>	<b>95</b>	<b>46</b>	<b>&lt;0,001</b>	9	9	1,000
<b>nsCP</b>	62	47	0,151	<b>7</b>	<b>19</b>	<b>0,019</b>
<i>maschi</i>	37	29	0,325	4	7	0,366
<i>femmine</i>	25	18	0,286	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>0,033</b>

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele minore viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele minore non viene trasmesso al figlio affetto).  $P$ -values significativi segnati in rosso.

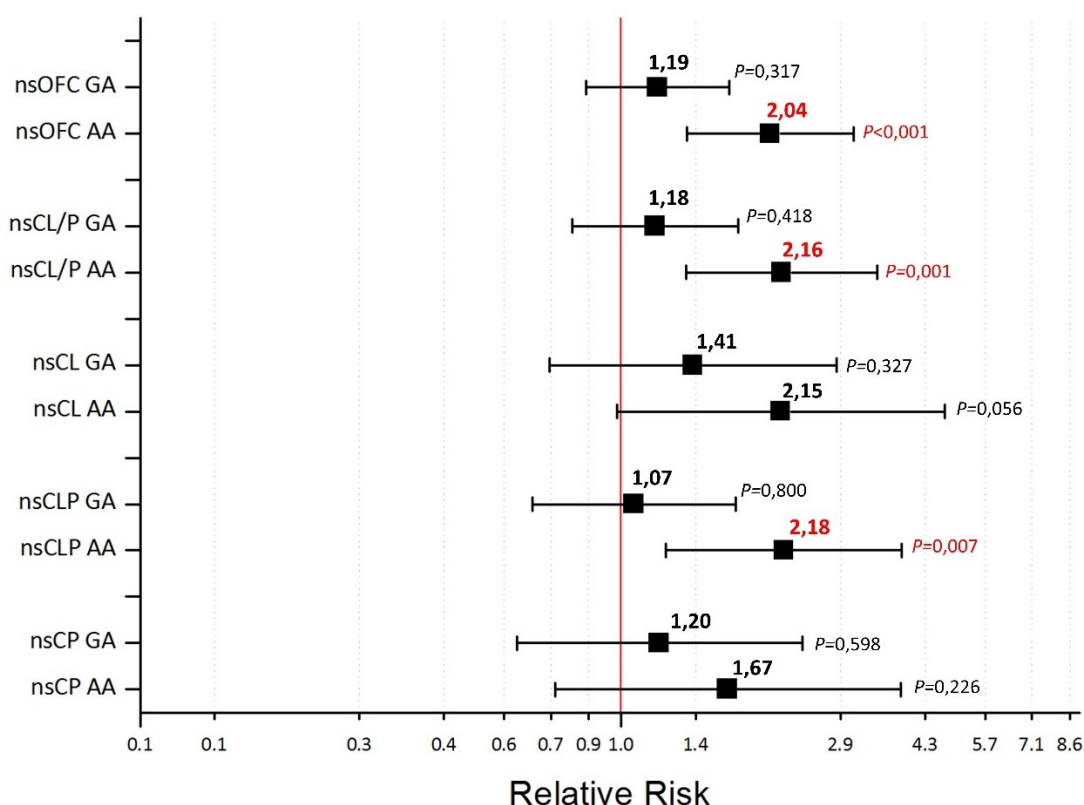
L'estensione dell'analisi effettuata sullo SNP rs1258763 conferma la forte associazione dell'allele variante a rischio di OFC (T/NT = 287/187;  $P_{TDT}<0,001$ ) sottolineando la presenza di over-trasmissione dell'allele variante dai genitori al figlio affetto nei sottogruppi fenotipici nsCL/P (T/NT = 225/140;  $P_{TDT}<0,001$ ), nsCL (T/NT = 78/54;  $P_{TDT}<0,001$ ) e nsCLP (T/NT = 147/88;  $P_{TDT}<0,001$ ); nessuna associazione è invece stata identificata nei confronti di nsCP.

L'analisi TDT di rs10519739 mostra invece una significativa minor trasmissione dell'allele minore dai genitori ai figli affetti (T/NT = 32/60;  $P_{TDT}=0,004$ ). Stratificando in base al fenotipo clinico si osservano valori significativi per nsCL/P (T/NT = 25/41;  $P_{TDT}=0,049$ ), nsCL (T/NT = 7/17;  $P_{TDT}=0,041$ ) e per nsCP (T/NT = 7/19;  $P_{TDT}=0,019$ ), mentre non risultano significativi per nsCLP. Mentre nei casi di nsCL/P e nsCL l'effetto è visibile solo nei maschi, nel gruppo di nsCP la minor trasmissione acquista valore significativo all'interno del gruppo con i probandi di genere femminile (T/NT = 3/11;  $P_{TDT}=0,033$ ).

Nessuno dei due SNPs ha mostrato valori significativi nelle stratificazioni in base ad assunzione di acido folico e esposizione a fumo di sigaretta.

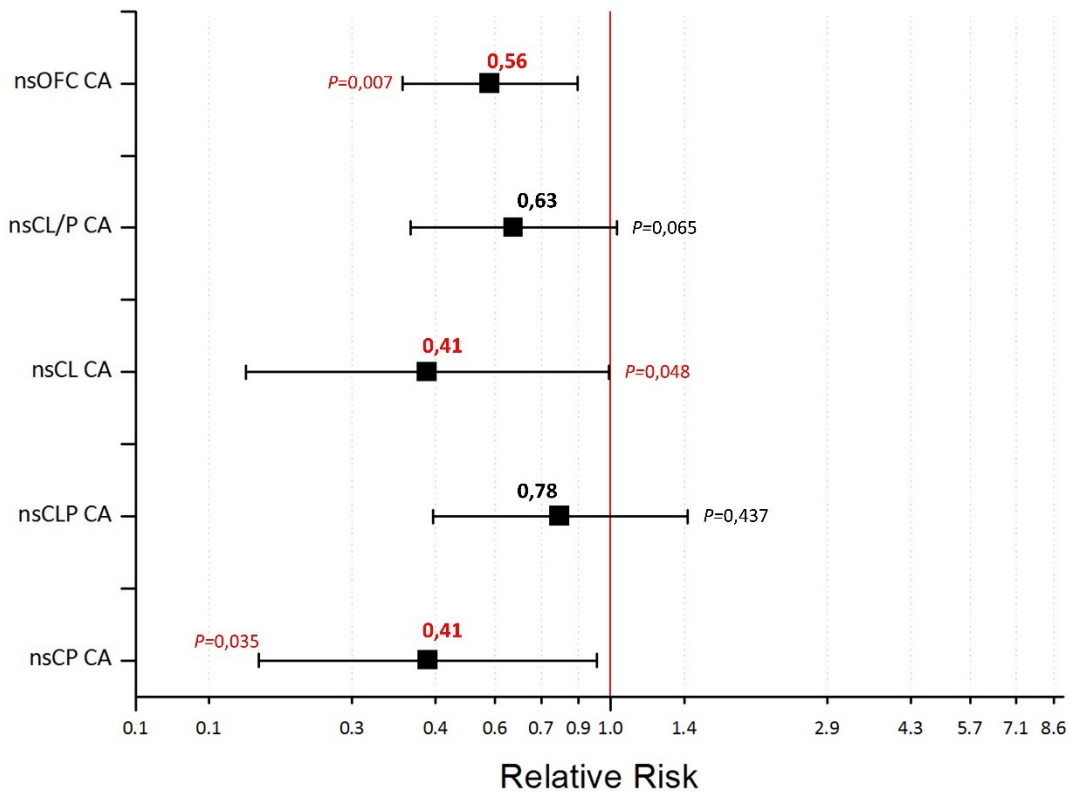
I rischi relativi (*relative risk*, RR) sono stati calcolati considerando un modello dose-dipendente.

Il rischio relativo per rs1258763, mostrato nel Grafico 10, risulta significativo solo in presenza di genotipo omozigote (RR<sub>hom</sub>); considerando la totalità delle schisi, il RR<sub>hom</sub> è stato calcolato pari a 2,04 (95% CI: 1,37-3,05;  $P < 0,001$ ). L'unico fenotipo per il quale non è stata evidenziata associazione significativa a rischio corrisponde al gruppo dei nsCP, confermando i dati ottenuti nel calcolo del TDT.



**Grafico 10: Rischio Relativo dell'allele variante A di rs1258763 considerando un modello dose-dipendente.** Singola-dose: rischio dell'eterozigote (RR<sub>het</sub>): figlio affetto con genotipo GA. Doppia-dose: rischio dell'omozigote (RR<sub>hom</sub>): figlio affetto con genotipo AA. *P-value* significativi in rosso.

Il rischio relativo di rs10519739 (Grafico 11) è stato calcolato solamente in singola dose (RR<sub>het</sub>) a causa del numero troppo basso di figli con genotipo omozigote (conseguenza della bassa MAF dello SNP). Il rischio per la totalità delle schisi è risultato pari a 0,56 (95% CI: 0,37-0,85;  $P=0,007$ ), confermando l'associazione inversa dell'allele variante A osservata anche in analisi TDT. Il gruppo nsCLP non mostra alcuna associazione significativa, mentre si osservano valori significativi per nsCL (RR<sub>het</sub> = 0,41; 95% CI: 0,17-0,99;  $P = 0,048$ ) e nsCP (RR = 0,41; 95% CI: 0,18-0,94;  $P = 0,035$ ). Non sono state evidenziate differenze nell'associazione a rischio tra maschi e femmine per nessuno dei due SNP.



**Grafico 11: Rischio Relativo dell'allele variante A di rs10519739 considerando un modello dose-dipendente in singola dose ( $RR_{net}$ ) (figlio affetto con genotipo AC). Valori significativi segnati in rosso.**

Abbiamo quindi analizzato l'aplotipo composto dai due SNPs (rs10519739-rs1258763); le frequenze aplotipiche all'interno della nostra popolazione sono state osservate pari al 29,1% per C-G (aplotipo 1\*), 0,2% per A-G (aplotipo 2\*), 68,2% per C-A (aplotipo 3\*) e 2,5% per A-A (aplotipo 4\*). Le analisi di associazione sono state effettuate per i due aplotipi di interesse 3\* e 4\*. L'analisi TDT è mostrata in tabella 22. L'aplotipo 3\*, contenente l'allele di rischio per rs1258763, mostra over-trasmissione in tutti i sottotipi di *cleft*. Il rischio aplotipico (Grafico 12) conferma l'associazione dell'aplotipo 3\* in doppia dose, con rischio per nsOFC ( $RR=2,29$ ; 95% CI:1,53-3,42;  $P<1\times 10^{-3}$ ), nsCL/P ( $RR=2,41$ ; 95% CI:1,50-3,87;  $P<1\times 10^{-3}$ ), e un rischio particolarmente elevato per nsCL ( $RR=3,72$ ; 95% CI: 1,55-8,96;  $P=0,019$ ). Il calcolo del RR secondo un modello recessivo (non mostrato) non altera i valori di RR, ma ne aumenta la significatività statistica.

L'aplotipo 4\*, contenente entrambe le varianti alleliche dei due SNPs, è piuttosto raro a causa della bassa MAF di rs10519739. L'analisi TDT non mostra alcun *P-value* significativo, ma è comunque possibile osservare un *trend* di minor trasmissione dell'aplotipo 4\* da parte dei genitori ai figli affetti nsCL e nsCP. Il RR aplotipico, mostrato in Grafico 13, conferma il *trend* di associazione inversa dell'aplotipo 4\* in singola dose (il numero di figli affetti omozigoti per l'aplotipo 4\* non risulta sufficiente per calcolare il RR in doppia dose) per nsCL ( $RR=0,5$ ; 95% CI: 0,15-1,66;  $P=0,258$ ) e ns CP ( $RR=0,28$ ; 95% CI: 0,08-1,00;  $P=0,049$ ).

Tabella 22: TDT analisi per gli aplotipi 2-SNPs (rs10519739 and rs1258763).

	rs10519739-rs1258763	T	NT	$P_{TDT}$
nsOFC	3* (C-A)	276	168	<b><math>2,97 \times 10^{-07}</math></b>
	4* (A-A)	21	31	0,166
nsCL/P	3* (C-A)	213	128	<b><math>4,16 \times 10^{-06}</math></b>
	4* (A-A)	18	20	0,746
nsCL	3* (C-A)	80	42	<b>0,001</b>
	4* (A-A)	4	8	0,248
nsCLP	3* (C-A)	133	86	<b>0,001</b>
	4* (A-A)	14	12	0,695
nsCP	3* (C-A)	85	57	<b>0,019</b>
	4* (A-A)	9	7	0,617

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l’aplotipo considerato viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l’aplotipo considerato non viene trasmesso al figlio affetto).  $P$ -values significativi segnati in rosso.

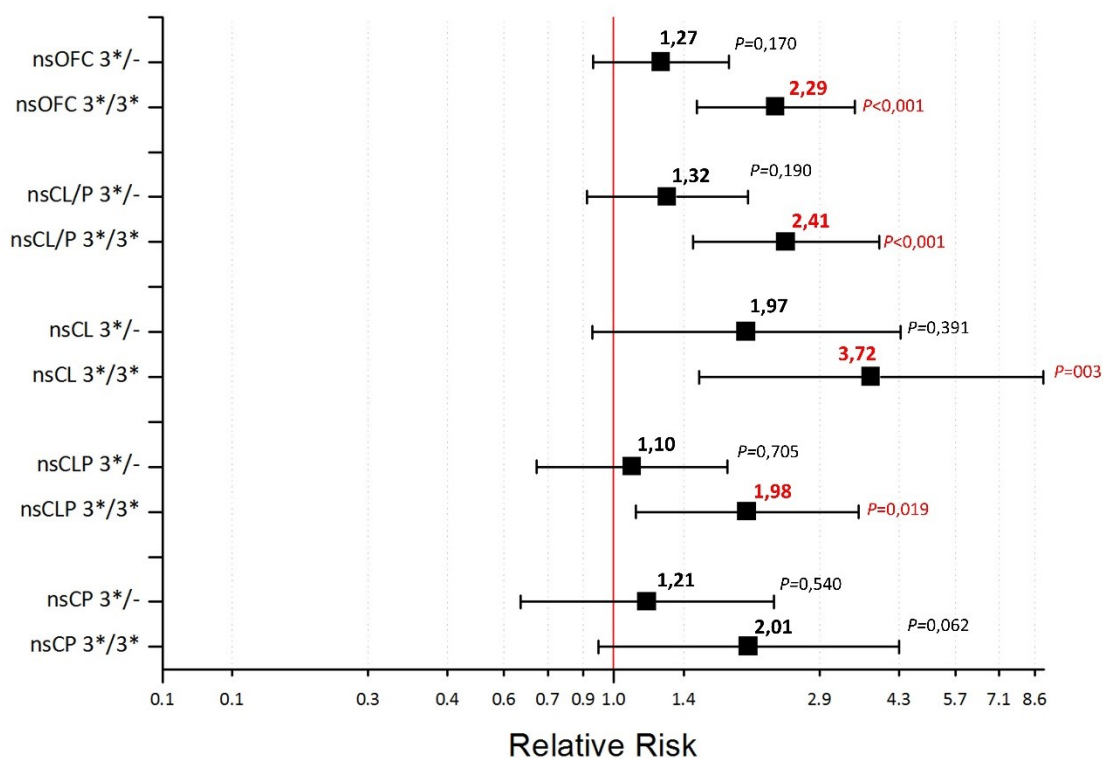
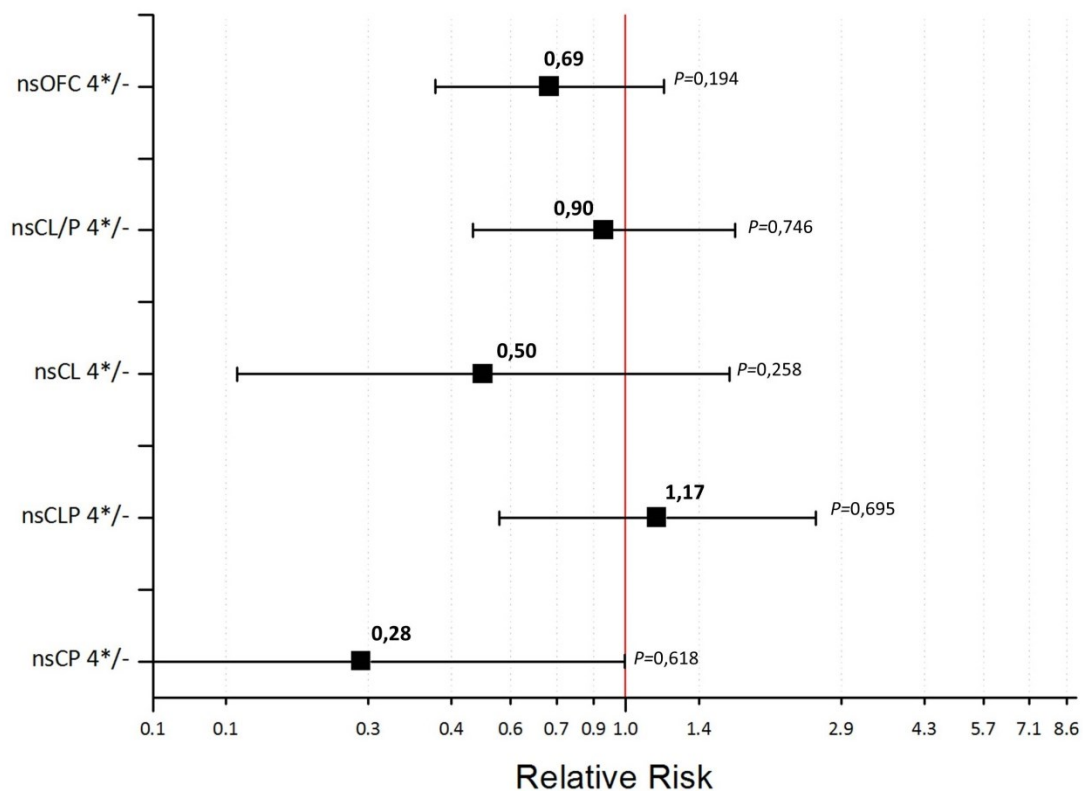


Grafico 12: Rischio Relativo dell’aplotipo 3\* (C-A) considerando un modello dose-dipendente in singola dose ( $RR_{net}$  figlio affetto 3\*/-) e in doppia dose ( $RR_{hom}$  figlio affetto 3\*/3\*). Valori significativi in rosso.



**Grafico 13: Rischio Relativo dell'aplotipo 4\* (A-A) considerando un modello dose-dipendente in singola dose (RR<sub>net</sub> figlio affetto 3\*/-).** Valori significativi segnati in rosso.

Diversamente da quanto atteso, lo SNP rs10519739 non associa a rischio di schisi; al contrario, si osserva un'associazione inversa dell'allele minore A con nsCL e nsCP, pari a un rischio ridotto di sviluppo di questi due fenotipici clinici di *cleft*. La bassa frequenza allelica della variante di rs10519739 rende difficile ottenere dati statisticamente significativi, e il *trend* di associazione inversa mostrata da rs10519793 non è rilevante come il rischio di associazione di rs1258763. In base a tali evidenze, si è scelto di non procedere nell'esecuzione di saggi funzionali per verificare dell'attività putativamente funzionale di rs10519793 nei confronti del legame al fattore di trascrizione c-Myb, poiché si esclude il ruolo di quest'ultimo nello sviluppo delle comuni forme di schisi.

#### 4.1.4. Ricerca di varianti funzionali nell'intorno del gene IRF6

Lo SNP rs642961 individuato da Rahimov e colleghi nel 2008 è, ad oggi, l'unico polimorfismo associato a *cleft* di cui sia stata dimostrata attività funzionale. La sostituzione G>A determina l'eliminazione di un sito di legame per AP-2 $\alpha$ , fattore di trascrizione coinvolto in meccanismi di sviluppo e differenziazione cellulare; studi su modelli animali ne hanno mostrato il ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale ed è stato identificato come co-regolatore di geni *target* di p63 (fattore di trascrizione con importante ruolo nella regolazione di sviluppo e differenziazione degli epiteli; *IRF6* stesso rappresenta un *target* di p63) (McDade et al. 2012). E' estremamente probabile che addizionali varianti di rischio in *IRF6* possano incrementare il rischio di *cleft* indipendentemente o in sinergia con rs642961 (Rahimov et al. 2008).

Ipotizzando che il fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$  agisca su altri siti polimorfici interni ad *enhancer* nell'intorno di *IRF6* in relazione con rs642961, abbiamo analizzato un segmento genomico di 60Kb nella regione 1q32.3-q41 (che si estende attorno al gene *IRF6*) alla ricerca di nuove varianti che modificassero sequenze consenso AP-2 $\alpha$ .

La sequenza corrispondente alle coordinate chr1:208,012,403-208,069,615 (*Human Genome Browser database, release 13.0*), è stata separata in 60 sequenze da 110bp l'una. L'analisi predittiva del legame di fattori di trascrizione effettuata per ciascuna delle 60 sequenze ha identificato 375 siti consenso AP-2 $\alpha$ .

Un'analisi parallela delle sequenze utilizzando il database dbSNP (*release 130*) ha identificato 11 SNPs localizzati all'interno di 11 dei 375 siti consenso AP-2 $\alpha$ , in cui l'allele minore dello SNP andava ad alterare il legame del fattore di trascrizione alla sequenza (Tabella 23).

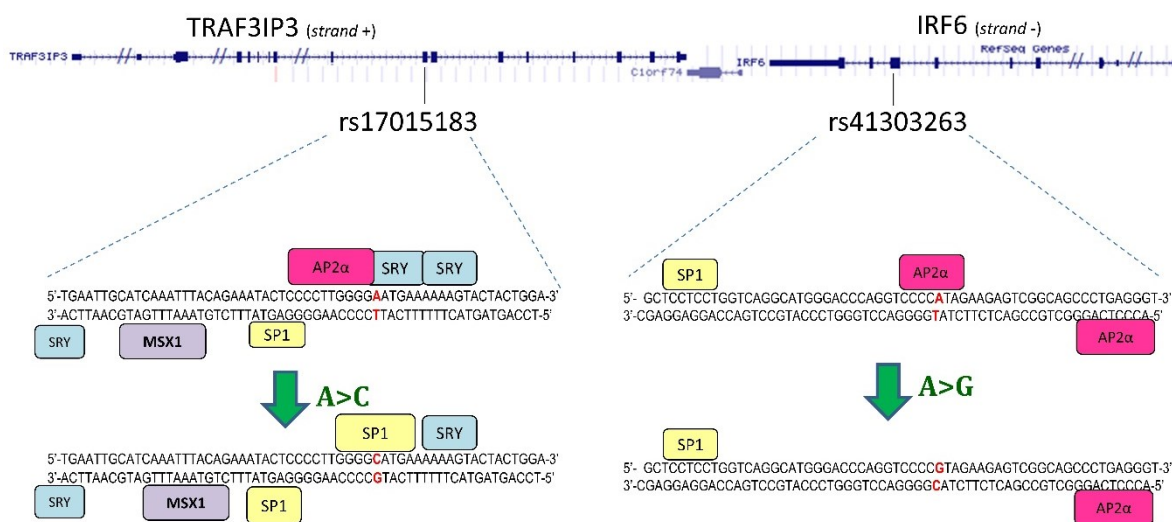
**Tabella 23: 11 SNPs identificati tramite analisi bioinformatica come collocati ciascuno all'interno di un sito di legame AP-2 $\alpha$ , localizzato nell'intorno di 60Kb del gene IRF6.**

Codice	Posizione	Strand	Osservato	Reference Allele	Funzione
<b>rs17015183</b>	chr1:209948711	+	A/C	A	<i>synonymus variant</i>
<b>rs61578995</b>	chr1:209952300	+	G/T	G	<i>intron variant</i>
<b>rs17015185</b>	chr1:209954345	+	C/T	T	<i>intron variant</i>
<b>rs4844899</b>	chr1:209961100	+	G/T	G	<i>3_prime_UTR_variant</i>
<b>rs41303263</b>	chr1:209964141	+	A/G	A	<i>synonymus variant</i>
<b>rs28942094</b>	chr1:209974743	-	C/T	C	<i>intron_variant</i>
<b>rs34088658</b>	chr1:209978921	+	-/G	-	<i>intron variant</i>
<b>rs10779514</b>	chr1:209987624	+	C/T	C	<i>unknown</i>
<b>rs598514</b>	chr1:209994715	+	C/T	C	<i>unknown</i>
<b>rs3215480</b>	chr1:210001126	+	-/C	C	<i>upstream_gene_variant</i>
<b>rs12404886</b>	chr1:210001543	+	A/T	A	<i>intron variant</i>

Tra questi 11 SNPs, solamente 2 sono stati selezionati poiché localizzati nel contesto di sequenze consenso complesse che, con alta probabilità, corrispondono ad elementi regolatori:

rs41303263 (A>G), variante sinonima localizzata nell'esone 6 di *IRF6*, 26bp a valle di un sito di legame per il fattore di trascrizione SP1 e 20bp a monte di un altro sito di legame AP-2 $\alpha$ .

rs17015183 (A>C), variante sinonima localizzata all'interno dell'esone 8 di *TRAF3IP3* (TRAF-interacting JNK-activating modulator), un gene che si trova 13Kb di distanza da *IRF6*. Lo SNP in esame è collocato a sole 4bp a monte di un altro AP-2 $\alpha$  binding site, 9bp a monte di un sito SP1 e 22bp a monte di un sito MSX1.



**Figura 35:** rappresentazione grafica dei due SNPs selezionati nell'intorno del gene *IRF6* e dell'alterazione del legame del fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$  in presenza dell'allele minore di entrambi gli SNPs. Siti putativi di binding identificati tramite analisi bioinformatica (TESS).

Secondo predizione bioinformatica gli alleli varianti di entrambi gli SNPs eliminano il legame putativo del fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$  (immagine X) e rappresentano dunque ottimi candidati a rischio di associazione per le schisi non sindromiche. Abbiamo genotipizzato la casistica del progetto EUROCRAN per entrambi gli SNPs (rs17015183 e rs41203263) e per rs642961, utilizzando un saggio di discriminazione allelica (TaqMan SNP genotyping Assay). Il numero di triadi appartenenti alla casistica del EUROCRAN che sono state genotipizzate per i diversi SNPs e che sono risultate informative per le analisi di associazione, è riportato in tabella 24.

**Tabella 24:** numero di triadi EUROCRAN genotipizzate rispettivamente per ciascuno SNP, suddivise per fenotipo di *cleft*.

	nsOFC (%)	nsCL/P (%)	nsCL (%)	nsCLP (%)	nsCP (%)
<b>rs642961</b>	620	469 (76%)	202 (28%)	268 (43%)	151 (24%)
<b>rs41303263</b>	96	91 (95%)	34 (35%)	57 (59%)	5 (5%)
<b>rs17015183</b>	266	199 (75%)	77 (38%)	122 (46%)	67 (25%)



La variante rs41303263 è risultata estremamente rara, con una frequenza dell'allele minore G minore dello 0,1%; una variante con frequenza così bassa non può essere considerata causale nell'ambito di una patologia ad alta frequenza, ed è stata dunque rimossa dallo studio. La frequenza dell'allele minore C di rs17015183 è invece risultata, all'interno della nostra casistica, pari al 12,5% (con frequenze simili tra genitori e figli); è quindi stata selezionata per analisi di associazione gene-candidato insieme a rs642961.

L'analisi TDT effettuata considerando la trasmissione dell'allele variante (rispettivamente A per rs642962 e C per rs17015183) dai genitori ai figli affetti, stratificando in base al genere del probando, è riportata in tabella 25.

**Tabella 25: analisi TDT per rs642961e rs17015183, stratificati in base al fenotipo di cleft e al genere del probando**

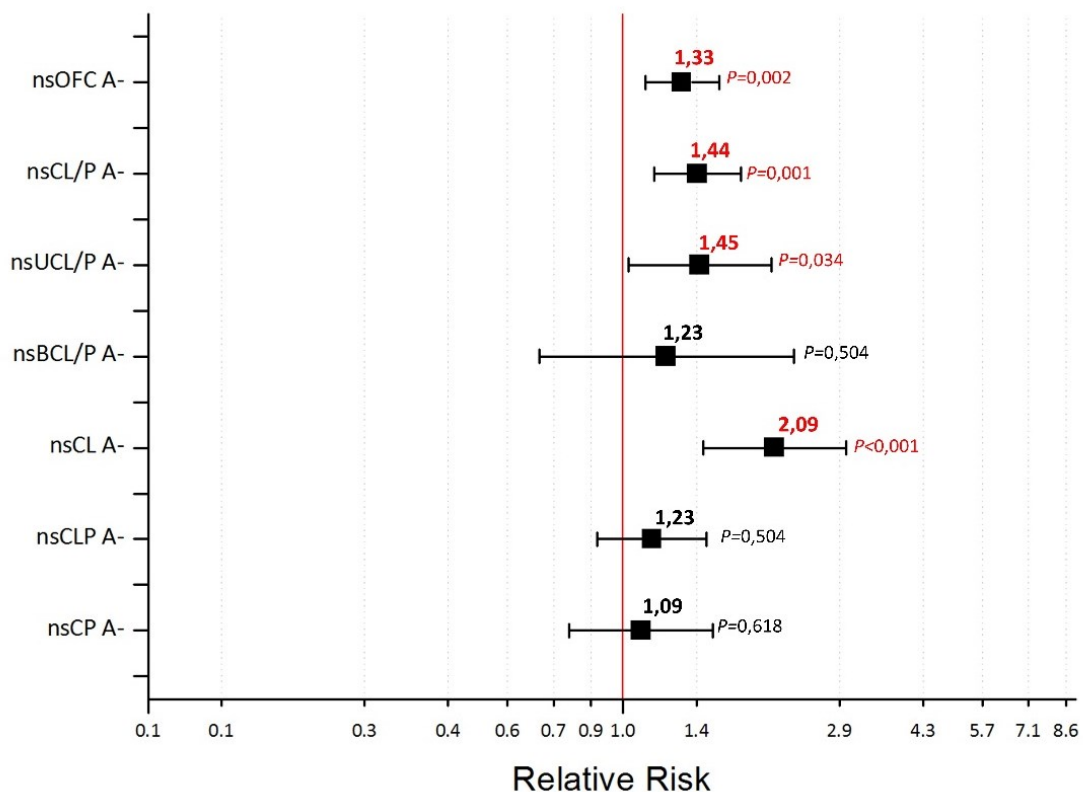
	rs642961			rs17015183		
	T	NT	$P_{TDT}$	T	NT	$P_{TDT}$
<b>nsOFC</b>	<b>347</b>	<b>273</b>	<b>0,003</b>	<b>96</b>	<b>170</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>maschi</i>	<b>209</b>	<b>155</b>	<b>0,005</b>	<b>53</b>	<b>89</b>	<b>0,003</b>
<i>femmine</i>	135	114	0,183	<b>41</b>	<b>76</b>	<b>0,001</b>
<b>nsCL/P</b>	<b>272</b>	<b>197</b>	<b>0,001</b>	<b>74</b>	<b>125</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>maschi</i>	<b>184</b>	<b>122</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>43</b>	<b>79</b>	<b>0,001</b>
<i>femmine</i>	86	74	0,343	29	45	0,063
<b>nsCL</b>	<b>129</b>	<b>73</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>25</b>	<b>52</b>	<b>0,002</b>
<i>maschi</i>	<b>88</b>	<b>44</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>13</b>	<b>33</b>	<b>0,003</b>
<i>femmine</i>	40	29	0,185	12	19	0,209
<b>nsCLP</b>	143	125	0,272	<b>49</b>	<b>73</b>	<b>0,03</b>
<i>maschi</i>	96	79	0,199	30	46	0,066
<i>femmine</i>	46	45	0,917	17	26	0,17
<b>nsCP</b>	75	76	0,935	<b>22</b>	<b>45</b>	<b>0,005</b>
<i>maschi</i>	24	32	0,285	9	10	0,819
<i>femmine</i>	48	40	0,394	<b>12</b>	<b>31</b>	<b>0,004</b>

T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele minore viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele minore non viene trasmesso al figlio affetto).  $P$ -values significativi segnati in rosso.

L'over-trasmissione dell'allele variante A di rs642961 da parte dei genitori a figli affetti per nsCL/P riportata da diversi studi in letteratura è stata confermata anche all'interno della nostra casistica (T/N = 272/197;  $P_{TDT}=0,001$ ), come anche la mancanza di associazione nei casi di nsCP. In particolare, si osserva una trasmissione estremamente significativa nei casi di nsCL (T/NT = 129/72;  $P_{TDT}<0,001$ ). La stratificazione per genere ha inoltre evidenziato una over-trasmissione significativa in caso di probando di sesso maschile, sia nel caso di nsCL/P (T/NT = 184/122;  $P_{TDT}<0,001$ ) che di nsCL (T/NT = 88/44;  $P_{TDT}<0,001$ ), che non si osserva invece all'interno del genere femminile.

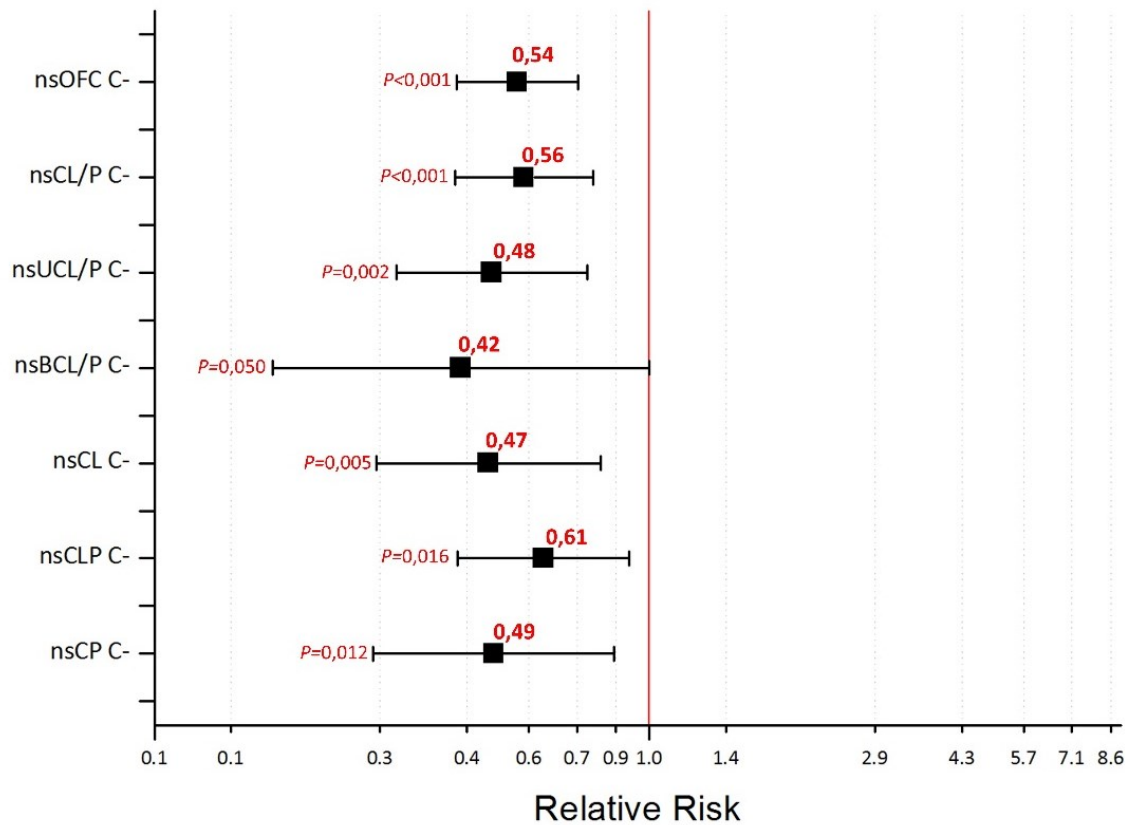
Al contrario, l'allele variante C di rs17015183 mostra una minor trasmissione dai genitori ai figli affetti di nsOFC rispetto all'allele maggiore A (T/NT = 96/170;  $P_{TDT}<0,001$ ); la minor trasmissione dell'allele variante è osservata in tutti i fenotipi di *cleft*, compreso il nsCP (T/NT = 22/45;  $P_{TDT}=0,005$ ), dove si osserva un'associazione estremamente significativa all'interno del genere femminile (T/NT = 12/31;  $P_{TDT}=0,004$ ).

L'analisi dei rischi relativi tramite regressione log-lineare è stata eseguita in un primo momento applicando un modello codominante per entrambi gli SNPs; i risultati ottenuti hanno evidenziato come i valori di RR siano simili in presenza di genotipo eterozigote e omozigote variante, portando a definire un modello dominante per entrambe le varianti in analisi (Grafico 14). In entrambi i casi si osservano risultati che confermano quanto precedentemente osservato nell'analisi TDT: in rs642961 si osserva un rischio significativo in presenza dell'allele variante A per nsCL/P (RR=1,44; 95% CI: 1,17-1,77;  $P=0,001$ ) e in particolar modo per nsCL (RR=2,09; 95% CI: 1,48-2,95;  $P<0,001$ ), mentre non si registra alcuna associazione a rischio nei casi di nsCP.



**Grafico 14: Rischio Relativo dell'allele variante A di rs642961 considerando un modello dominante.** Valori significativi segnati in rosso.

L'allele variante C di rs17015183 manifesta un'associazione inversa per tutti i fenotipi di schisi (Grafico 15), particolarmente significativa nei casi di nsCL/P (RR= 0,56; 95% CI:0,41 -0,77;  $P<0,001$ ) e nsUCL/P (RR= 0,48; 95% CI: 0,32-0,75;  $P=0,002$ ); estremamente interessante è la presenza di associazione inversa significativa nei casi di nsCP (RR=0,49; 95% CI: 0,28-0,85.;  $P=0,012$ ).



**Grafico 15: Rischio Relativo dell'allele variante C di rs17015183 considerando un modello dominante.** Valori significativi segnati in rosso.

L'analisi GEI effettuata in relazione al sesso al probando (Grafico 16) ha confermato quanto inizialmente osservato tramite analisi TDT: l'allele variante A di rs642961 è associato ad un rischio più elevato di schisi, nsCL/P e nsCL nei maschi; in particolar modo nel caso di nsCL/P si osserva un rischio nel genere maschile pari a 1,74 (95% CI: 1,33-2,28;  $P<0,001$ ), che differisce significativamente dal rischio che si osserva nel genere femminile (RR=1,09; 95% CI: 0,78-1,53;  $P=0,608$ ), con  $P>\chi^2 = 0,033$ . L'allele variante C di rs17015183 mostra nuovamente associazione inversa a rischio nei confronti di tutti i fenotipi di schisi, con valori significativi nel genere maschile (senza però mostrare differenze significative  $P>\chi^2$  tra i valori RR riscontrati tra maschi e femmine); sebbene non significativa statisticamente ( $P>\chi^2 = 0,104$ ), è interessante la differenza tra associazione a rischio che si osserva nei casi di nsCP, dove l'associazione inversa è evidente nelle femmine (RR=0,38; 95% CI:0,38-0,77;  $P=0,007$ ) mentre non si manifesta nei maschi (RR=1,02; 95% CI: 0,39-2,67;  $P=0,971$ ).

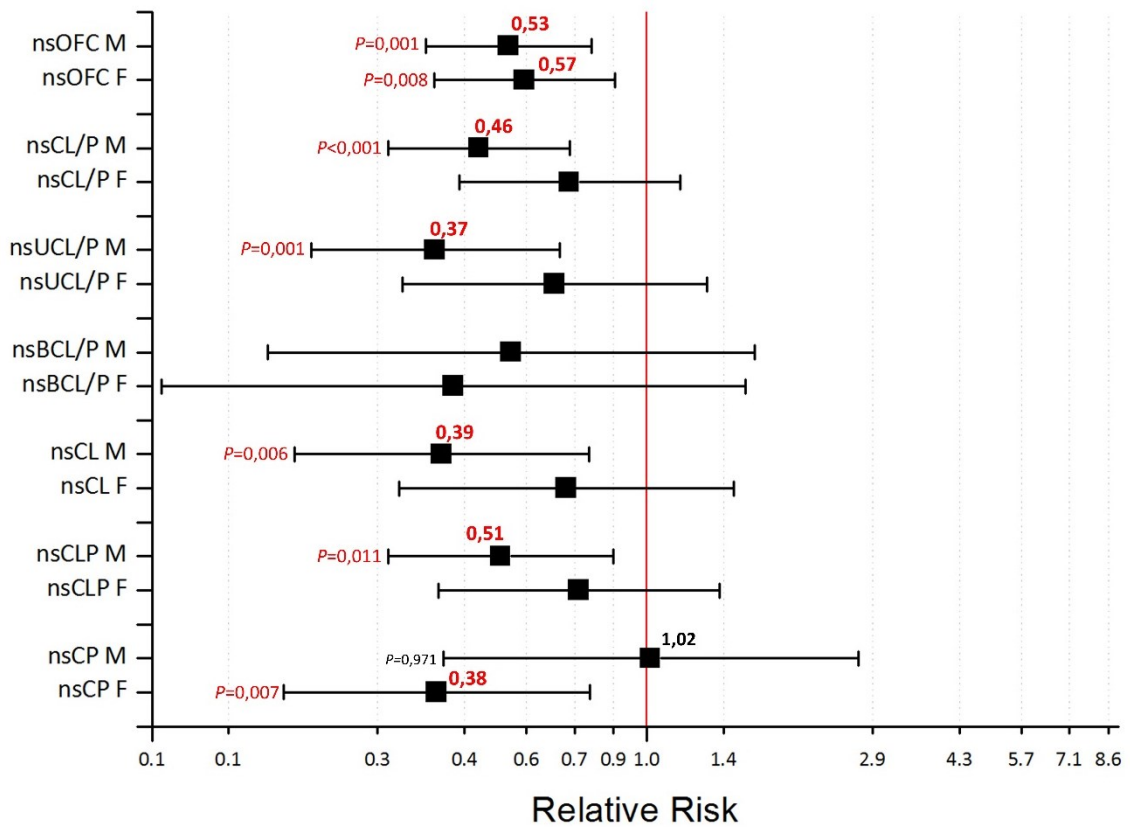
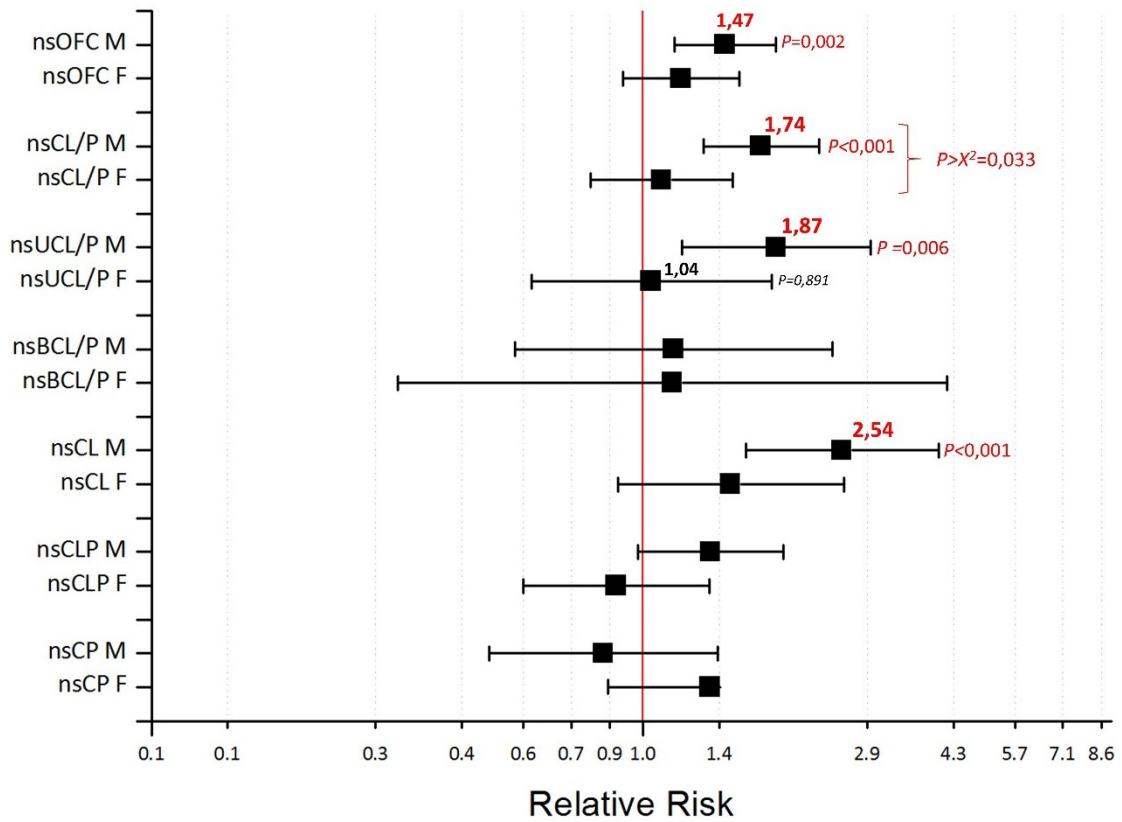


Grafico 16: analisi dei rischi relativi in relazione al genere del probando, per le varianti rs641961 (in alto) e rs17015183 (in basso) seguendo un modello dominante. I valori significativi sono segnati in rosso. Valori non interessanti non sono stati illustrati.

Rs17015183 è localizzato circa 40,5Kb a monte di rs642961 (Figura 36) e i due polimorfismi si trovano all'interno di isole di disequilibrio tra loro indipendenti.

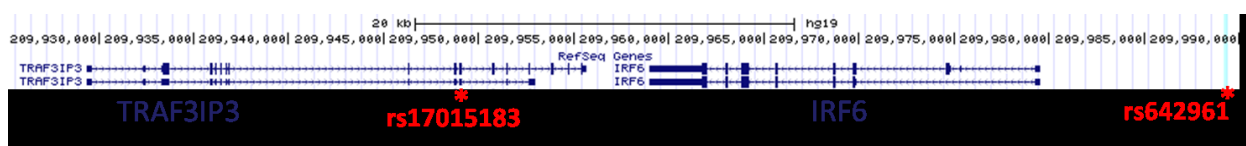


Figura 36: localizzazione degli SNP rs17015183 (all'interno del gene TRAF3IP3) e rs642961 (a circa 14kb dal gene IRF6) sul locus 1q32.2.

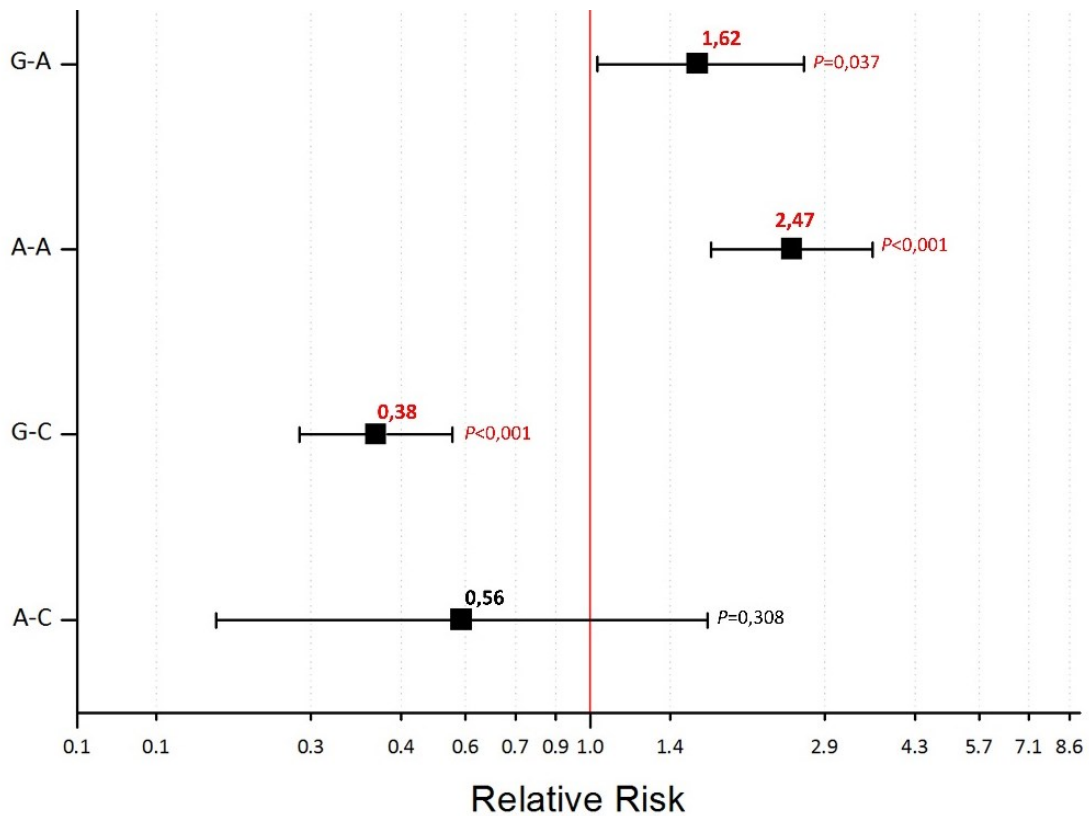
Abbiamo dunque effettuato un'analisi di associazione degli aplotipi composti da questi due SNPs (rs642961-rs17015183) per indagare gli effetti causati dalla co-presenza di particolari alleli dei polimorfismi presi in esame. È stato possibile ricavare l'aplotipo rs642961-rs17015183 per 431 triadi della casistica; le frequenze aplotipiche riscontrate sono riportate in tabella 26:

Tabella 26: frequenze aplotipiche rs642961-rs17015183 osservate all'interno della popolazione in esame.

rs642961 G>A	rs17015183 A>C	Aplotipo	Freq. %
G	A	G - A	50.3%
A	A	A - A	19.8%
G	C	G - C	19.3%
A	C	A - C	1.9%

L'aplotipo più frequente è rappresentato da G-A, composto dagli alleli maggiori di entrambi gli SNPs. Gli aplotipi A-A e A-G, contenuti rispettivamente l'allele maggiore di uno SNPs e il minore per l'altro SNPs, hanno frequenze estremamente simili tra loro. L'aplotipo contenente entrambe le varianti (A-C) manifesta invece una frequenza piuttosto bassa: risulta quindi difficoltoso effettuare analisi stratificate che possiedano rilevanza statistica.

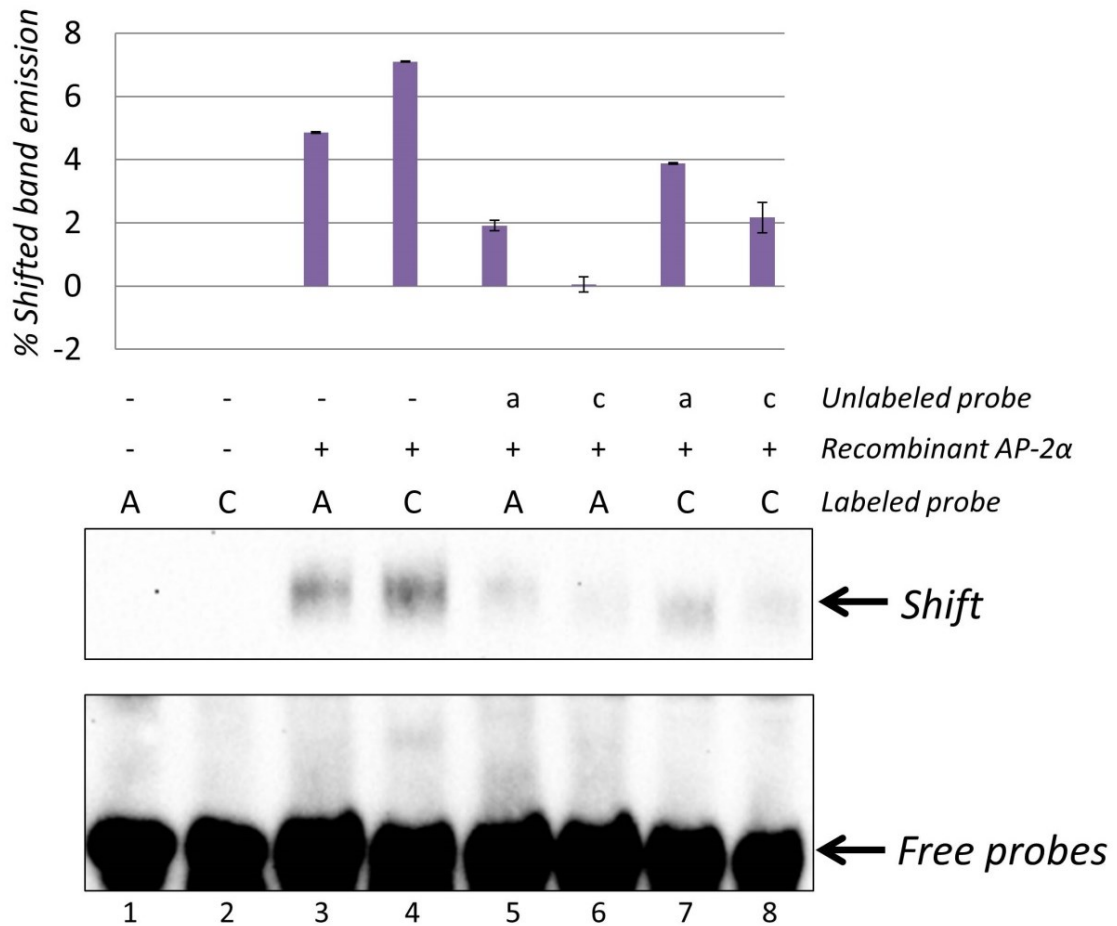
Il calcolo dei rischi relativi (Grafico 17) ha tuttavia fornito risultati interessanti sulle schisi in generale (nsOFC): l'aplotipo G-A, contenente i due alleli maggiori possiede un RR= 1,62 (95% CI: 1,03-2,61;  $P=0,037$ ), mentre l'aplotipo A-A (contenente l'allele variante di rs642961) mostra una associazione a rischio estremamente significativa, pari a 2,47 (95% CI: 1,72-3,55;  $P<0,001$ ); l'aplotipo G-C contenente solamente la variante di rs17015183 mostra al contrario una forte associazione inversa pari a 0,38 (95% CI: 0,27-0,54;  $P<0,001$ ) e l'aplotipo A-C, contenente entrambi gli alleli varianti, osserva un *trend* di associazione inversa, con RR=0,0562 (95% CI: 0,19-1,69;  $P=0,308$ ) (la frequenza aplotipica di A-C è troppo bassa perché sia possibile ottenere un dato statisticamente significativo).



**Grafico 17: Rischio Relativo dei quattro possibili aplotipi rs642961-rs17015183 considerando un modello dose-dipendente in singola dose.** Vlori significativi segnati in rosso.

L'eliminazione del legame AP-2 $\alpha$  in seguito a sostituzione A>C in rs17015183 è stata predetta solamente a livello bioinformatico, e necessita una conferma tramite *test* funzionali. Per verificare l'alterazione del legame al fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$  è stato dunque allestito un *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) utilizzando due sonde oligonucleotidiche ds marcate contenenti la sequenza di legame AP-2 $\alpha$  nell'intorno dello SNP rs17015183 (rispettivamente una sonda con allele maggiore A e una sonda con allele minore C); le sonde sono state incubate con proteina ricombinante umana AP-2 $\alpha$  e con oligonucleotidi analoghi alle sonde (non marcati) per testare la specificità del legame, e fatti correre elettroforeticamente su gel di poliacrilammide per valutare *shift* nella migrazione a causa del legame sonda-proteina. Il saggio funzionale, mostrato in figura 37, ha confermato la presenza del sito di legame AP-2 $\alpha$  (banda 3). Contrariamente a quanto atteso però la proteina ricombinante lega anche la sonda contenente la variante C (banda 4). La sostituzione A>C non solo non elimina il legame, ma sembra al contrario aumentarne la specificità: come è possibile osservare dall'istogramma riportato in immagine, l'emissione della banda "*shifted*" relativa al legame tra proteina e sonda C marcata (banda 4) appare superiore rispetto all'emissione dalla banda relativa al legame tra proteina a sonda A (banda 3). Inoltre, laddove si è effettuato il saggio di competizione utilizzando oligonucleotidi non marcati, si osserva un sequestro maggiore da parte degli oligonucleotidi contenenti la variante C rispetto a quelli

contenti la variante A: l'emissione quasi nulla della banda 6 (A+c), suggerisce che gli oligonucleotidi contenenti l'allele variante abbiano sequestrato la proteina ricombinante AP-2 $\alpha$ , impedendone il legame con la sonda A e quindi l'emissione luminosa; coerentemente, in corrispondenza della banda 7 (C+a) il sequestro che osserva da parte degli oligonucleotidi non marcati contenuti l'allele maggiore è molto inferiore, e l'emissione della sonda marcata C rimane visibile.



**Figura 37: electoretic mobility shift assay (EMSA)** effettuato utilizzando sonde marcate contenenti allele maggiore A e allele minore C da sole (rispettivamente bande 1 e 2), incubate con AP-2 $\alpha$  ricombinante (rispettivamente bande 3 e 4), e con oligonucleotidi non marcati per saggi di competizione; gli oligonucleotidi non marcati contengono a loro volta rispettivamente l'allele maggiore della variante (sonda non marcata a, bande 5 e 7) e l'allele minore (sonda non marcata c, bande 6 e 8). L'istogramma riportato sopra all'immagine del saggio mostra la percentuale di emissione chemiluminescente rilevata dal Chemidoc XRS+ system e Image Lab<sup>TM</sup> Software in corrispondenza della banda che ha subito lo *shift*. Bande relative alle sonde marcate libere vengono registrate dallo strumento con emissione vicina al 100%.

## 4.2. Studio di associazione di geni candidati a nsCP

Le conoscenze sui fattori genici coinvolti nell'eziologia delle schisi non sindromiche del solo palato sono, ancora oggi, estremamente limitate. L'unico gene attualmente candidato come causale per lo sviluppo della patologia, il gene *FAF1*, è stato identificato dal gruppo di ricerca del De Duve Institute dell'Università di Leuven (Belgio); all'interno di un progetto di collaborazione tra i ricercatori del De Duve institute e il Network Europeo EuroCleftNet (di cui è parte il nostro gruppo di ricerca), è stato analizzato un pannello di 10 SNPs interni al gene, e si è identificata per la prima volta un'associazione significativa tra un polimorfismo del gene *FAF1* (rs3827730) e rischio per le nsCP all'interno della popolazione Europea (Ghassibe-Sabbagh et al. 2011). Successivamente alla pubblicazione dei risultati sopracitati, l'ulteriore identificazione di una traslocazione cromosomica t(1;17)(p21;q24) e di una duplicazione (12q24.33) in individui affetti da forme sindromiche di CP, ha portato i ricercatori del De Duve institute alla selezione di tre nuovi geni candidati per suscettibilità alle nsCP: *SOX9* (17q24.3), *MMP17* e *SFSWAP* (entrambi su 12q24.33) (Desmyter 2012). Il gene *SOX9* è già noto in letteratura per essere correlato a difetti scheletrici, PRS e displasia campomelica (*campomelic dysplasia*, CD); topi con mutazioni di *SOX9* sviluppano inoltre CP (Lee & Saint-Jeannet 2011). Il gene *SFSWAP* (*splicing factor suppressor of white apricot*), è un regolatore dello splicing di CD45 e della fibronectina (OMIM\*601945). *MMP17* (*Matrix Metalloproteinase 17*) codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle metalloproteasi della matrice (MMP), coinvolta nella degradazione della matrice extracellulare in numerosi processi fisiologici tra cui lo sviluppo embriologico e il rimodellamento tessutale (OMIM \*602285). L'individuazione di questi nuovi geni candidati, insieme a precedenti osservazioni di associazione di uno SNP del gene *MTRR* (codificante per un enzima del ciclo dei folati) all'interno della casistica italiana del progetto ITALCLEFT, ha portato alla selezione di 8 polimorfismi candidati nello studio dell'eziologia di nsCP:

rs3827730 T>C, sostituzione intronica interna a *FAF1*

rs1149795 A>G, sostituzione intronica interna a *FAF1*

rs17382596 T>G, sostituzione intronica interna a *FAF1*

rs2229989 G>A, variante sinonima His169His interna a *SOX9*

rs9904530 C>G, variante intergenica 1,5Mb a monte di *SOX9*

rs1801394 A>G, variante missenso I22M interna al gene *MTRR*

rs7306271 A>G, variante intronica interna a *SFSWAP*

rs7300198 C>T, variante intronica interna a *MMP17*



Gli otto SNPs menzionati sono stati indagati all'interno di una casistica di 284 triadi con probandi affetti da palatoschisi isolate (nsCP), selezionate a partire dalle coorti dei progetti EUROCRAN e ITALCLEFT. La genotipizzazione è stata effettuata mediante utilizzo di saggi di discriminazione allelica (*TaqMan SNP genotyping Assay*) e le triadi con genotipo incompleto sono state escluse dallo studio. Lo studio degli SNPs interni a *FAF1*, pubblicato nel lavoro in collaborazione con Ghassibe-Sabbagh e colleghi (2011), ha subito un'estensione dell'analisi a livello dell'interazione con i fattori ambientali.

L'analisi TDT è stata eseguita per ciascuno SNP stratificando in base a genere del probando, supplementazione della dieta materna in gravidanza e esposizione al fumo di sigaretta durante il primo trimestre di gestazione (Tabella 27).

**Tabella 27: analisi TDT per gli SNPs candidati per nsCP, con stratificazione in base a genere del probando, supplementazione della dieta materna con acido folico in periodo periconcezionale (AF), esposizione materna al fumo durante la gravidanza.**

	T	NT	$P_{TDT}$	Genere	T	NT	$P_{TDT}$	AF	T	NT	$P_{TDT}$	fumo	T	NT	$P_{TDT}$
<b>FAF1</b> <b>rs1149795</b>	72	68	0,735	<i>maschi</i>	36	23	0,091	+	37	42	0,574	+	11	13	0,683
				<i>femmine</i>	32	43	0,204	-	30	23	0,336	-	59	54	0,638
<b>FAF1</b> <b>rs3827730</b>	<b>108</b>	<b>139</b>	<b>0,049</b>	<i>maschi</i>	<b>43</b>	<b>68</b>	<b>0,018</b>	+	<b>62</b>	<b>88</b>	<b>0,034</b>	+	21	33	0,102
				<i>femmine</i>	61	66	0,657	-	42	46	0,670	-	85	103	0,189
<b>FAF1</b> <b>rs17382596</b>	110	117	0,642	<i>maschi</i>	44	46	0,833	+	62	60	0,856	+	20	24	0,546
				<i>femmine</i>	64	65	0,930	-	46	50	0,683	-	88	87	0,940
<b>SOX9</b> <b>rs2229989</b>	<b>77</b>	<b>115</b>	<b>0,006</b>	<i>maschi</i>	31	47	0,070	+	48	62	0,182	+	14	23	0,139
				<i>femmine</i>	45	62	0,100	-	<b>28</b>	<b>48</b>	<b>0,022</b>	-	<b>63</b>	<b>89</b>	<b>0,035</b>
<b>SOX9</b> <b>rs9904530</b>	122	135	0,417	<i>maschi</i>	60	51	0,393	+	58	74	0,164	+	<b>18</b>	<b>33</b>	<b>0,036</b>
				<i>femmine</i>	59	80	0,075	-	59	56	0,780	-	101	98	0,832
<b>MMP17</b> <b>rs7300198</b>	122	103	0,205	<i>maschi</i>	48	44	0,677	+	72	60	0,296	+	24	25	0,886
				<i>femmine</i>	67	55	0,277	-	43	38	0,579	-	92	75	0,188
<b>SFSWAP</b> <b>s7306271</b>	128	154	0,122	<i>maschi</i>	66	73	0,553	+	68	86	0,147	+	28	31	0,696
				<i>femmine</i>	60	76	0,170	-	51	62	0,301	-	98	120	0,136
<b>MTRR</b> <b>rs1801394</b>	107	98	0,530	<i>maschi</i>	42	44	0,829	+	59	54	0,638	+	22	23	0,881
				<i>femmine</i>	59	50	0,389	-	38	39	0,909	-	83	71	0,334

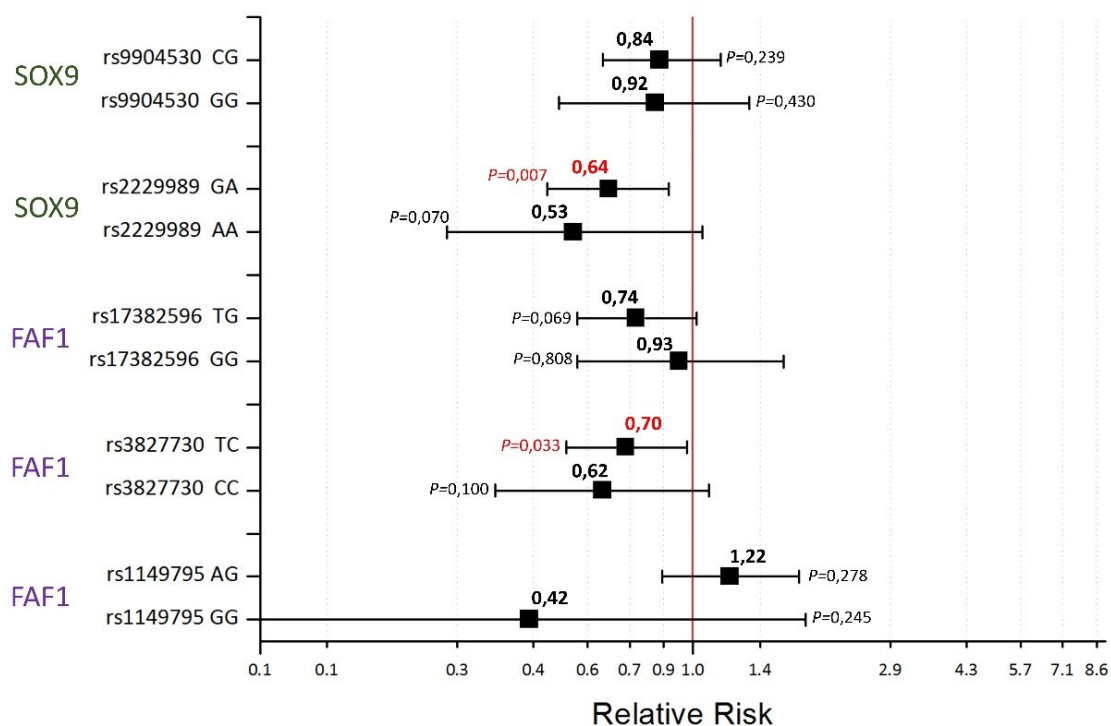
T – Numero di Trasmessi (triadi dove l'allele minore viene trasmesso al figlio affetto). NT – Numero di Non Trasmessi (triadi dove l'allele minore non viene trasmesso al figlio affetto).  $P$ -values significativi segnati in rosso.

Le varianti interne ai geni *MTRR*, *SFSWAP* e *MMP17* non mostrano alcuna over-trasmissione allelica, e sono dunque state escluse dalle successive analisi.

Non si osservano trasmissioni significative nemmeno nell'analisi degli SNPs rs1149795 e rs17382596 di *FAF1*. L'analisi TDT di rs3827730, che mostra una minor trasmissione con  $P$ -value *borderline* dell'allele variante G dai genitori al figlio affetto ( $T/NT = 108/139$ ;  $P_{TDT} = 0,049$ ), acquista maggiore significatività nella stratificazione in base ai fattori ambientali: si osserva minor trasmissione nei maschi ( $T/NT = 43/68$ ;  $P_{TDT} = 0,018$ ) e in caso di avvenuta supplementazione della dieta materna con acido folico o multivitaminici ( $T/NT = 62/88$ ;  $P_{TDT} = 0,034$ ).

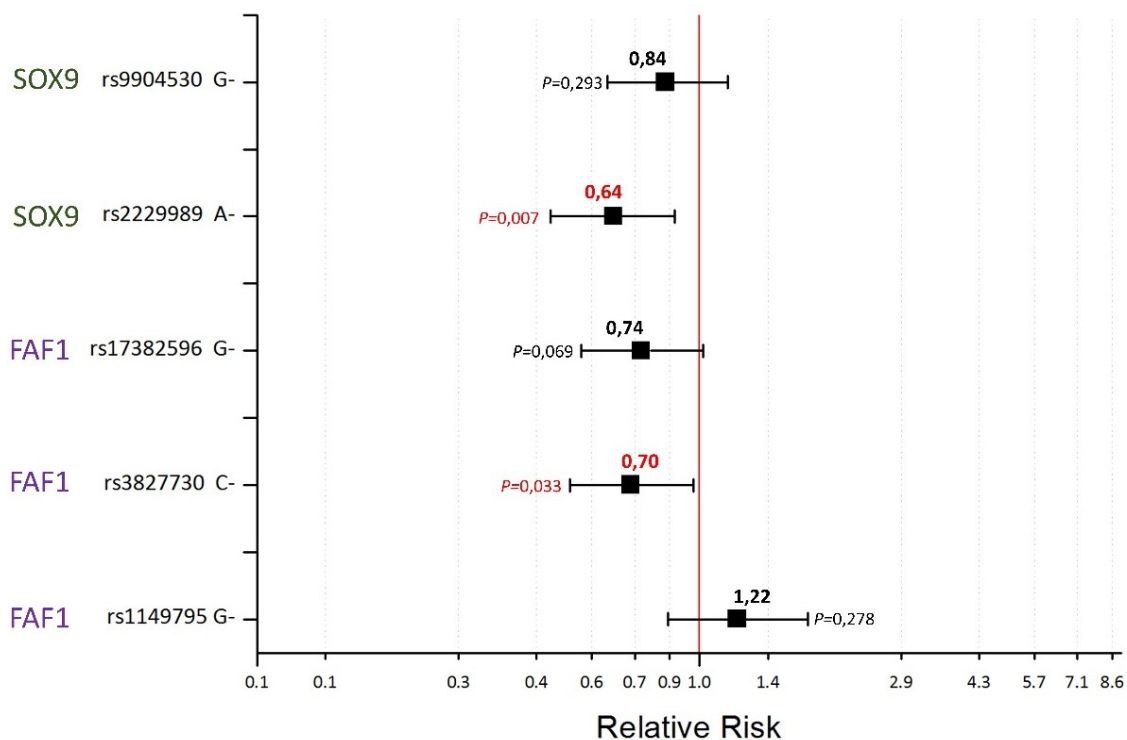
La variante a monte di *SOX9*, rs9904530, mostra una significativa minor trasmissione della variante G solo nel caso in cui la madre abbia fumato durante il periodo precoce della gravidanza (T/NT = 18/33;  $P=0,036$ ). Risulta infine evidente la minor trasmissione dell'allele variante A di rs2229989 (T/NT = 77/115;  $P=0,006$ ), che mantiene significatività in caso di mancata assunzione di acido folico o multivitaminici da parte della madre (T/NT = 28/48;  $P=0,022$ ) e nel caso in cui non vi sia stata esposizione al fumo (T/NT = 63/89;  $P=0,035$ ).

I rischi relativi al genotipo dei figli affetti sono quindi stati calcolati per le varianti dei geni *FAF1* e *SOX9* mediante analisi log-lineare sulla base di un modello codominante dose-dipendente



**Grafico 18: Rischi Relativi delle varianti dei geni *FAF1* e *SOX9* considerando un modello codominante.** Valori significativi riportati in rosso.

I risultati ottenuti sono in linea con quanto osservato tramite analisi TDT: solo i polimorfismi rs3827730 (*FAF1*) e rs2229989 (*SOX9*) possiedono valori di associazione significativi. Entrambi i polimorfismi mostrano associazione inversa a rischio di sviluppare nsCP: il genotipo eterozigote TC di rs3827730 mostra un RR = 0,70 (95% CI: 0,51-0,97;  $P=0,033$ ), mentre il genotipo eterozigote GA di rs2229989 mostra un RR = 0,64 (95% CI: 0,46-0,88;  $P=0,007$ ). In tutti i casi analizzati il genotipo omozigote variante non mostra alcuna associazione; i calcoli del RR sono dunque stati ripetuti assumendo un modello dominante (es: per rs3827730 il genotipo in analisi è C-; il rischio viene dunque calcolato confrontando il rischio di CC+CT con quello di TT) (Grafico 19).



**Grafico 19: Rischi Relativi delle varianti dei geni *FAF1* e *SOX9* considerando un modello dominante.** Valori significativi in rosso.

Cambiando modello di applicazione dell'analisi log-lineare si confermano le associazioni inverse delle varianti al rischio di nsCP: rs3827730 con RR = 0,70 (95% CI: 0,51-0,97;  $P=0,033$ ) e rs2229989 con RR = 0,64 (95% CI: 0,46-0,88;  $P=0,007$ ).

L'analisi di interazione gene-ambiente (GEI) condotta in relazione al genere del probando (Grafico 20) ha evidenziato una differenza significativa ( $P > \chi^2 = 0,045$ ) per rs9904530, dove si osserva un'associazione inversa ristretta al genere femmine (RR= 0,59; 95% CI: 0,37-0,81;  $P=0,017$ ); trends di associazione inversa ristretta al genere maschile sono invece osservabili per rs3827730 (RR=,049; 95% CI: 0,29-0,81;  $P=0,005$ ;  $P > \chi^2 = 0,068$ ) e per rs17382596 (RR=0,54; 95% CI: 0,33-0,88;  $P=0,013$ ;  $P > \chi^2 = 0,074$ ).

L'analisi in relazione ad assunzione di acido folico in periodo periconcenzionale (Grafico 21) non ha evidenziato alcun valore di associazione significativo.

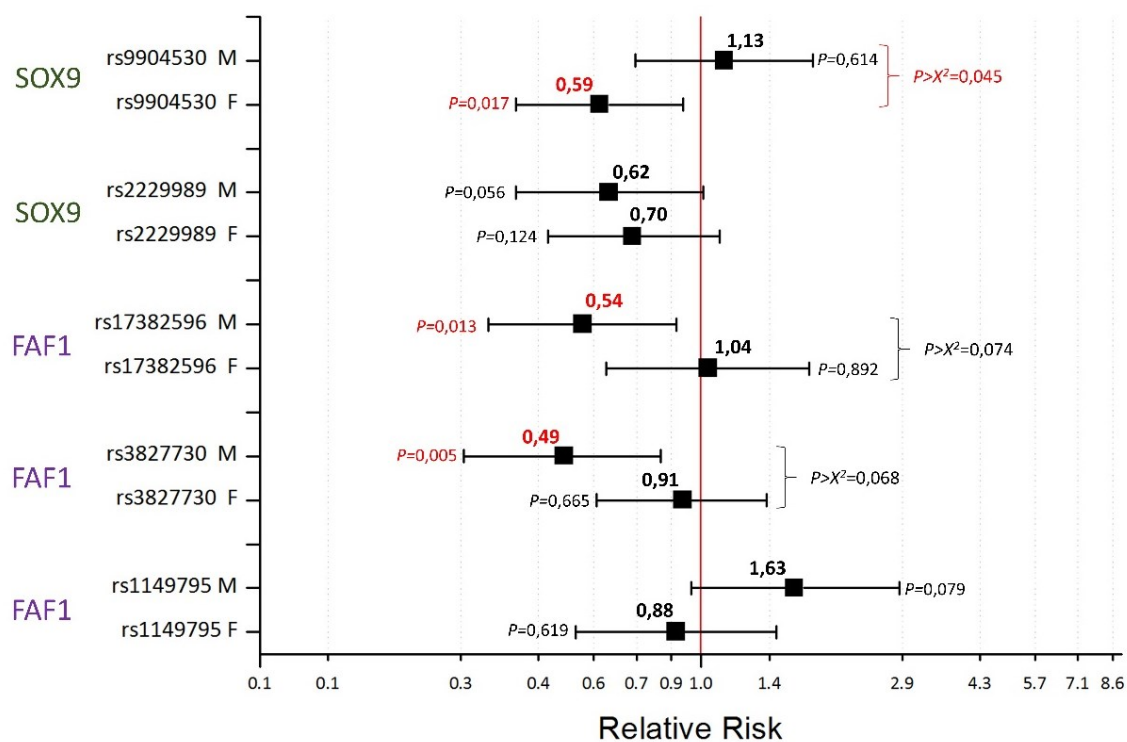


Grafico 20: Rischi Relativi delle varianti dei geni FAF1 e SOX9 in relazione al genere del probando. Valori significativi riportati in rosso.

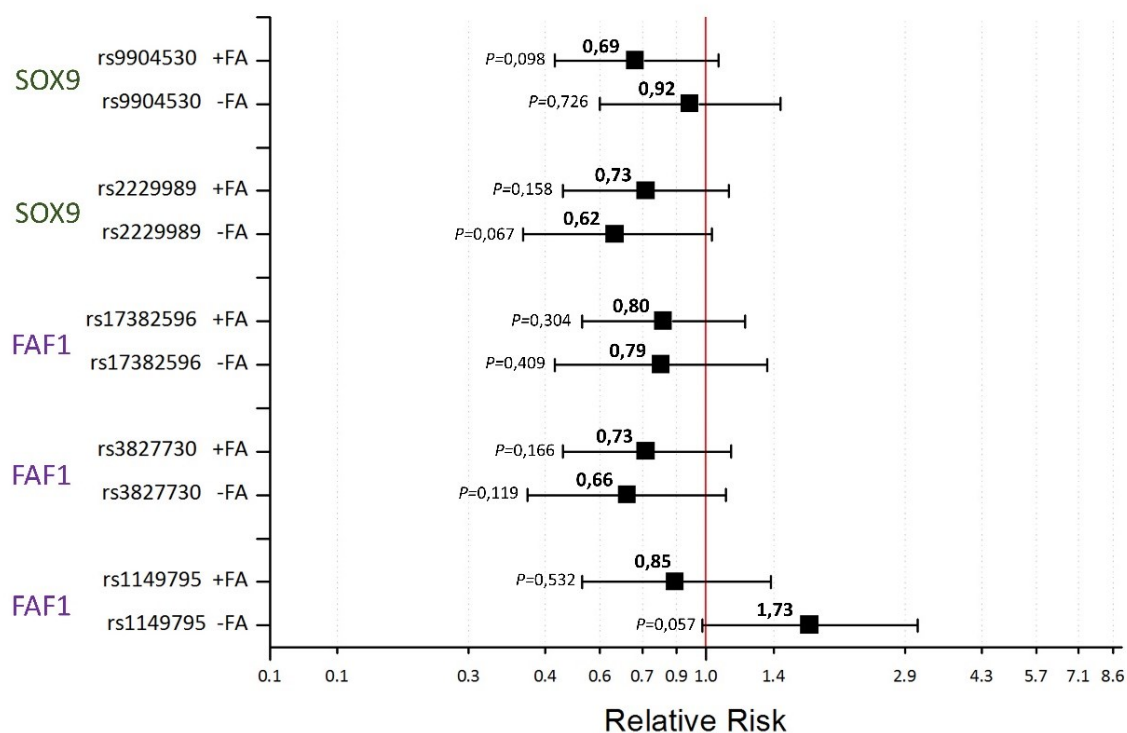
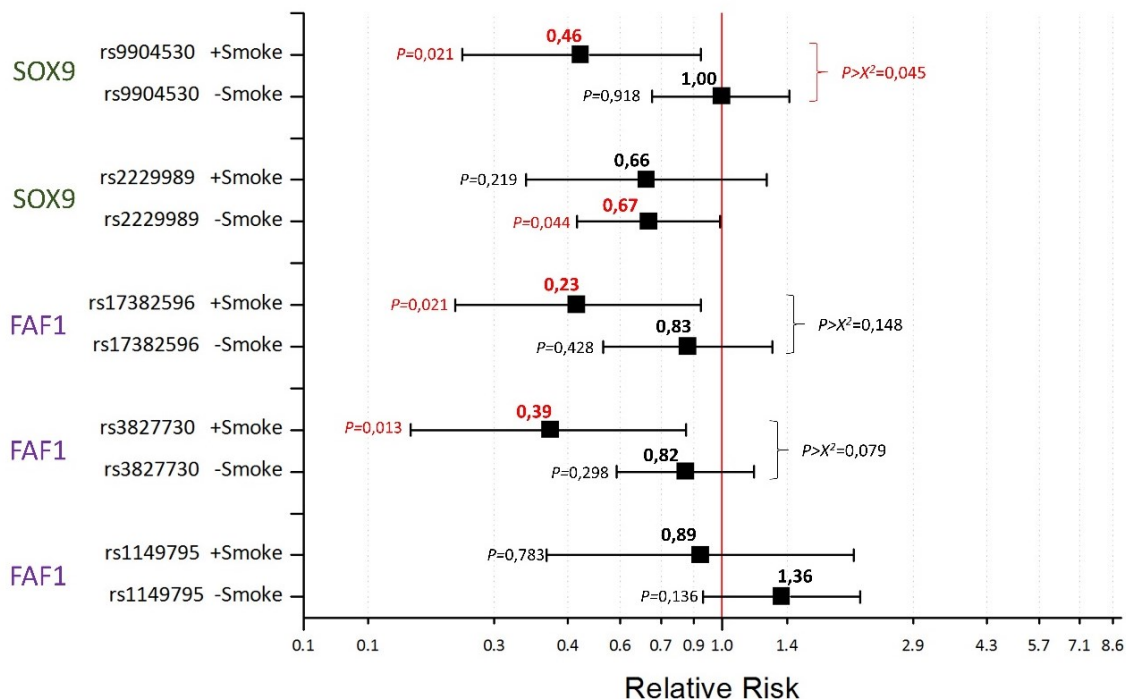


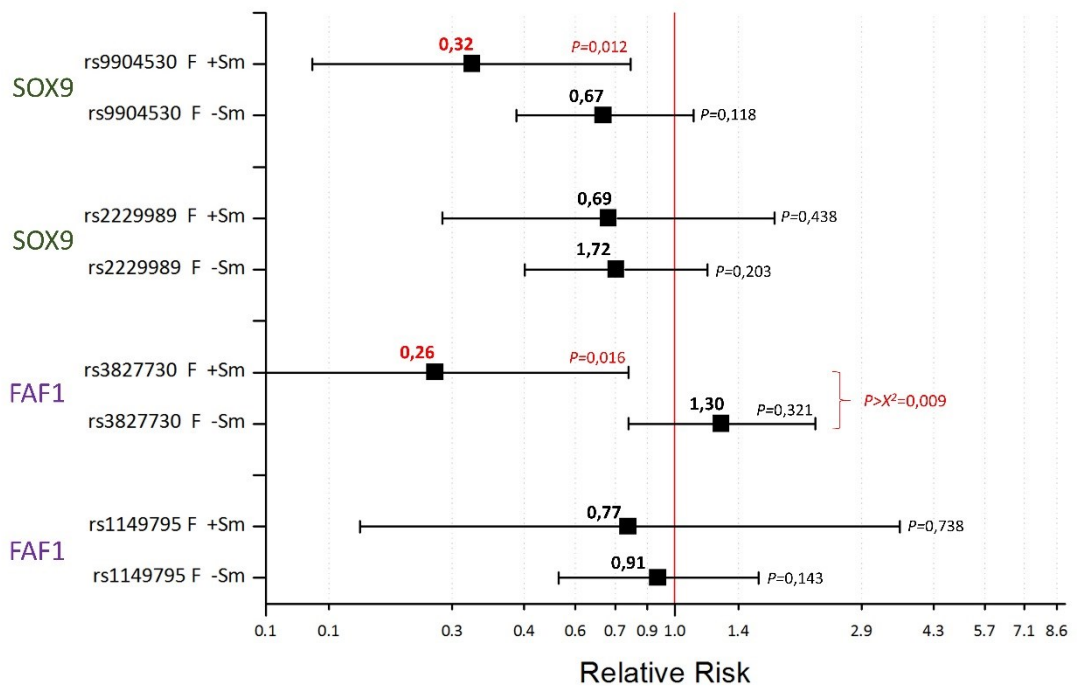
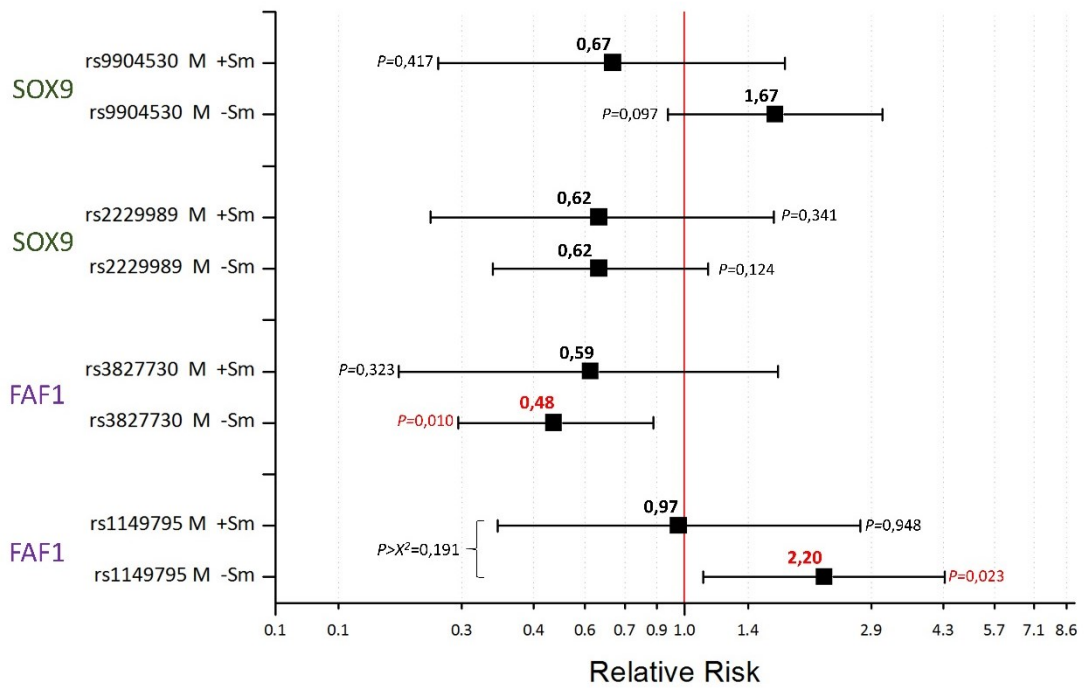
Grafico 21: Rischi Relativi delle varianti dei geni FAF1 e SOX9 in relazione ad assunzione di acido folico da parte della madre in periodo periconcezionale. Valori significativi riportati in rosso.

Studi di interazione con fumo di sigaretta (Grafico 22) hanno invece evidenziato un rischio pari 0,46 (95% CI:0,24-0,89;  $P=0,021$ ) per rs9904530 in caso di esposizione a fumo di sigaretta da parte della madre nel periodo precoce della gravidanza, con differenza significativa rispetto al rischio osservato in caso di non esposizione al fattore di rischio.



**Grafico 22: Rischi Relativo delle varianti dei geni FAF1 e SOX9 in relazione ad esposizione a fumo di sigaretta da parte della madre in gravidanza precoce.**

Un'ulteriore stratificazione ha messo in relazione i rischi relativi collegati ad esposizione a fumo di sigaretta e genere del probando (Grafico 23). Nessun valore significativo è stato osservato per rs2229989; rs9904530 mostra una più forte associazione inversa a rischio nel caso di figlie femmine esposte al fumo di sigaretta (RR = 0,32; 95% CI: 0,13-0,78;  $P=0,0012$ ), sebbene la differenza con femmine non esposte non abbia valenza significativa ( $P > X^2 = 0,150$ ). Rs3827730 mostra invece che l'associazione inversa che si osserva in caso di madri fumatrici con figlie affette di sesso femminile è estremamente maggiore rispetto a quanto si osserva in caso di madri non fumatrici (nelle femmine si osserva un RR = 0,26; 95% CI: 0,09-0,77; differenza rispetto al rischio in non esposizione al fumo significativa con  $P > X^2 = 0,009$ ).



**Grafico 23: Rischi Relativo delle varianti dei geni *FAF1* e *SOX9* in relazione ad esposizione a fumo di sigaretta da parte della madre in gravidanza precoce in caso di probando di genere maschile (sopra) e femminile (sotto).**

## 5. DISCUSSIONE

---

Le schisi orofacciali (OFCs) sono anomalie congenite che possono presentarsi nel contesto di un ampio numero di sindromi malformative con ereditarietà mendeliana, ma per la maggior parte corrispondono a forme non-sindromiche isolate (Dixon et al. 2011). In base a dati epidemiologici, le nsOFCs vengono suddivise in schisi del labbro con o senza schisi del palato (nsCL/P) e schisi del solo palato (nsCP). Entrambi i fenotipi presentano eziologia complessa, determinata dal coinvolgimento di fattori genetici e ambientali (Böhmer et al. 2013). Studi di associazione *genome-wide* (GWAS) e studi di associazione gene-candidato hanno identificato molteplici regioni genetiche associate a suscettibilità per la patologia; tuttavia, le varianti causali sono tuttora sconosciute e l'influenza dei fattori di rischio ambientale complica ulteriormente la definizione della componente genetica nelle schisi orofacciali. L'identificazione delle varianti causali e delle interazioni con l'ambiente rimane una sfida di primaria importanza nella comprensione dei meccanismi molecolari che portano allo sviluppo della patologia, fondamentale per il potenziamento delle attuali strategie di trattamento e prevenzione.

Per approfondire la comprensione dell'architettura genetica delle schisi non sindromiche, nel presente studio sono state selezionate varianti comuni interne a loci implicati nello sviluppo della malformazione; tali varianti sono state indagate per presenza di associazione ai diversi fenotipi di schisi stratificando la popolazione in base alla presenza di determinati fattori di rischio ambientale. Le indagini sono state effettuate avvalendosi di un modello basato su triadi probando-genitori, che possiede numerosi vantaggi tra cui l'aumento della qualità delle genotipizzazioni e delle analisi aploipiche, la resistenza agli effetti di confondimento causati da stratificazione della popolazione, e potere statistico più elevato rispetto ai modelli di associazione caso-controllo nell'ambito delle analisi statistiche.

Le nove regioni di indagine, all'interno delle quali sono state individuate le varianti analizzate, sono state selezionate poiché contengono geni candidati all'eziologia del *cleft*: tre regioni sono state selezionate poiché comprendono geni coinvolti in ambito di interazione con fattori di rischio ambientale (geni *CBS* e *MTRR* coinvolti nel metabolismo dei folati e gene *HLA-G* coinvolto nei meccanismi di immunotolleranza a livello dell'interfaccia materno-fetale); la regione contenente il gene *GREM1* è stata selezionata poiché identificata dagli studi GWA; la regione contenente il gene *IRF6* è stata selezionata sulla base del ruolo ampiamente noto nell'eziologia di *cleft-syndromes* (e i successivi studi GWA ne hanno confermato il ruolo anche nell'eziologia del *cleft* non-sindromico); le restanti quattro regioni sono state selezionate sulla base di anomalie cromosomiche identificate in pazienti affetti da sindromi (geni *FAF1*, *SOX9*, *MMP17*, *FSFWAP*). Lo studio delle varianti interne ai geni *FAF1*, *SOX9*, *MMP17*, *FSFWAP* e *MTRR* è stato condotto indipendentemente all'interno di una casistica composta da triadi con probandi affetti esclusivamente da nsCP, al fine di identificare nuovi geni candidati all'eziologia di questo fenotipo di schisi, del quale le conoscenze in letteratura sono ancora estremamente limitate.



### 5.1. *Interazione di fattori ambientali e CBS844ins68 nell'eziologia delle schisi orofacciali non-sindromiche*

L'enzima cistationina  $\beta$  sintasi, codificato dal gene *CBS*, è fondamentale nella via di transsulfurilazione dell'omocisteina, parallela al metabolismo dei folati. La variante CBS844ins68 è stata correlata ad aumentato rischio di difetti del tubo neurale (NTDs) (de Franchis et al. 2002), una categoria di malformazioni congenite che condividono con le nsOFCs caratteristiche epidemiologiche, embriologiche e cliniche, tra cui la relazione inversa con la supplementazione di acido folico; inoltre, uno studio condotto sulla casistica del progetto ITALCLEFT ha mostrato la presenza di over trasmissione dell'allele variante da parte di madri con genotipo eterozigote a figli affetti all'interno della popolazione italiana (Rubini et al. 2005).

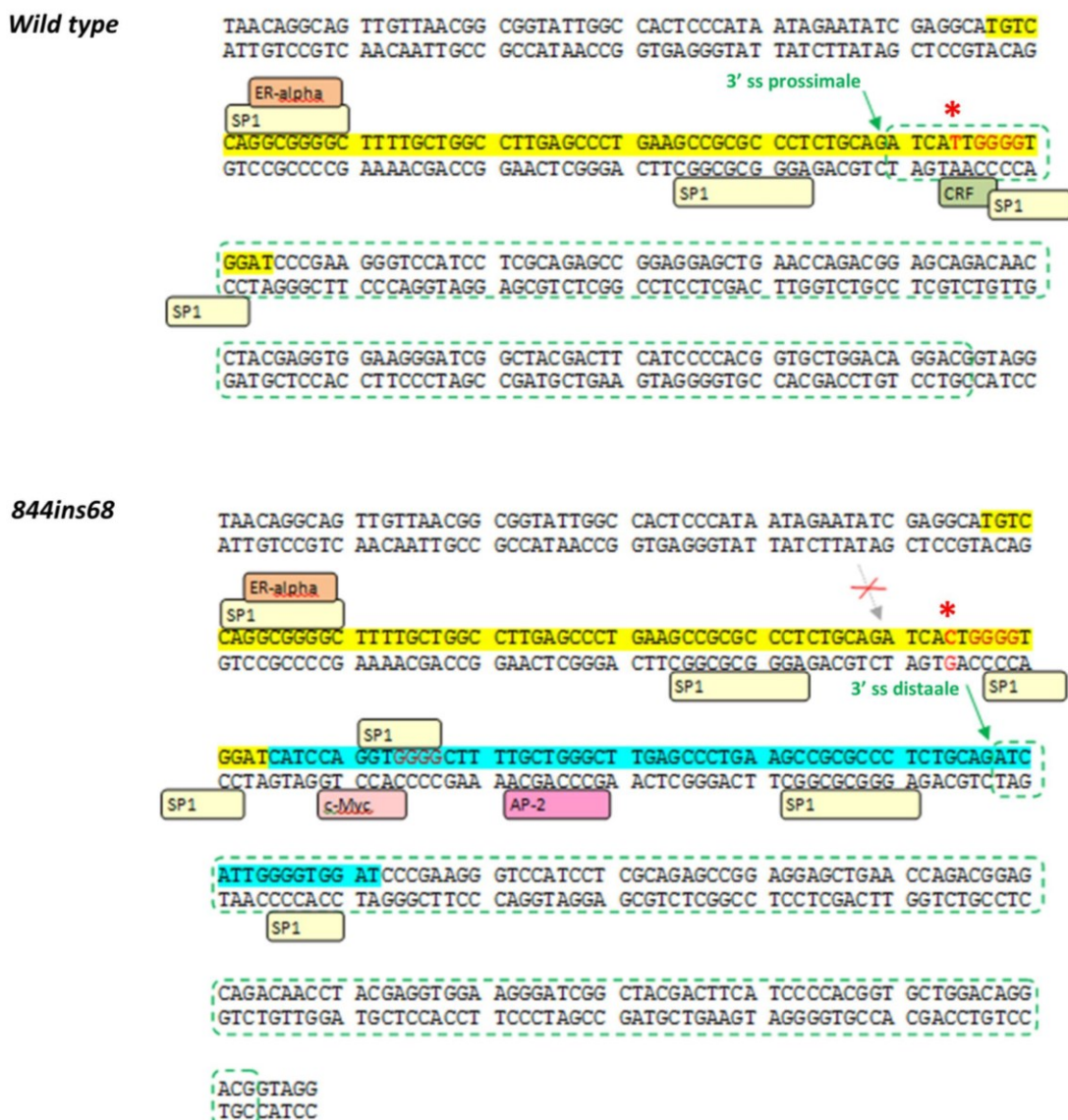
L'analisi TDT della variante CBS844ins68 sulla popolazione europea, non ha osservato la medesima over trasmissione; tuttavia, l'analisi effettuata mediante regressione log-lineare ha evidenziato un'associazione a rischio di schisi non sindromiche in presenza di probandi con genotipo omozigote per la variante (II), con rischio incrementato 2,15 volte rispetto a probandi con genotipo eterozigote (DI) e omozigoti per l'allele maggiore (DD).

Ulteriori risultati sono emersi considerando l'interazione del genotipo II del probando con fattori ambientali quali genere e supplementazione della dieta materna con acido folico in periodo periconcezionale: all'interno del genere maschile si osserva un incremento di 2,88 volte del rischio di sviluppare nsOFC, mentre in caso di mancata assunzione di acido folico da parte della madre, si osserva un aumento di 4,56 volte del rischio per nsOFC e di 6,96 volte per nsCLP. Nessuna interazione è invece stata rilevata in relazione ad esposizione materna al fumo di sigaretta. Un'ultima stratificazione tramite la quale sono stati messi in relazione il genere maschile del probando con l'avvenuta o mancata supplementazione della dieta materna con acido folico, ha confermato come il genotipo omozigote II determini rischio aumentato di quasi 7 volte nello sviluppo di forme gravi di schisi (CLP) in caso di mancata supplementazione della dieta materna combinata con la nascita di figlio di genere maschile.

Sebbene l'inserzione delle 68 bp provochi la formazione di un sito di *splicing* alternativo che determina l'eliminazione della variante 833C>T (rs5742905), sostituzione missenso Ile>thr deleteria causa di *CBS-deficiency*, e porti alla formazione di un trascritto normale di mRNA (Romano et al. 2002), è evidente come la presenza del polimorfismo 844ins68 possieda un ruolo funzionale a livello del gene *CBS* e come, in presenza di determinati fattori ambientali, possa essere coinvolta nell'eziologia delle schisi facciali non sindromiche. L'analisi predittiva dell'alterazione dei putativi siti di legame per fattori di trascrizione (illustrata nell'immagine X), mostra come la presenza dell'inserzione vada a determinare la formazione di nuovi siti di legame

per AP-2 $\alpha$  e c-Myc, fattori di trascrizione noti per un coinvolgimento nella regolazione dello sviluppo craniofacciale, e per lo sviluppo di schisi orofacciali non sindromiche. Tale osservazione porta a ipotizzare che la formazione di questi siti di *binding* possa avere un ruolo determinante nell'alterazione della regolazione trascrizionale del gene *CBS*, in maniera influenzata dalle interazioni con l'ambiente osservate nel presente studio di associazione.

Questi risultati sperimentali, oltre a rappresentare un promettente punto di partenza per ulteriori studi funzionali volti a chiarire i meccanismi molecolari coinvolti in presenza di tale polimorfismo, pongono nuove importanti basi per la traslazione nella pratica di consulenza genetica, e nella ricerca di nuove strategie per la prevenzione primaria delle schisi non-sindromiche.



**Figura 38** rappresentazione schematica dell'inserzione di 68bp a livello della giunzione introne7/esone 8 del gene *CBS*, con predizione di putativi siti di *binding* per fattori di trascrizione. Le frecce verdi indicano rispettivamente i siti di *splicing* 3' prossimale e 3' distale dell'introne 7. Le linee verdi tratteggiate indicano l'esone 8. La sostituzione T>C è indicata dall'asterisco rosso.

## 5.2. Identificazione di HLA-G come nuovo gene candidato

Ad oggi, non sono state riportate evidenze sperimentali inerenti un possibile ruolo giocato dai meccanismi di immunotolleranza embrionale nell'eziologia delle schisi non-sindromiche. La glicoproteina HLA-G è nota per essere coinvolta nella modulazione del *pool* materno di cellule Natural Killer a livello dell'interfaccia materno fetale; il presente studio ha ipotizzato per la prima volta che variazioni di HLA-G potessero essere coinvolte nei meccanismi eziologici delle schisi orofacciali, postulando una possibile correlazione tra HLA-G, presenza di feto con malformazione, e meccanismi di selezione "in utero" dell'embrione.

L'analisi della variante nota come HLA-G 14bp ins/del, costituita da un'inserzione di 14bp che determina minor stabilità del trascritto di mRNA codificante HLA-G e correlata ad abortività spontanea ricorrente, ha mostrato interessanti risultati di associazione all'interno di una casistica italiana (ITALCLEFT): l'analisi TDT ha mostrato over-trasmissione dell'allele contenente l'inserzione dai genitori ai figli affetti, e l'analisi log-lineare ha evidenziato presenza di associazione del genotipo omozigote II a rischio per nsCL/P, con un valore di rischio relativo pari a 1,72. La stratificazione della casistica in base ai parametri convenzionali di rischio per le schisi non sindromiche (genere, supplementazione di acido folico, esposizione al fumo) non ha mostrato valori di associazione significativi, mentre sono emersi valori estremamente interessanti nell'analisi di parametri specifici della gravidanza, quali lunghezza del periodo di gestazione e genitura del probando. L'associazione tra genotipo II e nsCL/P si manifesta in maniera esclusiva in soggetti nati da gravidanze di durata maggiore o uguale alle 39 settimane, con un effetto particolarmente evidente nelle forme più gravi di schisi (nsCLP), dove si osserva un rischio relativo pari a 3,16, con differenza significativa rispetto al valore di rischio (0,72) degli individui nati da gravidanza pretermine. L'analisi di interazione gene-ambiente riferita alla genitura del probando ha mostrato un'evidente associazione opposta a rischio nel caso di probando primogenito o non primogenito: l'associazione tra genotipo II e rischio di nsCL/P appare infatti correlata esclusivamente ai casi di primogenitura e, anche in questo caso, in maniera particolarmente importante nel caso di fenotipo nsCLP, con un rischio aumentato di 2,47 volte rispetto a probandi con genotipo differente da II; la differenza di rischio rispetto a casi di probando non primogenito è estremamente significativa, in particolar modo poiché in tal caso si presentano valori di associazione inversa a rischio di schisi, con un rischio relativo di 0,26 per nsCLP (figli non primogeniti con genotipo II hanno quindi rischio ridotto di 3,85 di sviluppare la schisi). Un calcolo dell'Odds Ratio ha escluso una possibile correlazione intrinseca tra lunghezza della gravidanza e genitura, sottolineando come entrambi i fattori interagiscano con il genotipo II in maniera tra loro indipendente nell'influenzare il rischio di schisi non-sindromiche. Un'ultima analisi TDT effettuata per valutare la natura dell'interazione tra i due parametri di gravidanza, ha mostrato come non vi

sia differenza tra la presenza di entrambe le condizioni di rischio (primogenitura in caso di gravidanza con durata maggiore o uguale alle 39 settimane) o di una sola delle due; si esclude dunque che le due condizioni possano esercitare un effetto additivo, e si ipotizza invece un effetto di ridondanza in presenza di entrambe le condizioni di rischio.

La gravidanza rappresenta un fenomeno fisiologico unico in natura, consistente nella simbiosi di individui semi-allogeni, la cui coesistenza richiede una raffinata e complessa regolazione del sistema immunitario, sia materno che fetale; il sistema all'interno del quale si colloca HLA-G è dunque estremamente complesso, e le modalità attraverso cui si realizza la tolleranza del feto da parte del sistema immunitario materno resta per certi versi un vero e proprio paradosso immunologico (Thellin et al. 2000; Govoni et al. 2006). Recenti studi hanno mostrato che alti livelli di espressione di HLA-G a livello della placenta sono correlati a parti pre-termine (Stout et al. 2014), e studi su modelli animali hanno mostrato come *stress* cumulativo multigenerazionale durante il periodo della gravidanza precoce vada a de-regolare i livelli di espressione di microRNA (miR-200b e miR-429) noti nella modulazione della lunghezza della gravidanza, determinando anche in questo caso gravidanze più brevi rispetto alle normali tempistiche di gestazione (Yao et al. 2014); una maggiore risposta materna allo *stress* è stata correlata anche ad alterazione del normale sviluppo del feto, e a maggiore inclinazione ad aborto spontaneo dovuto a un meccanismo di "selezione in utero" (Catalano et al. 2014). È stato inoltre teorizzato che la persistenza di cellule fetali all'interno dell'organismo materno (microchimerismo fetale) dopo una prima gravidanza possa condurre ad alterazioni della risposta immunitaria materna (Johnson & Bianchi 2004).

L'insieme di queste osservazioni, aprono una nuova finestra d'indagine sul ruolo di tali complessi meccanismi propri della gravidanza nell'eziologia delle schisi non-sindromiche, auspicando alla realizzazione di nuove sperimentazioni che portino a chiarire come durata della gravidanza, genitura e alterazioni genetiche di HLA-G possano essere tra loro collegati nella suscettibilità alla malformazione congenita.

### 5.3. *Esclusione di una variante putativamente funzionale nell'intorno di GREM1 dall'eziologia comune delle schisi non-sindromiche*

Gli studi di associazione GWA hanno identificato varianti comuni che contribuiscono all'incremento del rischio di nsCL/P, definendo numerosi loci di suscettibilità. Le varianti geniche (SNPs) che predispongono a tratti comuni quali le schisi orofacciali, sono spesso localizzate in elementi regolatori non codificanti, come siti *enhancers*. In aggiunta, sebbene alcune di queste varianti possano possedere loro stesse un ruolo funzionale, è probabile che la maggior parte di esse costituiscano dei *markers* che si trovano in *linkage disequilibrium* con altre varianti funzionali (Corradin et al. 2014; Leslie et al. 2015).

Tra questi, lo SNP rs1258763, intergenico tra *GREM1* (considerato promettente candidato nell'eziologia del nsCL/P) e *FMN1*, è stato identificato come fortemente associato a rischio di nsCL/P (Mangold et al. 2010; Ludwig et al. 2012; Ludwig et al. 2014). Analisi effettuate tramite approccio bioinformatico non hanno però mostrato alcun ruolo putativamente funzionale attribuibile a tale variante, suggerendo che rs1258763 non sia causativo nell'eziologia delle schisi, ma che altre varianti funzionali localizzate all'interno della medesima isola di disequilibrio possano avere ruolo nell'alterazione degli elementi regolatori del gene *GREM1*. Nel presente studio abbiamo identificato un polimorfismo, rs10519739, localizzato in LD con rs1258763 e il cui allele variante causa alterazione del sito di *binding* per il fattore di trascrizione c-Myb, coinvolto nello sviluppo craniofacciale e nello sviluppo del palato nell'embriogenesi precoce. È quindi stata indagata, all'interno della casistica europea, l'associazione di questo polimorfismo a rischio di sviluppare nsOFC, comparandola con il rischio di rs1258763.

Gli studi di associazione *family-based* hanno confermato la forte associazione dell'allele variante di rs1258763 a rischio di nsCL/P: l'analisi TDT mostra infatti una significativa over trasmissione dell'allele variante dai genitori ai figli affetti (T/NT = 287/187), e la regressione log-lineare evidenzia un incremento di rischio di nsCL/P di 2,04 volte in presenza di probando con genotipo omozigote per la variante (AA) rispetto a genotipo omozigote per l'allele maggiore (GG). In accordo con i precedenti studi presenti in letteratura, nessuna associazione di rs1258763 è stata evidenziata con rischio di nsCP.

Contrariamente a quanto atteso, l'analisi TDT ha invece mostrato significativa minor trasmissione dell'allele variante di rs10519739 sia nel gruppo dei nsCL/P (T/NT = 32/60) e nsCL (T/NT = 7/17), che nel gruppo dei nsCP (T/NT = 7/19). La bassa MAF di rs10519739 (2,7%) non ha reso possibile il calcolo del rischio relativo in presenza di genotipo omozigote per la variante (AA); tuttavia, si è evidenziata una significativa associazione inversa del genotipo eterozigote (CA) sia nel gruppo dei nsCL che dei nsCP, entrambi con un rischio relativo pari a 0,41; in presenza di probando con

genotipo eterozigote CA si assiste dunque a una riduzione di 2,4 volte del rischio di sviluppare forme lievi di schisi quali schisi del solo labbro e schisi del solo palato.

L'analisi di associazione dell'aplotipo C-A, composto dall'allele maggiore di rs10519739 e dall'allele variante di rs1258763, evidenzia come il rischio aplotipico mantenga valori simili a quelli identificati nella precedente analisi genotipica di rs1258739, con un valore di rischio in doppia dose pari a 2,41 per nsCL/P, e a 3,72 per nsCL. La bassa frequenza dell'aplotipo A-A, contenente entrambe le varianti dei due SNPs in analisi, non permette l'ottenimento di valori statisticamente significativi; l'analisi di associazione mostra un *trend* di associazione inversa con valori simili a quelli ottenuti nell'analisi di associazione genotipica effettuata per rs10519739.

In conclusione, nonostante l'attività putativamente funzionale, rs10519739 non può essere considerata come variante causale trasmessa in LD con il *marker* rs1258763 nello sviluppo delle schisi orofacciali: tale polimorfismo infatti mostra un'associazione inversa a rischio di nsCL e nsCP, che non è comunque rilevante quanto l'associazione a rischio mostrata da rs128763. I risultati ottenuti confermano tuttavia come rs1258763 non possa costituire a sua volta variante causale della patologia, poiché la presenza contemporanea dell'allele di rischio di rs1258763 e dell'allele variante di rs10519739 (aplotipo A-A) determina la perdita di associazione a rischio provocata dalla sola presenza dell'allele A di rs1258763. Queste osservazioni suggeriscono che altre varianti causali possano essere localizzate all'interno dell'isola di disequilibrio, e che diverse forme aplotipiche possano interagire con la variante A di rs1258763. L'attività putativamente funzionale della variante di rs1051739 nell'alterazione del sito di legame per c-Myb potrebbe avere un ruolo nel contrastare il rischio associato a rs1258763, ma la bassa frequenza dell'allele variante porta ad escludere questo polimorfismo come fattore critico nell'eziologia delle schisi orofacciali.

#### 5.4. Identificazione di una nuova variante funzionale nell'intorno del gene *IRF6*

Il presente studio ha ricercato varianti che alterassero siti di legame per il fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$  nell'intorno del gene *IRF6*, partendo dall'ipotesi che tale fattore di trascrizione effettui un'azione regolativa agendo su diversi siti polimorfici interni ad *enhancer* nell'intorno del gene, in maniera correlata allo SNP funzionale rs642961, identificato da Rahimov e colleghi nel 2008. Le indagini svolte attraverso approccio bioinformatico all'interno di un segmento genomico di 60kb comprendente il gene *IRF6* hanno portato all'individuazione di 375 siti di legame AP-2 $\alpha$ , di cui 11 alterati in presenza di alleli polimorfici. Di questi, due SNPs (rs41303263 e rs17015183) sono stati selezionati per studi di associazione genetica, poiché collocati nel contesto di sequenze consenso complesse che con alta probabilità corrispondono ad elementi regolativi.

La genotipizzazione della casistica europea ha portato ad escludere dallo studio la variante rs41303263, per via di una MAF minore dello 0,1%. Le successive analisi sono quindi state effettuate parallelamente per rs17015183 e rs642961.

L'over trasmissione dell'allele variante A di rs642961 da parte dei genitori ai figli affetti di nsCL/P riportata in diversi studi in letteratura è stata confermata anche all'interno della nostra casistica (T/NT = 272/197), e analisi di regressione log-lineare hanno evidenziato la presenza di associazione significativa a rischio per nsCL/P in presenza dell'allele variante A (RR = 1,44), con valori particolarmente rilevanti nella stratificazione per genere: probandi di genere maschile il cui genotipo contiene l'allele variante (eterozigoti GA e omozigoti AA) mostrano un rischio aumentato di 1,74 volte rispetto a maschi con genotipo omozigote GG, con differenza significativa rispetto a probandi di genere femminile, all'interno dei quali non si osserva associazione a rischio. L'analisi di rs17015183 ha invece mostrato una significativa minor trasmissione dell'allele variante C da parte dei genitori a figli affetti per nsOFC (96/176); considerando la stratificazione per genere, si osserva come la minor trasmissione dell'allele variante acquisti valenza significativa rispettivamente all'interno del genere maschile per nsCL/P (T/NT = 43/79) e per nsCP all'interno del genere femminile (T/NT = 12/31). Tali risultati sono stati confermati dalla regressione log-lineare, che ha evidenziato come la presenza dell'allele variante C (sia in eterozigosi che in omozigosi) comporti un'associazione inversa a rischio per tutti i fenotipi di schisi, e come nella stratificazione per genere si osservino valori significativi all'interno del genere maschile per nsCL/P (RR = 0,46) e all'interno del genere femminile per nsCP (0,38). Sebbene le differenze osservate tra maschi e femmine contenenti l'allele C non abbiano valori  $P > \chi^2$  significativi, è interessante notare come la presenza della variante determini un calo del rischio di sviluppare nsCL/P di 2,17 volte nei maschi e un calo del rischio di nsCP di 2,63 volte nelle femmine: i dati epidemiologici presenti in letteratura mostrano come nsCL/P sia più frequente nei maschi e come nsCP nelle femmine, e la

variante in esame sembra quindi determinare un effetto di riduzione del rischio in maniera selettiva per le categorie di genere dove la malformazione si presenta con maggiore frequenza.

L'analisi degli aplotipi composti dalla combinazione degli alleli dei due SNPs ha infine mostrato come la co-presenza dell'allele di rischio A di rs642961 e dell'allele variante C di rs17015183 determini un *trend* di associazione inversa a rischio di schisi, con un valore di rischio relativo pari a 0,056: tale risultato conferma come la presenza dell'allele variante A di rs642961 non determini un effetto di rischio esclusivo nell'eziologia delle schisi, poiché influenzata dalla presenza di un'ulteriore variante putativamente funzionale posta a circa 40kb di distanza.

La presenza di *binding* del fattore AP-2 $\alpha$  al sito contenente rs17015183 è stata confermata tramite *electroforetic mobility shift assay*; contrariamente a quanto atteso in seguito ad analisi bioinformatica, la presenza dell'allele variante C non ha azione deleteria nei confronti del *binding* ma, al contrario, manifesta una apparente rinforzo del legame AP-2 $\alpha$ . Tale risultato acquista significato considerando l'associazione inversa a rischio della variante C evidenziata negli studi di associazione genetica, e ipotizzando che lo SNP rs17015183 agisca in maniera analoga a rs642961: Rahimov e colleghi hanno osservato come la presenza dell'allele di rischio A sia distruttiva nei confronti del legame con AP-2 $\alpha$  e associata a rischio di nsCL/P; allo stesso modo in rs17015183, l'allele che sembra possedere minore affinità nei confronti di AP-2 $\alpha$  è costituito dall'allele maggiore A, considerabile come allele di rischio: tenendo infatti presente che probandi con genotipi in eterozigosi (AC) o omozigosi (CC) manifestano un rischio relativo pari a 0,54 per nsOFC, si ricava che il genotipo omozigote AA è correlato ad un aumento di 1,85 volte del rischio di sviluppare schisi non sindromiche. Tali osservazioni sono rafforzate dall'evidenza di incremento del valore di RR (pari a 2,54) in presenza di aplotipo A-A (contenente entrambi gli alleli di rischio per rs642961 e rs17015183), rispetto al rischio di nsOFC determinato dalla presenza del solo allele A di rs642961 (pari a 1,33).

Si fortifica dunque l'ipotesi secondo cui i due SNPs esaminati siano collocati all'interno di sequenze regolatorie di *IRF6*, entrambe con attività funzionale nei confronti del fattore trascrizionale AP-2 $\alpha$ , il cui ruolo nell'eziologia delle schisi non-sindromiche viene nuovamente confermato. Ulteriori studi funzionali sono necessari per confermare tale ipotesi e approfondire la comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti.



### 5.5. Identificazione di nuove varianti associate a nsCP

All'interno di un progetto collaborativo con il De Duve Institute dell'Università di Leuven sono stati selezionati cinque geni candidati per suscettibilità alle nsCP: *FAF1*, *SOX9*, *MMP17*, *SFSWAP* e *MTRR*. Otto varianti interne o nell'intorno di tali geni candidati sono state vagliate e analizzate all'interno di una casistica composta da triadi con probandi affetti esclusivamente da nsCP.

Le varianti interne ai geni *MMP17*, *SFSWAP* e *MTRR* non hanno mostrato valori di associazione a nsCP e sono state escluse dallo studio in seguito ad analisi TDT.

Uno SNP interno al gene *FAF1*, rs3827730 T>C, già individuato come associato a rischio di nsCP incrementato di 1,4 volte in presenza di genotipo TT (Ghassibe-Sabbagh et al. 2011), ha mostrato nuovi interessanti risultati nell'estensione dell'analisi inerente l'interazione con determinati fattori ambientali. Probandi con genotipo presentante l'allele variante C in eterozigosi (TC) o omozigosi (CC) mostrano una più forte associazione inversa all'interno del genere maschile, con un rischio relativo pari a 0,49; questo risultato è riconducibile ad un rischio aumentato di 2,04 volte in probandi maschi con genotipo TT, mentre non si osserva un'associazione a rischio nel genere femminile. Considerando l'interazione con l'esposizione materna al fumo di sigaretta durante le fasi precoci della gravidanza si assiste a un'interessante inversione della relazione tra rischio e genere del probando: in triadi con madre fumatrice si osserva infatti un rischio aumentato di 2,56 volte in presenza di probando con genotipo TT (RR = 0,39 considerando genotipo C-) che, se stratificato per genere, mostra associazione esclusiva all'interno del genere femminile: triadi con madre fumatrice e probando di genere femminile con genotipo TT hanno un rischio aumentato di 3,85 volte rispetto a probando femminile di diverso genotipo, e mostrano una differenza estremamente significativa ( $P > \chi^2 = 0,009$ ) rispetto a triadi con madri non fumatrice, dove non si registra alcuna associazione a rischio.

Lo SNP del gene *SOX9* s2229989 G>A, il cui allele variante A mostra minor trasmissione da genitori a figli affetti nell'analisi TDT (T/NT = 55/115), è stato correlato ad un valore di rischio relativo pari a 0,64 in presenza di probando con genotipo contenente la variante A in eterozigosi o in omozigosi, con un *P-value* estremamente significativo ( $P = 0,007$ ). E' quindi stato individuato un nuovo polimorfismo significativamente associato a suscettibilità per nsCP dopo rs3827730 (unico SNP attualmente associato a nsCP), il cui genotipo di rischio GG determina un aumento di 1,56 volte del rischio di schisi del palato, senza mostrare alcuna interazione con fattori ambientali.

Estremamente interessante è risultata infine l'analisi di rs9904530 C>G, localizzato a monte del gene *SOX9*: sia l'analisi TDT che la regressione log-lineare non hanno infatti registrato alcuna associazione del polimorfismo a rischio di nsCP in assenza di interazione con fattori ambientali; considerando la stratificazione in base al genere si osserva invece una differenza significativa ( $P > \chi^2 = 0,045$ ) nel rischio tra probandi di genere femminile e maschile: mentre nei maschi la presenza dell'allele G in eterozigosi o in omozigosi non associa a rischio per nsCP, nelle femmine si osserva un valore di RR pari a 0,59, traducibile in un aumento di rischio di 1,69 volte in caso di probando di genere femminile con genotipo CC. Considerando l'interazione del genotipo contenente l'allele variante con l'esposizione al fumo materno, si osserva un'associazione inversa a rischio pari a 0,46 con differenza nuovamente significativa confrontando l'assenza di associazione in caso di madre non fumatrice: madri fumatrici con probando con genotipo CC hanno dunque un rischio aumentato di 2,17 volte di generare figlio con nsCP rispetto a madri fumatrici con probando di diverso genotipo, mentre madri non fumatrici non possiedono differenze di rischio relate al genotipo del figlio. Un'ultima stratificazione in cui sono stati messi in relazione esposizione al fumo materno e genere del probando ha evidenziato come il rischio determinato dal fumo si manifesti esclusivamente all'interno del genere femminile: triadi con madre fumatrice e probando di sesso femminile con genotipo CC manifestano un rischio aumentato di 3,13 volte nello sviluppo di nsCP, mentre nessuna associazione è visibile all'interno del genere maschile.

Tali risultati sono di estrema rilevanza nello studio, ancora estremamente lacunoso, dei fattori genetici coinvolti nello sviluppo delle schisi del solo palato: oltre ad aver individuato due nuove varianti correlate al gene *SOX9* associate a rischio di nsCP, si è anche mostrato il ruolo determinante dell'esposizione al fumo di sigaretta da parte della madre nel periodo precoce della gravidanza, in maniera selettiva per quanto riguarda sviluppo di schisi nel genere femminile. Tale differenza di genere è supportata dai dati epidemiologici che riportano come il genere femminile sia più esposto a rischio di schisi del solo palato rispetto al genere maschile, probabilmente a causa del tempo più lungo necessario alla fusione dei processi palatini durante l'embriogenesi femminile, rendendo il processo di formazione del palato più suscettibile ad insulti teratogeni quali il fumo di sigaretta.

## 5.6. Conclusioni

Il presente studio ha contribuito all'approfondimento delle attuali conoscenze sui fattori di rischio genetico coinvolti nelle schisi orofacciali non-sindromiche, evidenziando il forte impatto dell'interazione con specifici fattori di rischio ambientale. I risultati ottenuti nell'analisi delle varianti dei geni *CBS*, *FAF1* e *SOX9* hanno mostrato come genere, supplementazione della dieta materna con acido folico e esposizione materna a fumo di sigaretta nel periodo precoce della gravidanza, abbiano un ruolo determinante nello sviluppo della malformazione congenita in presenza di determinati genotipi di rischio. L'analisi effettuata sul gene *HLA-G*, oltre ad aver individuato un nuovo gene candidato a suscettibilità dello sviluppo della patologia, ha mostrato come anche condizioni strettamente correlate alla gravidanza, come durata del periodo di gestazione e genitura, possano avere un ruolo nell'eziologia delle schisi, aprendo la via a una nuova strada di indagine sugli aspetti inerenti la regolazione dell'interfaccia materno-fetale. L'individuazione di una nuova variante con attività funzionale nell'intorno di *IRF6* ha infine rinforzato il sospetto, riportato anche dalle ultime pubblicazioni in letteratura (Corradin et al. 2014), che la suscettibilità a patologie comuni quali le schisi orofacciali possa essere correlata a effetti combinatoriali di varianti multiple collocate in diversi siti regolatori come ad esempio siti *enhancer*. L'insieme di questi risultati ci porta ad auspicare alla realizzazione di nuove sperimentazioni che, alla luce della grossa mole di informazioni ottenute dagli studi GWA effettuati negli ultimi anni, si concentrino sull'individuazione di varianti funzionali interne ai loci di suscettibilità, utilizzando casistiche più omogenee rispetto a quelle utilizzate negli studi GWA, che offrano quindi maggiore possibilità di identificare le interazioni tra genotipo e ambiente, comprenderne i meccanismi molecolari alla base della patogenesi e individuare azioni di intervento in grado di prevenire queste malformazioni.

## 6. BIBLIOGRAFIA

---

- Van Aalst A, J., Kolappa K, K. & Sadove, M., 2008. MOC-PSSM CME article: Nonsyndromic cleft palate. *Plast Reconstr Surg*, 121(1, Suppl), pp.1–14.
- Åberg, A., Westbom, L. & Källén, B., 2001. Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Human Development*, 61(2), pp.85–95.
- Aldrich, C.L. et al., 2001. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Molecular Human Reproduction*, 7 (12), pp.1167–1172.
- Alkuraya, F.S. et al., 2006. SUMO1 Haploinsufficiency Leads to Cleft Lip and Palate. *Science*, 313 (5794), p.1751. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/313/5794/1751>.
- Ardinger, H.H. et al., 1989. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *American Journal of Human Genetics*, 45(3), pp.348–353.
- Arosarena, O.A., 2007. Cleft lip and palate. *Otolaryngologic clinics of North America*, 40(1), pp.27–60, vi.
- Ashique, A.M., Fu, K. & Richman, J.M., 2002. Endogenous bone morphogenetic proteins regulate outgrowth and epithelial survival during avian lip fusion. *Development*, 129 (19), pp.4647–4660.
- Bachler, M. & Neubüser, A., 2001. Expression of members of the Fgf family and their receptors during midfacial development. *Mechanisms of Development*, 100(2), pp.313–316.
- Badovinac, R.L. et al., 2007. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: A meta-analysis. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 79(1), pp.8–15.
- Barlow, A.J. et al., 1999. Expression of chick Barx-1 and its differential regulation by FGF-8 and BMP signaling in the maxillary primordia. *Developmental Dynamics*, 214(4), pp.291–302.
- Barlow, A.J. & Francis-West, P.H., 1997. Ectopic application of recombinant BMP-2 and BMP-4 can change patterning of developing chick facial primordia. *Development*, 124 (2), pp.391–398.
- Barrett, J.C. et al., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21 (2), pp.263–265.
- Beaty, T. et al., 2013. Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study. *Human Genetics*, Volume 132(Issue 7), pp.771–781.
- Beaty, T.H. et al., 2010. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet*, 42(6), pp.525–529.
- Beaty, T.H. et al., 2011. Evidence for gene-environment interaction in a genome wide study of nonsyndromic cleft palate. *Genetic Epidemiology*, 35(6), pp.469–478.
- Bergland, O., Semb, G. & Abyholm, F., 1986. Elimination of the residual alveolar cleft by secondary bone grafting and subsequent orthodontic treatment. *Cleft Palate J*, 23(3), pp.175–205.

- Bille, C. et al., 2007. Oral clefts and life style factors — A case-cohort study based on prospective Danish data. *European Journal of Epidemiology*, 22(3), pp.173–181.
- Birnbaum, S. et al., 2009. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet*, 41(4), pp.473–477.
- Blavier, L. et al., 2001. TGF- $\beta$ 3-induced Palatogenesis Requires Matrix Metalloproteinases. *Molecular Biology of the Cell*, 12 (5), pp.1457–1466.
- Boehringer, S. et al., 2011. Genetic determination of human facial morphology: links between cleft-lips and normal variation. *Eur J Hum Genet*, 19(11), pp.1192–1197.
- Böhmer, A.C. et al., 2013. Analysis of susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefting in a European trio sample. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 161(10), pp.2545–2549.
- Boyne PJ, S.N., 1976. Combined orthodontic-surgical management of residual palato-alveolar cleft defects. *Am J Orthod*, 70(1), pp.20–37.
- Brancaccio, A. et al., 2004. Requirement of the forkhead gene Foxe1, a target of sonic hedgehog signaling, in hair follicle morphogenesis. *Human Molecular Genetics*, 13 (21), pp.2595–2606.
- Brito, L.A. et al., 2012. Genetics and Management of the Patient with Orofacial Cleft. *Plast Surg Int*, 2012, p.782821.
- Brito, L.A. et al., 2012. IRF6 is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158A(9), pp.2170–2175.
- Brusati R, C.M., 1999. *Elementi di chirurgia oro-maxillo-facciale* Masson, ed., Milan.
- Calzolari, E. et al., 2004. Epidemiology of Cleft Palate in Europe: Implications for Genetic Research. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 41(3), pp.244–249.
- Canfield, M.A. et al., 2005. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: Findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 73(10), pp.679–689.
- Canfield, M.A. et al., 2006. National estimates and race/ethnic-specific variation of selected birth defects in the United States, 1999–2001. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 76(11), pp.747–756.
- Carmichael, S.L. et al., 2007. Maternal Stressful Life Events and Risks of Birth Defects. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 18(3), pp.356–361.
- Carmichael, S.L. & Shaw, G.M., 1999. Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies. *American Journal of Medical Genetics*, 86(3), pp.242–244.
- Carreira, A.C. et al., 2014. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Archives of biochemistry and biophysics*, 561, pp.64–73.
- Casey, L.M. et al., 2006. Jag2-Notch1 signaling regulates oral epithelial differentiation and palate development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(7), p.10.1002/dvdy.20821.

- Castro, M.L.S. de et al., 2006. Frequency of multiple neonatal malformations in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, and associated socio-demographic factors. *Cadernos de Saúde Pública*, 22, pp.1009–1015.
- Catalano, R.A., Currier, R.J. & Steinsaltz, D., 2014. Hormonal evidence of selection in utero revisited. *American Journal of Human Biology*, p.n/a–n/a.
- Cedergren, M. & Källén, B., 2005. Maternal Obesity and the Risk for Orofacial Clefts in the Offspring. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 42(4), pp.367–371.
- Chapman, K.L. et al., 1998. Conversational Skills of Preschool and School-Age Children with Cleft Lip and Palate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 35(6), pp.503–516.
- Al Chawa, T. et al., 2014. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Increased burden of rare variants within Gremlin-1, a component of the bone morphogenetic protein 4 pathway. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 100(6), pp.493–498.
- Cheasley, D. et al., 2011. Myb Controls Intestinal Stem Cell Genes and Self-Renewal. *STEM CELLS*, 29(12), pp.2042–2050.
- Chenevix-Trench, G. et al., 1992. Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *American journal of human genetics*, 51(6), p.1377.
- Chevrier, C. et al., 2005. Interaction between the ADH1C polymorphism and maternal alcohol intake in the risk of nonsyndromic oral clefts: An evaluation of the contribution of child and maternal genotypes. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 73(2), pp.114–122.
- Chiang, C. et al., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383(6599), pp.407–413.
- Ching, G.H. & Chung, C.S., 1974. A genetic study of cleft lip and palate in Hawaii. I. Interracial crosses. *American Journal of Human Genetics*, 26(2), pp.162–176.
- Choi, S.-W. & Mason, J.B., 2000. Folate and Carcinogenesis: An Integrated Scheme<sup>1–3</sup>. *The Journal of Nutrition*, 130 (2), pp.129–132.
- Cohen, M.M., 2002. Malformations of the craniofacial region: Evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. *American Journal of Medical Genetics*, 115(4), pp.245–268.
- Corradin, O. et al., 2014. Combinatorial effects of multiple enhancer variants in linkage disequilibrium dictate levels of gene expression to confer susceptibility to common traits. *Genome Research*, 24(1), pp.1–13.
- Correa, A. et al., 2008. Diabetes mellitus and birth defects. *American journal of obstetrics and gynecology*, 199(3), pp.237.e1–9.
- Costa, C.M. da S., Gama, S.G.N. da & Leal, M. do C., 2006. Congenital malformations in Rio de Janeiro, Brazil: prevalence and associated factors. *Cadernos de Saúde Pública*, 22, pp.2423–2431.

- Crockett, D.J. & Goudy, S.L., 2014. Cleft Lip and Palate. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 22(4), pp.573–586.
- Croen, L.A. et al., 1998. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983–1992. *American Journal of Medical Genetics*, 79(1), pp.42–47.
- Czeizel, A.E., Tímár, L. & Sárközi, A., 1999. Dose-dependent Effect of Folic Acid on the Prevention of Orofacial Clefts. *Pediatrics*, 104 (6), pp.e66–e66.
- Desmyter, L., 2012. Multigenic etiology of cleft lip and palate. PhD thesis.
- Dietrich, M., Brown, C. & Block, G., 2005. The effect of folate fortification of cereal-grain products on blood folate status, dietary folate intake, and dietary folate sources among adult non-supplement users in the United States. *J Am Coll Nutr*, 24(4), pp.266–74.
- Dixon, M.J. et al., 2011. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nature reviews. Genetics*, 12(3), pp.167–178.
- Dravet, C. et al., 1992. Epilepsy, antiepileptic drugs, and malformations in children of women with epilepsy: a French prospective cohort study. *Neurology*, 42(4), pp.75–82.
- Dudas, M. et al., 2007. Palatal fusion - where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect. *Acta histochemica*, 109(1), pp.1–14.
- Eichberger, T. et al., 2004. FOXE1, A New Transcriptional Target of GLI2 Is Expressed in Human Epidermis and Basal Cell Carcinoma. *J Investig Dermatol*, 122(5), pp.1180–1187.
- Elmazar, M.M.A. & Nau, H., 1992. Methotrexate increases valproic acid-induced developmental toxicity, in particular neural tube defects in mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 12(5), pp.203–210.
- Elsahy, N.I., 1973. The modified striped Y--a systematic classification for cleft lip and palate. *The Cleft palate journal*, 10, pp.247–50.
- Farré, D. et al., 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research*, 31 (13), pp.3651–3653.
- Farronato, G. et al., 2014. Cleft lip and/or palate: review. *Minerva Stomatol*, 63(4), pp.111–26.
- Farronato, G. et al., 2012. Correlations between malocclusions and dyslalias. *Eur J Paediatr Dent*, 13(1), pp.13–18.
- De Felice, M. et al., 1998. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet*, 19(4), pp.395–398.
- Fitchett, J.E. & Hay, E.D., 1989. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Developmental Biology*, 131(2), pp.455–474.
- Forman, D. & Altman, D., 2004. Vitamins to prevent cancer: supplementary problems. *Lancet*, 364(9441), pp.1193–4.
- De Franchis, R. et al., 2002. Spina bifida and folate-related genes: a study of gene-gene interactions. *Genetics in Medicine*, 4(3), pp.126–130.



- Friedman, H.I. et al., 1991. Symbolic Representation of Cleft Lip and Palate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 28(3), pp.252–260.
- Gabrielli, S. et al., 2009. Bilateral cleft lip and palate without premaxillary protrusion is associated with lethal aneuploidies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 34(4), pp.416–418..
- Gato, A. et al., 2002. TGF- $\beta$ 3-Induced Chondroitin Sulphate Proteoglycan Mediates Palatal Shelf Adhesion. *Developmental Biology*, 250(2), pp.393–405.
- Genisca, A.E. et al., 2009. Orofacial Clefts in the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2004. *American journal of medical genetics. Part A*, 149A(6), pp.1149–1158.
- Ghassibe-Sabbagh, M. et al., 2011. FAF1, a Gene that Is Disrupted in Cleft Palate and Has Conserved Function in Zebrafish. *American Journal of Human Genetics*, 88(2), pp.150–161.
- Goudy, S. et al., 2006. Conductive Hearing Loss and Otopathology in Cleft Palate Patients. *Otolaryngology -- Head and Neck Surgery*, 134 (6), pp.946–948.
- Govoni, M. et al., 2006. Il SISTEMA IMMUNITARIO IN GRAVIDANZA: MODIFICAZIONI, ADATTAMENTI E RISPOSTE PATOLOGICHE. *Riv. It. Ost. Gin*, 10, p.504.
- Grant, S.F.A. et al., 2009. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *The Journal of pediatrics*, 155(6), pp.909–13.
- Gritli-Linde, A., 2007. Molecular control of secondary palate development. *Developmental biology*, 301(2), pp.309–26.
- Ha, K.M. et al., 2013. Submucous Cleft Palate: An Often-Missed Diagnosis. *Journal of Craniofacial Surgery*, 24(3).
- Habel, A., Sell, D. & Mars, M., 1996. Management of cleft lip and palate. *Archives of Disease in Childhood*, 74(4), pp.360–366.
- Harville, E.W. et al., 2005. Cleft Lip and Palate versus Cleft Lip Only: Are They Distinct Defects? *American Journal of Epidemiology*, 162 (5), pp.448–453.
- Haworth, K.E. et al., 2007. Sonic hedgehog in the pharyngeal endoderm controls arch pattern via regulation of Fgf8 in head ectoderm. *Developmental biology*, 303(1), pp.244–58.
- Hernández-Díaz, S. et al., 2000. Folic Acid Antagonists during Pregnancy and the Risk of Birth Defects. *New England Journal of Medicine*, 343(22), pp.1608–1614.
- Hiilesmaa, V.K. et al., 1983. Serum folate concentrations during pregnancy in women with epilepsy: relation to antiepileptic drug concentrations, number of seizures, and fetal outcome. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 287(6392), pp.577–579.
- Hill, L. et al., 1988. Maternal drug histories and congenital malformations: limb reduction defects and oral clefts. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 42(1), pp.1–7.
- Holmes, L.B. et al., 2004. The aed (antiepileptic drug) pregnancy registry: A 6-year experience. *Archives of Neurology*, 61(5), pp.673–678.

- Huang, M.H.S., Lee, S.T. & Rajendran, K., 1998. Anatomic Basis of Cleft Palate and Velopharyngeal Surgery: Implications from a Fresh Cadaveric Study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 101(3).
- IPDTC, W.G., 2010. Prevalence at Birth of Cleft Lip With or Without Cleft Palate: Data From the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC). *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 48(1), pp.66–81.
- Iwata, J., Parada, C. & Chai, Y., 2011. The mechanism of TGF- $\beta$  signaling during palate development. *Oral Diseases*, 17(8), pp.733–744.
- Jensen, B.L. et al., 1988. Cleft lip and palate in Denmark, 1976–1981: epidemiology, variability, and early somatic development. *Cleft Palate J*, 25(3), pp.258–269.
- Jiang, R., Bush, J.O. & Lidral, A.C., 2006. Development of the Upper Lip: Morphogenetic and Molecular Mechanisms. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(5), pp.1152–1166.
- Johnson, C.Y. & Little, J., 2008. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *International Journal of Epidemiology*, 37 (5), pp.1041–1058.
- Johnson, K.L. & Bianchi, D.W., 2004. Fetal cells in maternal tissue following pregnancy: what are the consequences? *Human Reproduction Update*, 10 (6), pp.497–502.
- Jones, K.L. et al., 2004. Dysmorphology. *Berman RE, Kliegman RM, Jenson HB. Nelson Textbook of Pediatrics. 17th ed. Philadelphia: WB Saunders*, pp.616–623.
- Kaartinen, V. et al., 1997. Transforming growth factor- $\beta$ 3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Developmental Dynamics*, 209(3), pp.255–260.
- Källén, B., 2003. Maternal Drug Use and Infant Cleft Lip/Palate With Special Reference to Corticoids. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 40(6), pp.624–628.
- Kapp-Simon, K.A., 2004. Psychological issues in cleft lip and palate. *Clinics in plastic surgery*, 31(2),
- Karafiati†, V. et al., 2005. Transcription factor c-Myb is involved in the regulation of the epithelial-mesenchymal transition in the avian neural crest. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(21), pp.2516–2525.
- Kasten, E.F. et al., 2008. Team care of the patient with cleft lip and palate. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 38(5), pp.138–58.
- Kaufman, N.J. & Nichter, M., 2001. The marketing of tobacco to women: global perspectives. *Women and the tobacco epidemic: challenges for the 21st century. Geneva, World Health Organization*, pp.69–98.
- Kent, W.J. et al., 2002. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research*, 12 (6), pp.996–1006.
- Kernahan, D.A., 1971. The striped Y-a symbolic classification for cleft lip and palate. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 47(5).

- Kondo, S. et al., 2002. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nature genetics*, 32(2), pp.285–289.
- Krapels, I.P.C. et al., 2004. Myo-inositol, glucose and zinc status as risk factors for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in offspring: a case–control study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 111(7), pp.661–668.
- Lambie, D. & Johnson, R., 1985. Drugs and Folate Metabolism. *Drugs*, 30(2), pp.145–155.
- Lammer, E.J. et al., 1985. Retinoic Acid Embryopathy. *New England Journal of Medicine*, 313(14), pp.837–841.
- Larsen, M.H. et al., 2010. The 3'-untranslated region of the HLA-G gene in relation to pre-eclampsia: revisited. *Tissue Antigens*, 75(3), pp.253–261.
- Leck, I. & Lancashire, R.J., 1995. Birth prevalence of malformations in members of different ethnic groups and in the offspring of matings between them, in Birmingham, England. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 49(2), pp.171–179.
- Lee, A., Deutinger, J. & Bernaschek, G., 1995. Three dimensional ultrasound: abnormalities of the fetal face in surface and volume rendering mode. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 102(4), pp.302–306.
- Lee, S.-H. et al., 2001. Noggin and retinoic acid transform the identity of avian facial prominences. *Nature*, 414(6866), pp.909–912..
- Lee, W. et al., 2000. Fetal cleft lip and palate detection by three-dimensional ultrasonography. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 16(4), pp.314–320.
- Lee, Y.-H. & Saint-Jeannet, J.-P., 2011. Sox9 function in craniofacial development and disease. *genesis*, 49(4), pp.200–208.
- Leslie, E.J. et al., 2012. Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome wide association on chromosome 1p22. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 94(11), pp.934–942.
- Leslie, E.J. et al., 2015. Identification of Functional Variants for Cleft Lip with or without Cleft Palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by Targeted Sequencing of GWAS Loci. *The American Journal of Human Genetics*.
- Leslie, E.J. & Marazita, M.L., 2013. Genetics of Cleft Lip and Cleft Palate. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, 163(4), pp.246–258.
- Lipinski, R.J. et al., 2010. Cleft lip and palate results from Hedgehog signaling antagonism in the mouse: phenotypic characterization and clinical implications. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 88(4), pp.232–240.
- Little, J., Gilmour, M., Mossey, P.A., FitzPatrick, D., Cardy, A., Clayton-Smith, J. & Fryer, A.E., 2008. Folate and Clefts of the Lip and Palate—A U.K.-Based Case-Control Study: Part I: Dietary and Supplemental Folate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 45(4), pp.420–427.

- Little, J., Gilmour, M., Mossey, P.A., FitzPatrick, D., Cardy, A., Clayton-Smith, J., Hill, A., et al., 2008. Folate and Clefts of the Lip and Palate—A U.K.-Based Case-Control Study: Part II: Biochemical and Genetic Analysis. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 45(4), pp.428–438..
- Little, J. & Bryan, E., 1986. Congenital anomalies in twins. In *Seminars in perinatology*. p. 50.
- Little, J., Cardy, A. & Munger, R.G., 2004. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(3), pp.213–218.
- López-Camelo, J.S. et al., 2005. Reduction of birth prevalence rates of neural tube defects after folic acid fortification in Chile. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 135A(2), pp.120–125.
- Ludwig, K.U. et al., 2012. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nature genetics*, 44(9), pp.968–971.
- Mangold, E. et al., 2010. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet*, 42(1), pp.24–26.
- Marazita, M.L. et al., 2004. Meta-Analysis of 13 Genome Scans Reveals Multiple Cleft Lip/Palate Genes with Novel Loci on 9q21 and 2q32-35. *American Journal of Human Genetics*, 75(2), pp.161–173.
- Marazita, M.L. & Mooney, M.P., 2004. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. *Clinics in plastic surgery*, 31(2), pp.125–40.
- Markus, T. & Booth, P.W., 1995. Managing cleft lip and palate. *BMJ: British Medical Journal*, 311(7008), p.765.
- Mars, M. & Houston, W.J.B., 1990. A Preliminary Study of Facial Growth and Morphology in Unoperated Male Unilateral Cleft Lip and Palate Subjects Over 13 Years of Age. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 27(1), pp.7–10.
- Martinelli, M. et al., 2011. New evidence for the role of cystathionine beta-synthase in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *European Journal of Oral Sciences*, 119(3), pp.193–197.
- Martínez-Alvarez, C. et al., 2000. Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Developmental biology*, 220(2), pp.343–57.
- Marwaha, M. & Nanda, K.D.S., 2012. Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, cleft lip, and palate (EEC syndrome). *Contemporary Clinical Dentistry*, 3(2), pp.205–208.
- Mason, C.A. et al., 2005. Prevalence is the preferred measure of frequency of birth defects. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 73(10), pp.690–692.
- Matalon, S. et al., 2002. The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. *Reproductive Toxicology*, 16(1), pp.9–17.
- McCarthy, J.G., 1990. *Plastic surgery general principles*, WB Saunders Co.
- McDade, S.S. et al., 2012. Genome-wide analysis of p63 binding sites identifies AP-2 factors as co-regulators of epidermal differentiation. *Nucleic Acids Research* .

- Meara, J.G. et al., 2011. Unilateral Cleft Lip and Nasal Repair: Techniques and Principles. *Iranian Journal of Pediatrics*, 21(2), pp.129–138..
- Merritt, L., 2005. Part 1. Understanding the embryology and genetics of cleft lip and palate. *Advances in neonatal care*, 5(2), pp.64–71.
- Messeguer, X. et al., 2002. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* , 18 ( 2 ), pp.333–334.
- Meyer, K.A. et al., 2003. Low maternal alcohol consumption during pregnancy and oral clefts in offspring: The Slone birth defects study. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 67(7), pp.509–514.
- Miettinen, P.J. et al., 1999. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nat Genet*, 22(1), pp.69–73.
- Millard, D.R., 1976. *Cleft Craft: The Unilateral Deformity/D. Ralph Millard*, Little, Brown.
- Miller, T.J., 1972. Cleft palate formation: A role for pyridoxine in the closure of the secondary palate in mice. *Teratology*, 6(3), pp.351–356.
- Mitchell, L.E. et al., 2003. Retinoic Acid Receptor Alpha Gene Variants, Multivitamin Use, and Liver Intake as Risk Factors for Oral Clefts: A Population-based Case-Control Study in Denmark, 1991–1994. *American Journal of Epidemiology* , 158 ( 1 ), pp.69–76.
- Mittermayer, C. et al., 2004. Foetal facial clefts: prenatal evaluation of lip and primary palate by 2D and 3D ultrasound. *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany: 1980)*, 25(2), pp.120–125.
- Mogass, M., Bringas, P. & Shuler, C.F., 2000. Characterization of desmosomal component expression during palatogenesis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 44(3), pp.317–322.
- Monlleó, I.L. & Gil-da-Silva-Lopes, V.L., 2006. Anomalias craniofaciais: descrição e avaliação das características gerais da atenção no Sistema Único de Saúde . *Cadernos de Saúde Pública* , 22 , pp.913–922.
- Mooney, M.P., 2008. Classification of orofacial clefting. In *Comprehensive Cleft Care*. McGraw-Hill. New York, pp. 21–32.
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N. & Torchia, M.G., 2011. *The developing human*, Elsevier Health Sciences.
- Mossey, P.A. et al., 2009. Cleft lip and palate. *Lancet*, 374(9703), pp.1773–85.
- Mossey, P.A. & Catilla, E.E., 2003. Global registry and database on craniofacial anomalies: Report of a WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies.
- Mossey, P.A. & Little, J., 2002. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In D. Wyszynski, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. New York: Oxford University Press: Oxford University Press New York, pp. 127–158.

- Mossey, P.A. & Modell, B., 2012. Epidemiology of Oral Clefts 2012: An International Perspective. In M. Cobourne, ed. *Front Oral Biol.*, vol 16. London, pp. 1–18.
- Mulliken, J.B., 2009. Repair of bilateral cleft lip and its variants. *Indian Journal of Plastic Surgery : Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 42(Suppl), pp.S79–S90..
- Munger, R.G. et al., 2004. Maternal vitamin B-6 and folate status and risk of oral cleft birth defects in the Philippines. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 70(7), pp.464–471.
- Murray, J.C. et al., 1997. Clinical and Epidemiologic Studies of Cleft Lip and Palate in the Philippines. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 34(1), pp.7–10.
- National Academy Press, N., 1998. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*, Washington, DC: The National Academies Press.
- Neiswanger, K. et al., 2007. Orbicularis oris muscle defects as an expanded phenotypic feature in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A(11), pp.1143–1149.
- Nie, X., Luukko, K. & Kettunen, P., 2006. FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders. *Oral Diseases*, 12(2), pp.102–111.
- Nuckolls, G.H., Shum, L. & Slavkin, H.C., 1999. Progress Toward Understanding Craniofacial Malformations. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 36(1), pp.12–26.
- Office on Smoking and Health, U.S., 2001. *Women and Smoking: A Report of the Surgeon General*, Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention.
- Oh, I.-H. & Reddy, E.P., 1999. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, 18(19), pp.3017–3033.
- Osoegawa, K. et al., 2008. Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridization. *Journal of medical genetics*, 45(2), pp.81–86.
- Pan, Y. et al., 2010. IRF6 polymorphisms are associated with nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(10), pp.2505–2511.
- Paranaíba, L.M.R. et al., 2011. Frequency of congenital craniofacial malformations in a Brazilian Reference Center . *Revista Brasileira de Epidemiologia* , 14 , pp.151–160.
- Parker, S.E. et al., 2010. Updated national birth prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004–2006. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 88(12), pp.1008–1016.
- Park-Wyllie, L. et al., 2000. Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: Prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. *Teratology*, 62(6), pp.385–392.
- Pickell, L. et al., 2011. High intake of folic acid disrupts embryonic development in mice. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 91(1), pp.8–19.

- Rahimov, F. et al., 2008. Disruption of an AP-2 $\alpha$  binding site in an IRF6 enhancer is strongly associated with cleft lip. *Nature genetics*, 40(11), pp.1341–1347.
- Rahimov, F., Jugessur, A. & Murray, J.C., 2012. Genetics of Nonsyndromic Orofacial Clefts. *The Cleft palate-craniofacial journal: official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 49(1), pp.73–91.
- Ramana, Y.V. et al., 2005. Audiological Profile in Older Children and Adolescents With Unrepaired Cleft Palate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 42(5), pp.570–573.
- Ramsay, R.G., Ishii, S. & Gonda, T.J., 1992. Interaction of the Myb protein with specific DNA binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (8), pp.5656–5662.
- Randall, P., 1959. A TRIANGULAR FLAP OPERATION FOR THE PRIMARY REPAIR OF UNILATERAL CLEFTS OF THE LIP. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 23(4).
- Ray, J.G. et al., 2003. Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. *The Journal of pediatrics*, 143(6), pp.805–7.
- Richardson, R.J. et al., 2006. Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nat Genet*, 38(11), pp.1329–1334.
- Rojas-Martinez, A. et al., 2010. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 88(7), pp.535–537.
- Romano, M. et al., 2002. Regulation of 3' splice site selection in the 844ins68 polymorphism of the cystathionine  $\beta$ -synthase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), pp.43821–43829.
- Romitti, P.A. et al., 2007. Maternal Periconceptional Alcohol Consumption and Risk of Orofacial Clefts. *American Journal of Epidemiology*, 166 (7), pp.775–785.
- Van Rooij, I.A.L.M. et al., 2003. Does the Interaction between Maternal Folate Intake and the Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Affect the Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate? *American Journal of Epidemiology*, 157 (7), pp.583–591.
- Van Rooij, I.A.L.M. et al., 2004. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Preventive medicine*, 39(4), pp.689–94.
- Rothman, K.J. et al., 1995. Teratogenicity of High Vitamin A Intake. *New England Journal of Medicine*, 333(21), pp.1369–1373.
- Rothman, K.J., Greenland, S. & Lash, T.L., 2008. *Modern Epidemiology*, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Rubini, M. et al., 2005. Cystathionine beta-synthase c.844ins68 gene variant and non-syndromic cleft lip and palate. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 136A(4), pp.368–372.
- Sadler, T.W., 2012. *Langman's medical embryology* 12th ed., Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

- Salyer, K.E. et al., 2009. Skeletal facial balance and harmony in the cleft patient: Principles and techniques in orthognathic surgery. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 42(Suppl), p.S149.
- Satokata, I. & Maas, R., 1994. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*, 6(4), pp.348–356.
- Setó-Salvia, N. & Stanier, P., 2014. Genetics of cleft lip and/or cleft palate: association with other common anomalies. *European journal of medical genetics*, 57(8), pp.381–93.
- Shankarkumar, U. et al., 2011. Role of 14-bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene in recurrent spontaneous abortion patients. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 4(3), pp.143–146.
- Shaw, G.. et al., 1995. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *The Lancet*, 346(8972), pp.393–396.
- Shaw, G.M. et al., 1996. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *American Journal of Human Genetics*, 58(3), pp.551–561.
- Shaw, W.C. et al., 2001. The Eurocleft project 1996-2000: overview. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery: official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 29(3), pp.131–40; discussion 141–2.
- Sheahan, P. et al., 2003. Incidence and outcome of middle ear disease in cleft lip and/or cleft palate. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 67(7), pp.785–793.
- Shkoukani, M.A. et al., 2014. Cleft palate: A clinical review. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 102(4), pp.333–342.
- Shprintzen, R.J. & Golding-Kushner, K.J., 1989. Evaluation of velopharyngeal insufficiency. *Otolaryngologic clinics of North America*, 22(3), pp.519–536.
- Silva Filho, O.G. da, Rosa, L.A. de A. & Lauris, R. de C.M.C., 2007. Influence of isolated cleft palate and palatoplasty on the face . *Journal of Applied Oral Science* , 15 , pp.199–208.
- Simmons, C.J. et al., 2004. Birth defects in Arkansas: Is folic acid fortification making a difference? *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 70(9), pp.559–564.
- Sivertsen, Å. et al., 2008. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ: British Medical Journal*, 336(7641), pp.432–434..
- Sperber, G.H., Sperber, S.M. & Guttman, G.D., 2010. *Craniofacial embryogenetics and development*, PMPH-USA.
- Spielman, R.S., McGinnis, R.E. & Ewens, W.J., 1993. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *American Journal of Human Genetics*, 52(3), pp.506–516.
- Spranger, J. et al., 1982. Errors of morphogenesis: Concepts and terms. *The Journal of Pediatrics*, 100(1), pp.160–165.



- Srichomthong, C., Siriwan, P. & Shotelersuk, V., 2005. Significant association between IRF6 820G→A and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. *Journal of Medical Genetics*, 42(7), pp.e46–e46.
- Stanier, P. & Moore, G.E., 2004. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Molecular Genetics*, 13 (suppl 1), pp.R73–R81.
- Stott-Miller, M. et al., 2010. Increased risk of orofacial clefts associated with maternal obesity: case-control study and Monte Carlo-based bias analysis. *Paediatric and perinatal epidemiology*, 24(5), pp.502–512.
- Stout, M.J. et al., 2014. Increased human leukocyte antigen-G expression at the maternal-fetal interface is associated with preterm birth. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, (0), pp.1–6.
- Strong, E.B. & Buckmiller, L.M., 2001. Management of the cleft palate. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 9(1), pp.15–25.
- Suzuki, K. et al., 2000. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat Genet*, 25(4), pp.427–430.
- Taya, Y., O’Kane, S. & Ferguson, M.W., 1999. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development*, 126 (17), pp.3869–3879.
- Tennison, C.W., 1952. The repair of the unilateral cleft lip by the stencil method. *Plastic and reconstructive surgery*, 9(2), pp.115–120.
- Thellin, O. et al., 2000. Tolerance to the foeto-placental “graft”: ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology*, 12(6), pp.731–737.
- Thompson, J.E., 1912. AN ARTISTIC AND MATHEMATICALLY ACCUR-ATE METHOD OF REPAIRING THE DEFECT IN CASES OF HARELIP. *Transactions of the Southern Surgical and Gynecological Association*, 24, p.367.
- Tolarova, M. et al., 1998. A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft lip and palate anomalies. *Am J Hum Genet*, 63, p.A27.
- Troen, A.M. et al., 2006. Unmetabolized Folic Acid in Plasma Is Associated with Reduced Natural Killer Cell Cytotoxicity among Postmenopausal Women. *The Journal of Nutrition*, 136 (1), pp.189–194.
- Trumpp, A. et al., 1999. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes & Development*, 13(23), pp.3136–3148.
- Tudela, C. et al., 2002. TGF-beta3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. *Int J Dev Biol*, 43(3), pp.333–336.
- Uslu, V.V. et al., 2014. Long-range enhancers regulating Myc expression are required for normal facial morphogenesis. *Nat Genet*, 46(7), pp.753–758.
- Vadasz, S. et al., 2013. Pax7 is regulated by cMyb during early neural crest development through a novel enhancer. *Development*, 140 (17), pp.3691–3702.

- Vanderas, A.P., 1987. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft palate J*, 24(3), pp.216–225.
- Victora, C.G. & Barros, F.C., 2001. Infant mortality due to perinatal causes in Brazil: trends, regional patterns and possible interventions. *Sao Paulo Medical Journal*, 119, pp.33–42.
- Vitamin Study Research Group, M.R.C., 1991. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *The lancet*, 338(8760), pp.131–137.
- Wang, K.H. et al., 2014. Evaluation and integration of disparate classification systems for clefts of the lip. *Frontiers in Physiology*, 5, p.163.
- Warkany, J. & Nelson, R.C., 1940. Appearance of Skeletal Abnormalities in the off spring of Rats Reared on a Deficient Diet. *American Association for the Advancement of Science. Science*, 92, pp.383–384.
- Warkany, J. & Petering, H.G., 1973. Congenital malformations of the brain produced by short zinc deficiencies in rats. *American journal of mental deficiency*, 77(5), pp.645–653.
- Watkins, S.E. et al., 2014. Classification, epidemiology, and genetics of orofacial clefts. *Clinics in plastic surgery*, 41(2), pp.149–63.
- Wehby, G. & Cassell, C.H., 2010. The Impact of Orofacial Clefts on Quality of Life and Health Care Use and Costs. *Oral diseases*, 16(1), pp.3–10.
- Wehby, G. & Murray, J.C., 2010. Folic Acid and Orofacial Clefts: A Review of the Evidence. *Oral diseases*, 16(1), pp.11–19.
- Weinberg, C.R., Wilcox, A.J. & Lie, R.T., 1998. A log-linear approach to case-parent-triad data: assessing effects of disease genes that act either directly or through maternal effects and that may be subject to parental imprinting. *American Journal of Human Genetics*, 62(4), pp.969–978.
- Wilson, A. et al., 1999. A Common Variant in Methionine Synthase Reductase Combined with Low Cobalamin (Vitamin B12) Increases Risk for Spina Bifida. *Molecular Genetics and Metabolism*, 67(4), pp.317–323..
- Winters, J.C. & Hurwitz, D.J., 1995. Presurgical Orthopedics in the Surgical Management of Unilateral Cleft Lip and Palate. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 95(4).
- Wong, W.Y. et al., 1999. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology*, 60(5), pp.253–257.
- Wyszynski, D.F. & Beaty, T.H., 1996. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology*, 53(5), pp.309–317.
- Yao, Y. et al., 2014. Ancestral exposure to stress epigenetically programs preterm birth risk and adverse maternal and newborn outcomes. *BMC medicine*, 12(1), p.121.
- Ysunza, A. et al., 1998. Speech Outcome and Maxillary Growth in Patients with Unilateral Complete Cleft Lip/Palate Operated on at 6 versus 12 Months of Age. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 102(3).

Yuzuriha, S. & Mulliken, J.B., 2008. Minor-Form, Microform, and Mini-Microform Cleft Lip: Anatomical Features, Operative Techniques, and Revisions. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 122(5).

Zhang, Z. et al., 2002. Rescue of cleft palate in *Msx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and *Shh* signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development*, 129 (17), pp.4135–4146.

Zuccherro, T.M. et al., 2004. Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6) Gene Variants and the Risk of Isolated Cleft Lip or Palate. *New England Journal of Medicine*, 351(8), pp.769–780.

**Websites:**

ALGEN-PROMO: [http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)

COGENE: <https://www.facebase.org/>

dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

EMAGE database <http://www.emouseatlas.org/emage/home.php>

EUROCRN: <http://www.eurocran.org/>

FaceBase: [www.FaceBase.org](http://www.FaceBase.org)

Genome browser: <http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?redirect=auto&source=genome.ucsc.edu>

IMER: <http://www.registroimer.it/>

OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

PRIMER 3: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

RTDC: <http://www.rtdc.it/>

TESS: <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>

World Health Organisation: <http://www.who.int/genomics/anomalies/cfaproject/en/>

World Health Organisation: <http://www.who.int/genomics/en/>



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI FERRARA  
- LA LABOR PRACTICE -

Sezioni

## Dottorati di ricerca

Il tuo indirizzo e-mail

frnpla1@unife.it

Oggetto:

"Dichiarazione di conformità della tesi di Dottorato"

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Franceschelli Paola

Nato a:

Ferrara

Provincia:

Ferrara

Il giorno:

25/06/1987

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:

Farmacologia e Oncologia Molecolare

Ciclo di Dottorato

27

Titolo della tesi:

Identificazione di varianti genetiche associate a rischio di Labio/Palatoschisi o Palatoschisi non-sindromiche e di interazioni gene-ambiente in una ampia casistica di triadi Europee

Titolo della tesi (traduzione):

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)

Rubini Michele

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)

MED/03

Parole chiave della tesi (max 10):

labio/palato schisi, palatoschisi, non sindromico, studi di associazione, genetica, cleft lip/palate, cleft palate, non-syndromic, association studies, genetics

Consapevole, dichiara

CONSAPEVOLE: (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 2 copie, di cui una in formato cartaceo e una in formato pdf non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito : <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università, sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla

presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze. DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITA': (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo è del tutto identica a quella presentata in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrà in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie. PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Dichiarazione per embargo

12 mesi

Richiesta motivata embargo

1. Tesi in corso di pubblicazione

Liberatoria consultazione dati Eprints

Consapevole del fatto che attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" saranno comunque accessibili i metadati relativi alla tesi (titolo, autore, abstract, ecc.)

Firma del dottorando

Ferrara, li \_\_\_\_\_ (data) Firma del Dottorando 

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore 