



# Università degli Studi di Ferrara

## DOTTORATO DI RICERCA IN "Farmacologia e Oncologia Molecolare"

CICLO XXIII

COORDINATORE Prof. Cuneo Antonio

### IDENTIFICAZIONE DI LOCI DI SUSCETTIBILITÀ ED INTERAZIONI EPISTATICHE ASSOCIATE ALLO SVILUPPO DI SCHISI OROFACCIALI ISOLATE

Settore Scientifico Disciplinare MED/03

**Dottorando**

Dott. Melissa Ferrian

---

*(firma)*

**Tutore**

Prof. Michele Rubini

---

*(firma)*

Anni 2008/2010

# INDICE

<b>1. Introduzione</b> .....	1
1.1 Malformazioni craniofacciali.....	3
1.2 Cenni di embriologia orofacciale .....	5
1.3 Classificazione delle schisi orofacciali.....	9
1.3.1 Labioschisi con o senza palatoschisi.....	13
1.3.2 Schisi del solo palato.....	15
1.4 Epidemiologia ed eziologia .....	17
1.4.1 Schisi orofacciali sindromiche .....	17
1.4.2 Schisi orofacciali non sindromiche .....	18
1.5 Diagnosi .....	20
1.6 Trattamenti e terapie .....	21
1.7 Rischio di cancro in pazienti con schisi orofacciali.....	23
1.8 Fattori di rischio genetico .....	24
1.9 Fattori di rischio ambientale e prevenzione .....	28
1.10 Epistasi e interazione gene-ambiente nelle malattie complesse.....	33
<b>2. Scopo</b> .....	37
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	41
3.1 Casistica.....	43
3.1.1 Frequenze delle diverse forme di schisi orofacciale .....	44
3.1.2 Rapporto sessi .....	45
3.2 Raccolta campioni biologici ed estrazione del DNA genomico .....	46
3.2.1 Estrazione di DNA genomico da 3 ml di sangue periferico.....	46
3.2.2 Estrazione di DNA genomico da 400 µl di sangue periferico.....	46
3.2.3 Estrazione di DNA genomico da cellule di desquamazione boccale.....	47
3.2.4 Titolazione ed aliquota del DNA genomico.....	48
3.3 Genotipizzazione.....	49
3.3.1 Illumina BeadChips .....	49
3.3.2 Real-Time PCR (TaqMan).....	52
3.3.3 Sequenom.....	53
3.4 Analisi statistiche.....	56
3.4.1 Equilibrio di Hardy-Weinberg.....	56
3.4.2 Calcolo dei limiti di confidenza .....	57
3.4.3 Calcolo dell'odds ratio .....	57
3.4.4 Analisi delle triadi .....	59
3.4.5 Transmission Disequilibrium Test.....	59
3.4.6 Analisi Log-Lineare dei Rischi Relativi .....	60
3.4.7 Analisi Log-Lineare dell'interazione gene-ambiente .....	63
3.4.8 Test esatto di Fisher.....	64

3.4.9 La correzione di Yates.....	65
3.4.10 La correzione di Bonferroni.....	65
3.5 Multifactorial Dimensionality Reduction (MDR).....	66
3.5.1 Preparazione e caratteristiche dei dati .....	66
3.5.2 Dettagli del metodo e configurazione dei parametri.....	68
3.5.3 Risultati e output del programma.....	69
<b>4. Risultati</b> .....	<b>71</b>
4.1 Associazione tra FAF1 e le palatoschisi .....	73
4.1.1 Frequenze genotipiche e geniche.....	73
4.1.2 Transmission disequilibrium test.....	74
4.1.3 Analisi Log-lineare dei Rischi Relativi .....	76
4.1.4 Analisi log-lineare dell'interazione Gene-Ambiente .....	78
4.1.4.1 Analisi GEI con la supplementazione con folati in gravidanza .....	78
4.1.4.2 Analisi GEI con l'esposizione in gravidanza al fumo di sigaretta .....	79
4.2 Associazione tra IRF6 e le Labio/Palatoschisi.....	81
4.2.1 Frequenze genotipiche e geniche.....	81
4.2.2 Transmission disequilibrium test.....	82
4.2.3 Analisi log-lineare dei Rischi Relativi .....	84
4.2.4 Analisi log-lineare dell'interazione Gene-Ambiente .....	87
4.2.4.1 Analisi GEI con la supplementazione con folati in gravidanza .....	87
4.2.4.2 Analisi GEI con l'esposizione in gravidanza al fumo di sigaretta .....	88
4.3 Analisi Genome-wide di Loci associati a Labio/Palatoschisi.....	90
4.3.1 Caratterizzazione del locus cromosomico 8q24.21 .....	91
4.4 Studio di Replicazione .....	94
4.4.1 Associazione tra Loci GWAS e Labio/Palatoschisi .....	96
4.4.1.1 Transmission Disequilibrium Test .....	98
4.4.1.2 Analisi Log-lineare dei Rischi Relativi .....	107
4.5 Analisi di interazioni epistatiche e gene-ambiente.....	115
<b>5. Discussione</b> .....	<b>119</b>
5.1 Ricerca dei maggiori loci associati a Labio/Palatoschisi.....	120
5.2 Ruolo di FAF1 nell'eziologia delle Palatoschisi.....	121
5.3 Individuata in IRF6 la prima variante di suscettibilità per Labioschisi .....	124
5.4 Primo studio Genome-wide nelle Labio/Palatoschisi: identificati i principali loci di suscettibilità .....	128
5.5 Identificata la prima interazione epistatica alla base dell'eziologia delle Labio/Palatoschisi .....	132
5.6 Conclusioni .....	134
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>137</b>

# 1. Introduzione

---

## 1. Introduzione

## 1.1 Malformazioni craniofacciali

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 regolazione dei normali processi tissutali coordinati tra loro, nella determinazione del destino cellulare e nella differenziazione di particolari tipi di cellule durante l'embriogenesi (Nuckolls et al., 1999).

Nella regione cranica alcuni tessuti scheletrici e connettivi sono derivati dalle creste neurali; tra questi vi sono cartilagine, ossa, dentina, vasi, ghiandole, tessuto connettivo del derma, muscolatura liscia e tessuto adiposo. Qualsiasi alterazione del normale processo di migrazione e differenziazione delle cellule della cresta neurale può portare perciò all'insorgenza di malformazioni.

Tra le malformazioni craniofacciali alla nascita, vi sono situazioni molto gravi e irreversibili, incompatibili con la vita, e altre invece trattabili chirurgicamente. Ne riportiamo di seguito una breve descrizione:

- Anencefalia: malformazione congenita mortale caratterizzata dalla mancata chiusura del tubo neurale nella zona cefalica. Prevede la mancanza della volta cranica nell'embrione con esposizione di una massa di tessuto neurale degenerato nella parte alta del cranio.
- Encefalocele: malformazione mortale caratterizzata da erniazione del cervello o delle meningi, attraverso una deformazione del cranio.
- Oloprosencefalia: difetto causato da una divisione disuguale del prosencefalo embrionale, che può portare a sviluppo incompleto dei lobi cerebrali, ciclopia, dimorfismi facciali, come schisi, ipo- o ipertelorismo.
- Ipo- o ipertelorismo interpupillare: durante lo sviluppo embrionale e fetale, la posizione relativa degli occhi cambia drasticamente in cui, da una situazione molto divergente si passa gradualmente ad una convergenza. Lo sviluppo della distanza interorbitale è un avvenimento piuttosto complesso. La diminuzione o l'aumento anomalo della distanza tra i due occhi alla nascita viene definita rispettivamente ipo- e ipertelorismo. È curabile tramite intervento di ricostruzione chirurgica.
- Craniosinostosi: prevede la chiusura prematura di suture del cranio, con possibile malformazione della testa ed aumentata pressione nel cervello, che può portare a ritardo mentale. In genere è trattata tramite interventi chirurgici del cranio e delle altre strutture facciali che risultano malformate.
- Microsomia emifacciale: difetto di sviluppo che colpisce la metà più bassa del viso, soprattutto le orecchie, la bocca e la mandibola. Può colpire uno o entrambi i lati della faccia ed è curabile chirurgicamente dopo lo sviluppo infantile.
- Schisi orofacciale: difetto alla nascita che prevede la mancata chiusura o la chiusura incompleta di due tessuti embrionali, che nascono separati e si fondono durante il normale

## 1. Introduzione

sviluppo embrionale craniofacciale. In genere colpisce il labbro superiore ed il palato, ma può anche avvenire tra altri organi della faccia (come ad esempio tra labbro e occhio, o tra labbro e orecchio). Le schisi orofacciali sono i difetti alla nascita più frequenti nella popolazione umana; vengono in genere trattate chirurgicamente (Cohen, 2002).

## 1.2 Cenni di embriologia orofacciale

Il labbro e le regioni palatali si sviluppano a partire dal palato primario e dal palato secondario embrionali. Più in specifico, il palato primario dà origine al labbro, all'alveolo dentale anteriore e al palato anteriore fino al forame incisivo; il palato secondario invece contribuisce alla formazione dei restanti palati duri e molli (Wong and Hagg, 2004).

L'intero scheletro facciale deriva dalle cellule della cresta neurale; qualsiasi fattore che impedisce la crescita o la differenziazione di questa popolazione cellulare può avere un impatto nello sviluppo di schisi orofacciali (Jugessur et al., 2009).

Il normale sviluppo della faccia inizia con la delaminazione delle cellule della cresta neurale dalle pieghe neurali del prosencefalo, mesencefalo e romboencefalo, con la loro migrazione all'interno del tessuto mesenchimale nella regione di sviluppo craniofacciale; ciò avviene alla IV settimana dello sviluppo embrionale umano (Mossey et al., 2009).

Il complesso maxillo-mandibolare deriva da cinque primordi facciali presenti attorno allo stomodeo (regione destinata a dar luogo alla cavità orale): la prominenza frontale (in posizione cefalica rispetto allo stomodeo), determinata dalla sporgenza del sovrastante cervello anteriore; i processi mandibolari (in posizione caudale rispetto allo stomodeo), che si originano dal primo arco faringeo e i processi mascellari (in posizione laterale rispetto allo stomodeo), che si originano dalla porzione dorsale del primo arco faringeo (Figura 1.2.1).

Da ciascun lato del processo frontale e proprio sopra allo stomodeo si costituisce un ispessimento dell'ectoderma superficiale, il placode nasale. Durante la V settimana si formano due creste, i processi nasali esterno e interno, che circondano il placode nasale, che si trasforma così nel pavimento di una depressione: la fossa nasale.

Durante le due settimane successive i processi mascellari continuano ad accrescersi medialmente e spingono i processi nasali mediani verso la linea mediana così che questi si fondono tra loro e allo stesso tempo si fondono lateralmente con i processi mascellari (Jugessur et al., 2009; Mossey et al., 2009). Si costituisce così il labbro superiore, formato quindi dalla fusione dei due processi nasali mediali e dei due mascellari (Sadler, 2006). I processi nasali laterali non partecipano alla formazione del labbro superiore, ma formano le alette del naso. Immediatamente prima del completamento di questo processo i processi laterali nasali, sviluppati dalla prominenza frontonasale, hanno un picco di divisione cellulare che li rende suscettibili ad insulti teratogenici (Mossey et al., 2009).

Come risultato dell'accrescimento mediale dei due processi mascellari, i due processi nasali interni si fondono, oltre che in superficie, anche a un livello più profondo. Le strutture che si formano costituiscono il segmento intermascellare che comprende le seguenti componenti:

- una labiale, che forma il filtro e il tubercolo del labbro superiore;
- una mascellare superiore, dove erompono i quattro denti incisivi;
- una palatina, che forma il palato primitivo.



## 1. Introduzione

Anche una piccola porzione della parte interna del naso deriva dal segmento intermascellare e forma la columella e la punta del naso. Cranialmente, il segmento mascellare si continua con la porzione rostrale del setto nasale, formato dal processo frontale.

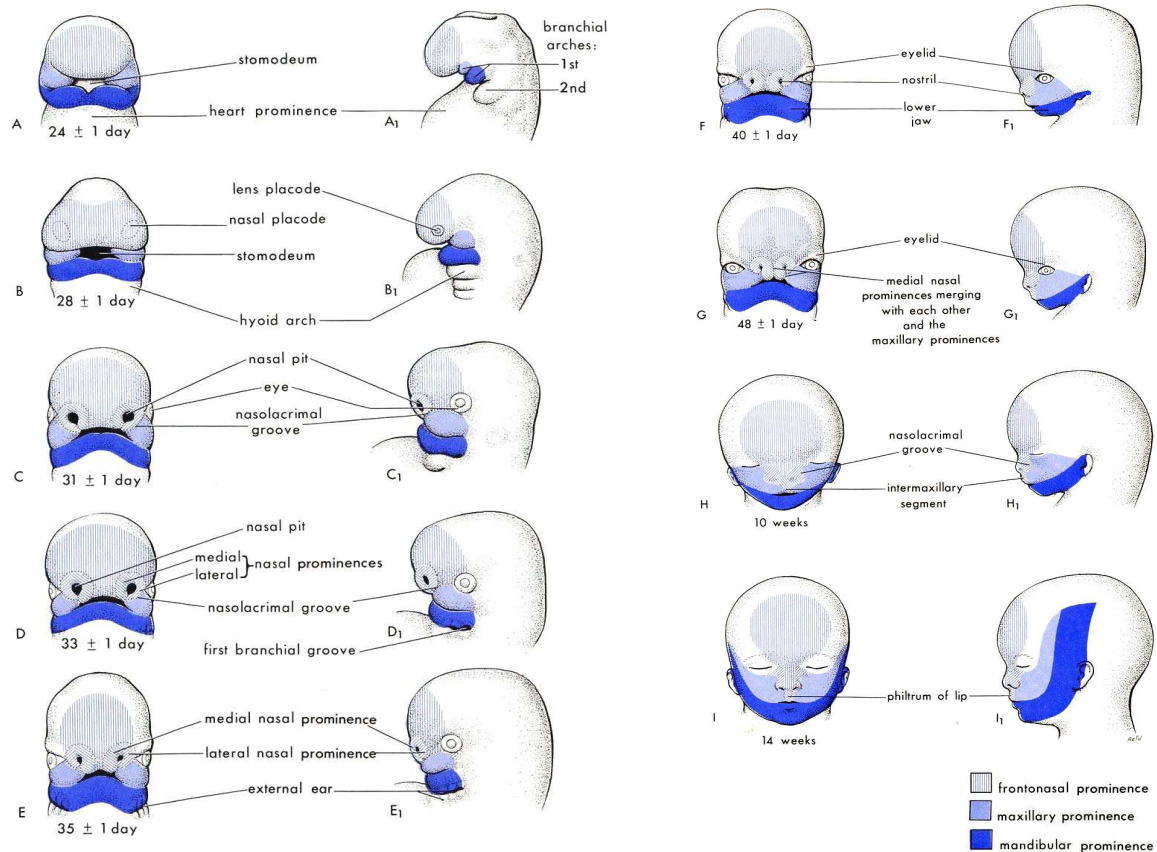


Figura 1.2.1: Visione frontale e laterale della testa di un feto, a diversi stadi di sviluppo. Evidenziati in blu i tre processi dai quali si formerà il complesso maxillo-mandibolare (Moore, 1982).

Durante la VI settimana si verifica la fusione del labbro e le lamine palatali laterali si sviluppano dai processi mascellari che delimitano lo stomodeo (Robertson, 1984). Contemporaneamente, la crescita della lingua procede molto rapidamente, così che essa riempie completamente la cavità oro-nasale intorno alla VII settimana.

La crescita simultanea delle lamine palatali fa sì che esse siano forzate in basso da ogni lato della radice della lingua, occupando l'ultimo spazio disponibile.

La crescita della camera dello stomodeo durante l'VIII settimana consente alla lingua di cadere nella parte più bassa della cavità e libera le lamine palatali. Esse sono allora capaci di slittare in un piano orizzontale, prendendo contatto sulla linea mediana con il setto nasale e, anteriormente, con il palato primario (Figura 1.2.2).

Il passaggio dalla posizione verticale a quella orizzontale delle lamine palatali si compie in poche ore, iniziando prima negli embrioni maschili che non nei femminili; questa differenza rende forse conto della differente incidenza della palatoschisi nei due sessi.

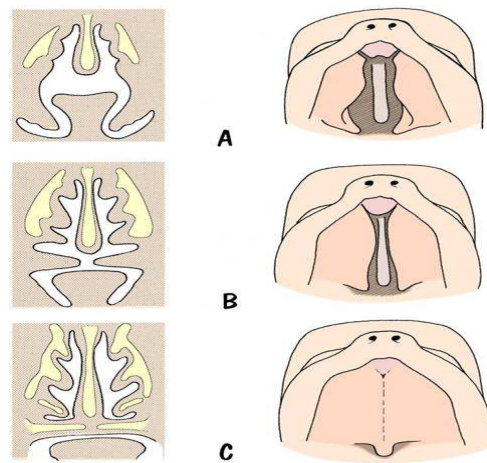


Figura 1.2.2: Schema dello sviluppo delle rime palatine in sezione verticale (sinistra) con relativa sezione orizzontale della fusione del palato secondario (destra) (<http://www.bionalogy.com>).

Successivamente, le estremità libere di queste lamine si incontrano portando a contatto i due epiteli ai bordi mediali (Medial Edge Epithelium, MEE) consentendo quindi la loro fusione, con formazione della cucitura epiteliale mediale (Midline Epithelial Seam, MES) che successivamente degenera e permette di ottenere una continuità mesenchimale del palato. Si forma così il palato secondario (Mossey et al., 2009).

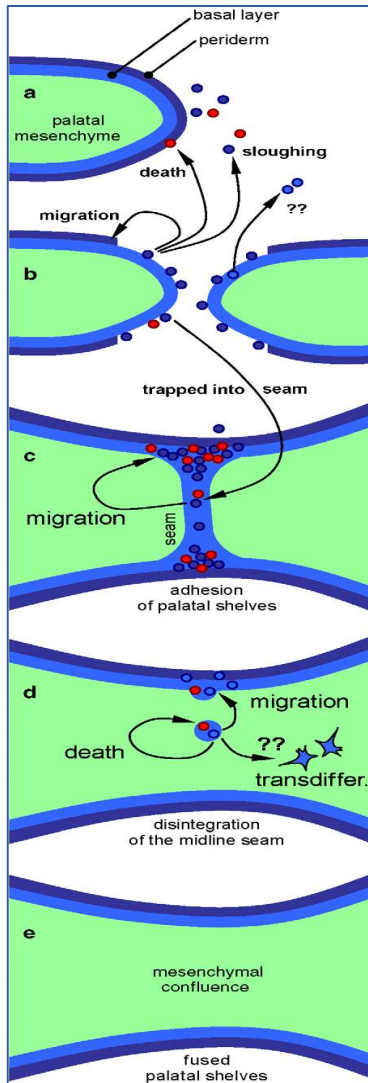
Il MEE è composto da due strati cellulari: uno strato basale interno di cellule cuboidali ed uno strato superficiale di cellule piatte (periderma). Quest'ultimo strato si desquama gradualmente man mano che i due processi palatini si avvicinano, se ciò non avviene non ci sarà fusione e si originerà una schisi (Dudas et al., 2006).

Una volta formata la MES, le cellule del periderma che vi rimangono intrappolate potrebbero in parte morire e in parte migrare nei due triangoli di epitelio orale (sotto) e nasale (sopra).

Le cellule cuboidali della MES scompaiono anch'esse, ma il processo con cui ciò avviene non è ancora chiaro: potrebbero morire per apoptosi, o migrare, o transdifferenziarsi in cellule mesenchimali, oppure potrebbero avvenire tutti e tre questi eventi in combinazione (Figura 1.2.3) (Dudas et al., 2006).

Quando la scomparsa delle cellule della MES è completata il mesenchima dei due processi palatini confluisce e permette la creazione di un unico palato secondario. Il mesenchima del palato poi si differenzia in ossa nel palato duro e muscolo nel palato molle.

## 1. Introduzione



Successivamente, palato primario, palato secondario e setto nasale, generati indipendentemente, devono fondersi nei loro siti di contatto; questa fusione viene completata alla X settimana dell'embriogenesi (Jugessur et al., 2009; Mossey et al., 2009).

Lo sviluppo del palato secondario nei mammiferi divide la cavità oro-nasale in due cavità separate, quella orale e quella nasale, permettendo così la masticazione e la respirazione simultanea (Mossey et al., 2009).

Figura 1.2.3: Schema dei possibili destini delle cellule che formano la MES;

A: processo palatino prima della fusione, è composto da mesenchima (in verde), strato di cellule cuboidali (in azzurro) e periderma (in blu).

B: prima del contatto tra i due processi palatini, alcune cellule del periderma si desquamano e si disperdono nel liquido amniotico, altre forse muiono (in rosso), altre potrebbero migrare nell'epitelio orale e nasale.

C: alcune cellule del periderma potrebbero rimanere intrappolate tra i due processi palatini nella MES, dove muiono o continuano a migrare nei triangoli di epitelio nasale e orale.

D: le cellule basali cuboidali delle MES potrebbero scomparire per apoptosi, migrazione o differenziazione in cellule mesenchimali, o ancora per la somma di questi processi combinati.

E: dopo la scomparsa delle cellule della MES, il mesenchima dei due processi palatini confluisce formando un unico palato secondario (Dudas et al., 2006).

### 1.3 Classificazione delle schisi orofacciali

Non è semplice determinare una classificazione chiara delle schisi orofacciali, in quanto esistono diversi criteri.

Una prima distinzione può essere fatta in base alla presenza o meno di altre malformazioni nel neonato che presenta schisi. È possibile perciò avere schisi orofacciali isolate e schisi orofacciali accompagnate da altre malformazioni. All'interno delle schisi orofacciali accompagnate da altre malformazioni, si possono distinguere eziologicamente:

- schisi orofacciali legate a sindrome monogenica:
  - Sindrome di Van der Woude (VWS): disordine dello sviluppo ad eredità autosomica dominante caratterizzato da fistole o fossette sul labbro inferiore e schisi del labbro superiore e/o schisi del palato. È causata da mutazioni sul gene IRF6 che codifica per il Fattore di Regolazione dell'Interferone 6;
  - Sindrome Popliteale del Pterygium (PPS): disordine che accompagna malformazioni orofacciali a deformazioni degli arti e dei genitali, causata anch'essa da mutazioni sul gene IRF6;
  - displasia ectodermica: sindrome che prevede la presenza di sindattilia, displasia ectodermica e schisi orofacciale, causata da mutazioni nel gene che codifica per il recettore di herpesvirus/molecola di adesione cellulare PVRL1 (NCBI OMIM, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

In realtà le sindromi sono moltissime, circa 200 sindromi associate alle schisi labiali e 400 associate alle schisi palatali (NCBI OMIM, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).
- schisi orofacciali legate a sindrome cromosomica;
- schisi orofacciali associate ad altre mutazioni ad eziologia sconosciuta (Multiple Congenital Anomaly, MCA).

Clinicamente, quando la schisi compare con altre malformazioni in un quadro eziologico conosciuto e riconducibile ad una sola causa, essa è classificata come sindromica (Syndromic Cleft Lip with/without/or cleft Palate, SCL/P). Se invece appare come isolata o non riconducibile ad una sindrome viene riconosciuta come non sindromica (Non-Syndromic Cleft Lip with/without/or cleft Palate, NSCL/P) (Wong & Hagg, 2004).

Questa classificazione primaria è fondamentale negli studi di associazione in quanto le schisi sindromiche, sono malattie mendeliane, mentre quelle non sindromiche sono malattie complesse in cui sono coinvolti fattori multipli, genetici e ambientali (Cobourne, 2004).

La distinzione tra SCL/P e NSCL/P non è sempre chiara infatti alcune famiglie presentano SCL/P, ma alcuni membri sono affetti dalla sola schisi orofacciale isolata, a causa di una differente manifestazione della sindrome (Wong & Hagg, 2004).

Nella pratica clinica odierna è necessaria una rappresentazione grafica semplice e di rapida comprensione per indicare tutte le possibili forme di schisi, in modo da diminuire il tempo

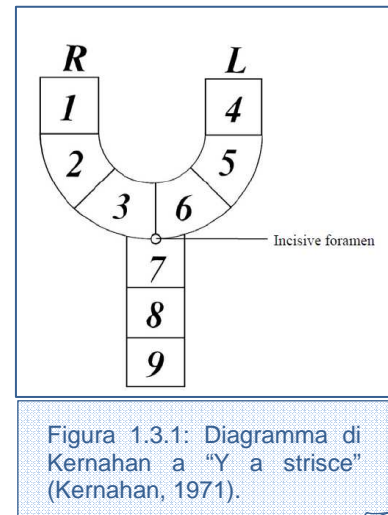
## 1. Introduzione

necessario a ricostruire la storia clinica di un paziente, rendere disponibili a tutti le informazioni raccolte e identificare rapidamente l'entità e il possibile trattamento di una malformazione.

Nel 1971 Kernahan ha cercato di risolvere questo problema ed ha pubblicato il suo diagramma "Y a strisce" dove ha rappresentato simbolicamente la classificazione dei vari tipi di schisi.

In Figura 1.3.1 è rappresentato il diagramma di Kernahan che consiste in una Y quadrettata e numerata dove, ad ogni numero, corrisponde una determinata zona della bocca:

- 1: labbro destro;
- 2: alveolo destro;
- 3: area destra del palato duro dall'alveolo al forame incisivo;
- 4: labbro sinistro;
- 5: alveolo sinistro;
- 6: area sinistra del palato duro dall'alveolo al forame incisivo;
- 7, 8: palato duro;
- 9: palato molle.



L'area colpita da schisi in ogni paziente viene indicata evidenziando i rispettivi segmenti sul diagramma e questo serve come registrazione visiva iniziale di prima diagnosi. In Figura 1.3.2 sono rappresentate le varie forme di schisi utilizzando il diagramma di Kernahan. Riscontrando difficoltà nel registrare alcune condizioni particolari della patologia, negli anni si sono susseguite modificazioni più o meno valide del diagramma di Kernahan. Ne è un esempio il grafico rappresentato da Elshahy nel 1973, dove sono state aggiunte delle regioni in più all'originale diagramma "Y a strisce".

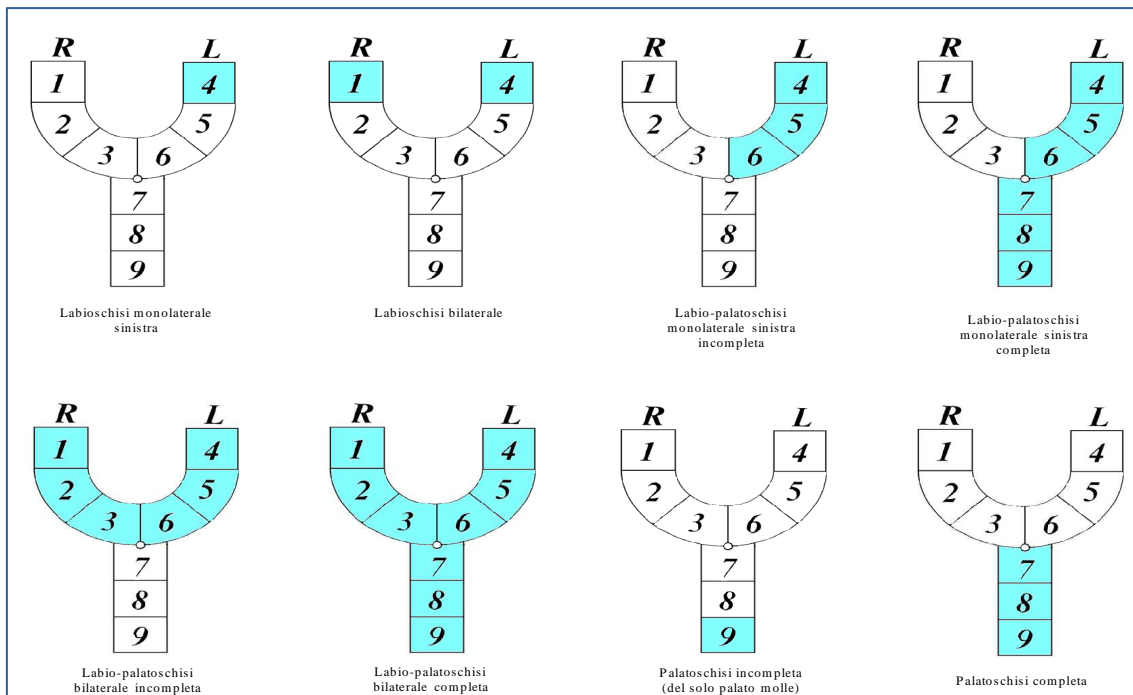


Figura 1.3.2: Rappresentazione delle principali forme di schisi nel diagramma di Kernahan.

In questo nuovo diagramma (Figura 1.3.3) le zone sono state così ripartite:

- 1,5: base delle narici;
- 2,6: labbro superiore;
- 3,7: alveolo;
- 4,8: palato duro anteriore al forame incisivo;
- 9, 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;
- 11: palato molle;
- 12: superficie faringea posteriore;
- 13: pre-mascella (Elsahy, 1973).

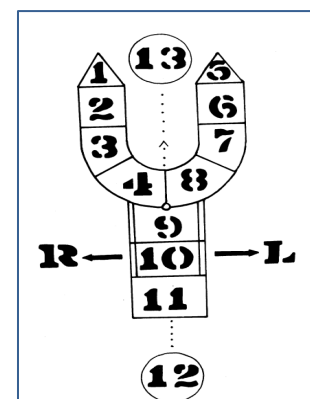
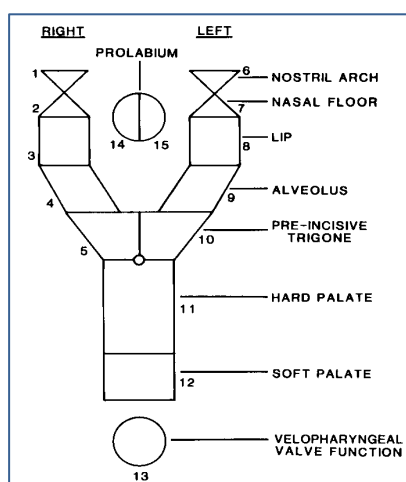


Figura 1.3.3: Diagramma "Y a strisce" modificato (Elsahy, 1973).



Altra rappresentazione leggermente modificata è quella proposta da Friedman e collaboratori nel 1991 (Figura 1.3.4) dove vengono rappresentati anche gli archi nasali (triangolini 1 e 6), oltre che il pavimento delle narici.

Figura 1.3.4: Diagramma "Y a strisce" modificato (Friedman et al., 1991).

## 1. Introduzione

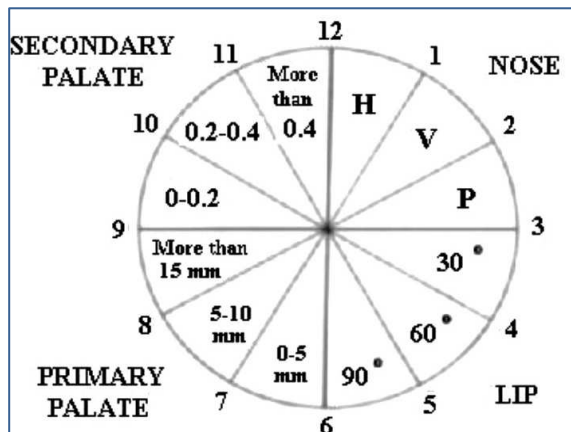


Figura 1.3.5: Diagramma "a orologio" per la classificazione del tipo e della severità della schisi (Rossell-Perry et al., 2009).

Recentemente (2009) Rossell-Perry ha proposto un nuovo diagramma "ad orologio", totalmente modificato rispetto al digramma di Kernahan, dove compaiono anche i gradi di severità (lieve, medio e severo) della malformazione per ogni zona colpita da schisi (Figura 1.3.5). Tenere conto del grado di severità della malformazione può essere utile, soprattutto in ambito clinico, per gestire meglio un piano di trattamenti chirurgici e riabilitativi specifico caso per caso.

In senso orario, il primo "quarto d'ora" rappresenta il naso ed è suddiviso in tre parti a seconda della gravità della malformazione che

colpisce questa regione; il secondo "quarto d'ora" rappresenta il labbro con tre possibili range di rotazione del bordo superiore del labbro colpito da schisi; il terzo "quarto d'ora" riproduce il palato primario suddividendo in tre range di larghezza la gravità della schisi; infine, l'ultimo quarto descrive il palato secondario suddividendosi in tre categorie di gravità in base ad un indice che tiene conto della larghezza della schisi e di altri parametri del palato affetto.

Anche questa rappresentazione grafica però presenta dei limiti in quanto manca di informazioni sul segmento laterale, sul setto nasale e sulla zona pre-mascellare. Inoltre non è ben chiara la modalità di rappresentazione delle schisi bilaterali nel grafico.

Il labbro e il palato primario hanno un'origine eziologica diversa rispetto al palato secondario, proprio per questa ragione un'altra distinzione principale tra i vari tipi di schisi orofacciali consiste nella suddivisione delle schisi del labbro con/senza/o del palato (Cleft Lip with/without/or cleft Palate, CL/P) in:

- labioschisi con o senza palatoschisi (Cleft Lip with or without cleft Palate, CLP);
- schisi del solo palato (Ceft Palate Only, CPO), che comprende solo quelle strutture derivate dal palato secondario, cioè il palato molle e il palato duro, e non il processo alveolare ed il labbro superiore (Mossey et al., 2009).

Anche questa suddivisione risulta di rilevante importanza negli studi di associazione in quanto, avendo un'eziologia diversa, queste due classi di malformazioni possono essere associate a fattori diversi.

### 1.3.1 Labioschisi con o senza palatoschisi

Le labbra della bocca sono definite con i nomi labbro superiore e labbro inferiore, posti a ricoprire le due arcate gengivo-dentali. Possono essere divise in tre parti: parte cutanea, orlo rosa e parte mucosa. La prima corrisponde alla superficie anteriore del labbro: il suo epitelio è cheratinizzato, vi è la presenza di numerose ghiandole sebacee e sudoripare, le papille della sottomucosa hanno un'altezza modesta. La parte mucosa corrisponde al margine dorsale del labbro: l'epitelio è di tipo molle, non sono presenti né ghiandole sebacee né sudoripare, le papille hanno un'altezza decisamente maggiore rispetto alla parte cutanea. L'orlo rosa infine, può essere considerato come una parte di transizione fra quella mucosa e quella cutanea. Presenta, infatti, caratteristiche intermedie, quali l'altezza delle papille, un epitelio paracheratinizzato, e la presenza di rare ghiandole sebacee, ma non di sudoripare.

I due margini liberi delle labbra circoscrivono l'apertura buccale o rima orale. Lateralmente e bilateralmente il labbro superiore e quello inferiore confluiscono l'uno nell'altro nella formazione nota come commessura labiale, che corrisponde ai cosiddetti angoli della bocca. A seconda della larghezza della rima orale, le commessure labiali sono situate a livello dei denti canini oppure dei primi premolari.

La labioschisi (cheiloschisi) o più comunemente "labbro leporino", è una malformazione congenita piuttosto comune, dovuta alla mancata saldatura delle due porzioni del labbro superiore del neonato.

Le labioschisi compaiono nella regione del margine del filtro e possono essere sia incomplete (o parziali) che complete (o totali). Le labioschisi unilaterali incomplete si manifestano come incisioni del bordo vermiglio e della parte cutanea del labbro; a seconda dell'estensione, vi può essere deviazione laterale dell'ala del naso.

Nelle labioschisi unilaterali complete vi è fissurazione dell'intero labbro sino al vestibolo del naso; in questi casi l'ala del naso risulta deviata lateralmente, in cui la forma e la posizione delle cartilagini nasali risultano alterate. In particolare, l'ala del naso è deformata (collasso) verso il lato della schisi e la columella è tirata verso il lato opposto. Il setto (lamina di osso e di cartilagine che separa le due fosse nasali) è deviato verso una narice, e causa difficoltà respiratorie da quel lato, inoltre il pavimento nasale è incompleto e provoca un'anomala comunicazione tra cavità orale e cavità nasale.

Le labioschisi incomplete e complete bilaterali si manifestano in maniera analoga a quelle unilaterali, con la differenza che la deformazione del naso è impercettibile. Il labbro superiore è diviso in tre parti dalla fissurazione bilaterale; la sua parte centrale corrisponde al segmento della premaxilla (Figura 1.3.1.1).

Un'altra categoria di labioschisi sono le microforme o forme a frusta, per microforma (forma a frusta) s'intende quella in cui le strutture cutanee e mucose appaiono indenni mentre è interrotta la continuità anatomica del muscolo orbicolare.



## 1. Introduzione

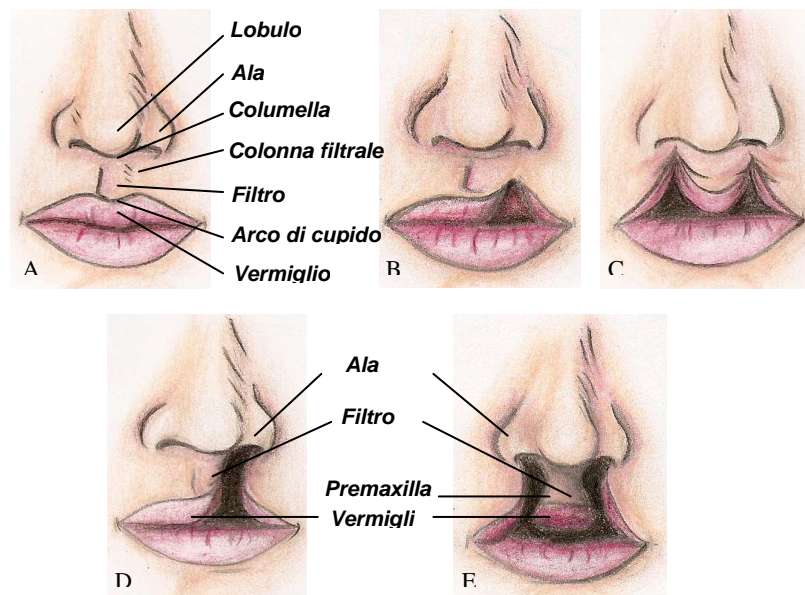


Figura 1.3.1.1: Rappresentazione del labbro normale, non affetto da labioschisi (A), (B) labioschisi unilaterale incompleta, (C) labioschisi bilaterale incompleta, (D) labioschisi unilaterale completa e (E) labioschisi bilaterale completa.

La labioschisi può accompagnarsi alla palatoschisi (labiopalatoschisi o cheilognatopalatoschisi) ad anomalie dentarie, a malformazioni delle cartilagini o alla mancata saldatura della mascella e delle ossa nasali.

Le labiopalatoschisi, sono malformazioni della faccia che colpiscono il labbro superiore, il processo alveolare, il palato duro e molle, tali strutture sono interessate da una fissurazione di ampiezza variabile.

Nella labiopalatoschisi completa unilaterale sono separati il labbro e tutto il palato, cosicché sul lato della schisi manca l'intera parte ossea del pavimento del naso (Figura 1.3.1.2, A). Il setto nasale è spostato con il vomere verso il lato sano e questo altera la simmetria della regione del terzo medio della faccia. L'ala del naso è appiattita in misura diversa a seconda della larghezza della schisi. Nelle labiopalatoschisi complete bilaterali, che rientrano tra le malformazioni facciali più gravi, manca da entrambi i lati l'intera struttura ossea del pavimento nasale (Figura 1.3.1.2, B). La premaxilla risulta isolata, retta dal vomere e dal setto nasale e può essere estremamente mobile. Talvolta essa è ben inserita nel processo alveolare; nella maggior parte dei casi, tuttavia, sporge in avanti. Spesso la columella del naso è poco accentuata e, di conseguenza, la punta del naso è estremamente appiattita.

La cresta alveolare, di fronte al palato duro, è la cresta ossea appena sopra le gengive. Se la fessura influisce sulla cresta alveolare, sia in tutto o come una tacca minore (Figura 1.2.3.2, C e D), può influenzare l'allineamento dei denti, la loro mancanza o il loro sovrannumero (Furlan, 2003).

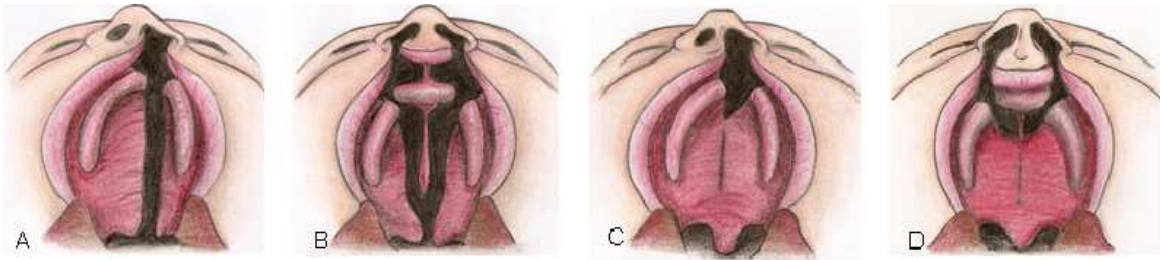


Figura 1.3.1.2: Rappresentazione grafica delle diverse forme di labiopalatoschisi: (A) labiopalatoschisi completa unilaterale, (B) labiopalatoschisi completa bilaterale, (C) labiopalatoschisi incompleta unilaterale e (D) labiopalatoschisi incompleta bilaterale.

### 1.3.2 Schisi del solo palato

Il palato è la regione anatomica che costituisce il tetto della cavità buccale. Ha forma ogivale ed è in parte sostenuta da uno scheletro osseo (palato duro), in parte costituita unicamente da strutture mucose e muscolari (palato molle) (Figura 1.3.2.1).

Il palato molle, detto anche velo palatino, è una lamina muscolare rivestita completamente in superficie da una tonaca mucosa. Continua verso l'indietro la struttura del palato duro, ma non è sostenuta dalla presenza di alcuna struttura scheletrica. La lamina ha forma quadrilatera ed è un po' concava in avanti ed in basso, dove forma la parte superiore dell'istmo delle fauci. Il palato molle è dotato di grande mobilità; la sua posizione e i suoi movimenti sono importanti nel corretto svolgimento di funzioni quali la deglutizione, la fonazione, la respirazione, etc. Nel palato molle si distinguono una faccia anteriore ed una posteriore, un margine superiore, uno inferiore e due laterali. La faccia anteriore è rivolta verso la cavità orale ed è concava, liscia ed uniformemente rosea. Presenta un gran numero di sbocchi di canali ghiandolari. La faccia posteriore non è visibile all'ispezione diretta della cavità orale, essendo rivolta verso la faringe; è molto ricca di strutture linfatiche facenti parte del cosiddetto "anello di Weldeyer". Il margine inferiore del palato molle è dotato di caratteri peculiari. Esso è di forma concava e presenta sulla linea mediana un prolungamento a forma di cono detto ugola, estremamente mobile.

Lateralmente all'ugola, da entrambi i lati, il margine inferiore del palato molle si sdoppia e forma i due archi palatini, anteriore e posteriore. Fra i due archi palatini risulta compresa l'importante struttura linfatica detta tonsilla palatina (o semplicemente tonsilla). La tonaca mucosa del palato molle ricopre come un'ampia piega la struttura muscolare sottostante.

La tonaca mucosa che ricopre il palato duro è di colorito roseo, simile a quello delle gengive. Sulla linea mediana la tonaca mucosa è percorsa da una sottile linea biancastra detta rafe mediano del palato duro; rappresenta una delle linee di saldamento dei due emisomi fetali che ancora persistono nell'adulto. Nella metà anteriore del palato si notano dipartirsi, da entrambi i lati del rafe mediano, una serie di pieghe disposte verso l'alto e verso l'indietro, dette pieghe palatine. Si notano anche piccole prominente corrispondenti alle ghiandole palatine; osservando attentamente

## 1. Introduzione

si nota anche la presenza degli sbocchi delle stesse (orifici delle ghiandole palatine). La tonaca mucosa che riveste il palato duro ha notevoli affinità con quella che riveste le gengive. In effetti, lateralmente e verso il basso, la mucosa del palato duro si continua direttamente con quella della faccia vestibolare delle gengive dell'arcata dentale superiore. Con le gengive, anche la mucosa del palato aderisce molto strettamente al periostio sottostante soprattutto in corrispondenza del rafe mediano; in altri punti ne è lievemente distaccato dalla presenza delle ghiandole palatine, che sono tubulo-acinose composte.

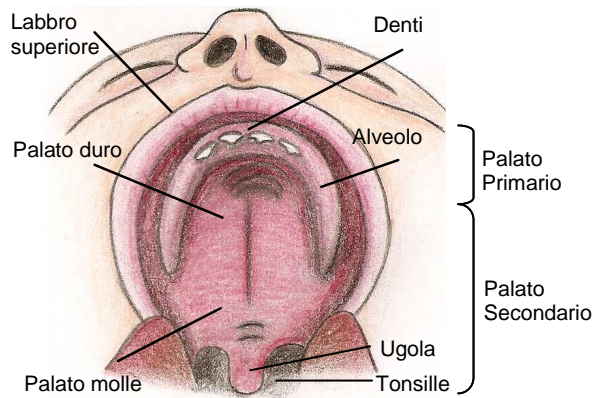


Figura 1.3.2.1: Anatomia del palato.

La palatoschisi è una malformazione congenita del palato, che si presenta come una fessura della parte anteriore del palato duro; nelle forme più gravi interessa anche il margine alveolare del palato, la volta palatina, il palato molle e l'ugola.

Come la schisi del labbro, la palatoschisi risulta da un'alterazione nella sequenza di eventi che portano alla fusione tra lato destro e sinistro sulla linea mediana. L'estensione della fessura varia da persona a persona (Furlan, 2003).

La palatoschisi può assumere due forme distinguibili: a forma di V, che è più comune nelle schisi isolate, o a forma di U, comune nella sequenza di Pierre Robin e nelle schisi sindromiche.

Le variazioni nella struttura fra vari tipi di schisi sono legate a diversi meccanismi coinvolti nel processo di fusione. Fra i vari tipi di palatoschisi vi sono le schisi del palato molle, difetto limitato alla muscolatura del velo pendulo (Figura 1.3.2.2, A) e schisi del palato duro e molle (Figura 1.3.2.2, B). Sia il palato duro che il palato molle sono coperti da una membrana mucosa. In alcuni casi, la mucosa può apparire intatta, ma le ossa e/o i muscoli sotto di essa non sono adeguatamente fusi sulla linea mediana. Nonostante il suo aspetto superficiale, quasi normale, è in grado di creare problemi funzionali, in particolare nella fonazione. Questo tipo di schisi è nota come "palatoschisi sottomucosa". Una schisi sottomucosa a volte può essere sentita come una depressione nel palato osseo solo se palpata con un dito. Spesso una palatoschisi sottomucosa è associata all'ugola bifida (Figura 1.3.2.2, C).

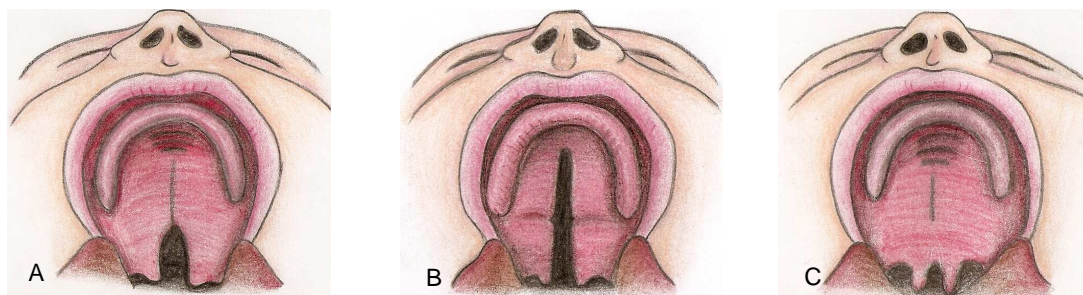


Figura 1.3.2.2: Rappresentazione grafica delle diverse forme di palatoschisi: (A) schisi del solo palato molle, (B) schisi del palato duro e molle e (C) ugola bifida.

## 1.4 Epidemiologia ed eziologia

La frequenza alla nascita di CL, CLP e CPO è sconosciuta in molte parti del mondo e, a causa di diversi tipi di stratificazione tra i campioni, risulta anche difficile confrontare valori provenienti da popolazioni diverse.

La labioschisi associata o meno a palatoschisi e la palatoschisi isolata si presentano come entità distinte dal punto di vista epidemiologico, eziologico ed embriologico (Fraser, 1955; Silvertsen et al., 2008); con una prevalenza di 1/2 su 1000 nati per CLP e di 1 su 1500/2000 per CPO, costituendo insieme circa i 2/3 delle malformazioni cranio facciali (Lidral et al., 2005).

Dai dati registrati tra gli anni 1993-1998, si ricava una prevalenza europea che varia da 3,4 a 22,9 su 10000 nati per CLP e una prevalenza tra 1,3 e 25,3 su 10000 nati per CPO (Mossey et al., 2009).

Nel 50% dei casi la labioschisi è accompagnata da palatoschisi (Stanier and Moore, 2004). I tassi di labioschisi con o senza palatoschisi sono alti in parte dell'America Latina e in Asia, bassi in Israele, Sud Africa e Sud Europa; i tassi di palatoschisi sono alti in Canada e in parte del Nord Europa e bassi in parte dell'America Latina e nel Sud Africa (Mossey et al., 2009).

CLP è più frequente nei maschi, mentre CPO è più frequente nelle femmine in tutti i diversi gruppi etnici, nonostante il rapporto sessi sia variabile nelle diverse (Mossey et al., 2009).

L'incidenza della palatoschisi presenta una certa eterogeneità etnica ed è comunemente calcolata a 1/1500-2000 nati vivi (Stanier and Moore, 2004; Kirschner and LaRossa, 2000; Nguyen and Sullivan, 1993), con una predominanza nel genere femminile (Strong and Buckmiller, 2001; Stanier and Moore, 2004; Kirschner and LaRossa, 2000; Nguyen and Sullivan, 1993).

In generale, le schisi orofacciali nel 70% dei casi sono non sindromiche (Meng et al., 2009). In particolare in Europa, le labioschisi con o senza palatoschisi sono al 71% isolate e al 29% associate ad altre anomalie; le schisi del solo palato sono nel 55% dei casi isolate, e nel restante 45% associate ad altre malformazioni (Mossey et al., 2009).

### 1.4.1 Schisi orofacciali sindromiche

Una sindrome è un insieme di malformazioni multiple. Una particolare malformazione può avere espressività variabile, per esempio l'ugola bifida (Figura 1.3.2.2, C) è una minima espressione, detta micro forma, della palatoschisi. Una sindrome può essere definita come un insieme di anomalie multiple che si pensano essere patologicamente collegate. Spesso una sindrome, ma non sempre, ha un'eziologia monofattoriale, si riconosce dunque un unico fattore genetico la cui alterazione determina il fenotipo clinico.

Una malformazione congenita sindromica è caratterizzata da fenomeni di pleiotropia durante lo sviluppo embrionale, in cui un insieme di malformazioni sequenziali, apparentemente non collegate tra loro, si manifestano, infatti le malformazioni che caratterizzano la sindrome si presentano in aree di sviluppo embrionale non contigue e quindi che non possono influenzarsi a vicenda in una

## 1. Introduzione

normale cascata di eventi durante lo sviluppo embrionale, non si possono quindi considerare, a livello descrittivo della struttura embrionale, legate tra loro.

Le schisi orofacciali sindromiche si possono distinguere in schisi orofacciali legate a sindrome monogenica, schisi orofacciali legate a sindrome cromosomica e schisi orofacciali associate ad altre mutazioni ad eziologia sconosciuta.

Numerose sono le sindromi accompagnate da schisi orofacciali in particolare più di 200 sindromi associate alle schisi labiali e 400 associate invece alle schisi palatali; fra le sindromi mendeliane si possono distinguere le più importanti come la sindrome di Van der Woude (VWS), disordine dello sviluppo ad eredità autosomica dominante caratterizzato da fistole o fossette sul labbro inferiore e schisi del labbro superiore e/o schisi del palato, la sindrome popliteale del pterygium (PPS), disordine che accompagna malformazioni orofacciali a deformazioni degli arti e dei genitali, entrambe causate da mutazioni sul gene IRF6 (Kondo et al., 2002; Kayano et al., 2003; Kim et al., 2003; Ghassibe et al., 2004; Item et al., 2005; Du et al., 2006; Brosch et al., 2007), che codifica per il Fattore di Regolazione dell'Interferone 6, la displasia ectodermica, sindrome che prevede la presenza di sindattilia, displasia ectodermica e schisi orofacciale, causata da mutazioni nel gene che codifica per il recettore di herpesvirus/molecola di adesione cellulare PVRL1 (Suzuki et al., 2000), la sindrome di Waardenburg, gruppo di condizioni ereditarie, causate da mutazioni a livello del gene PAX3 (Tassabehji et al., 1992), caratterizzate da albinismo (pelle, capelli e colore degli occhi molto chiari), sordità parziale e schisi orofacciale e la Sindrome di Pierre Robin (PRS) o sequenza di Pierre Robin, caratterizzata da una mandibola insolitamente piccola (micrognazia), disposizione posteriore o retrazione della lingua (glossoptosi), e ostruzione delle vie aeree superiori. La chiusura incompleta del palato (palatoschisi), è presente nella maggioranza dei pazienti, ed esso è di solito a forma di U. Si tratta di una sequenza, dato che la schisi del palato molle è secondaria a un difetto dello sviluppo della mandibola. La sequenza di Pierre Robin isolata (in assenza di altre malformazioni associate) è presente in circa la metà dei casi. Circa il 10% delle forme isolate è familiare, ma il gene(i)-malattia non è ancora noto.

Appartengono invece alle sindromi cromosomiche la sindrome di Wolf-Hirschhorn, disturbo genetico determinato dalla parziale delezione cromosomica del braccio corto del cromosoma 4, include ritardo mentale, microcefalia, ipotonia e schisi orofacciale; la sindrome di Kallmann, condizione genetica caratterizzata da ipogonadismo ipogonadotropo e da anosmia, determinata da una delezione cromosomica del braccio corto del cromosoma X e la Sindrome di DiGeorge, malattia causata dalla delezione di un pezzo del cromosoma 22, caratterizzata principalmente da difetti cardiaci, anomalie facciali, immunodeficienza T, palatoschisi, ipocalcemia.

### 1.4.2 Schisi orofacciali non sindromiche

Ad oggi non ci sono linee guida specifiche per la definizione delle schisi orofacciali non sindromiche. Una prima definizione fu: le schisi orofacciali non sindromiche sono quelle schisi che sono associate con al massimo una anomalia maggiore e al massimo due anomalie minori

(Jones,1988). Le anomalie maggiori sono generalmente considerate quelle che provocano alterazioni funzionali oppure quelle estetiche che però richiedono interventi chirurgici multipli. Le anomalie minori sono quelle che non comportano alterazioni funzionali, lievi alterazioni estetiche e che si presentano in meno del 5% dei casi nella popolazione. La tendenza è quindi quella di considerare schisi orofacciali non sindromiche quelle che presentano il fenotipo di schisi isolato. Negli anni quindi si è pensato di restringere la definizione precedente e di considerare quindi non sindromiche quelle schisi che non si presentano associate ad anomalie maggiori e che presentano al massimo due anomalie minori. Va detto, però che alcune forme sindromiche di schisi orofacciali sono associate con due o meno anomalie minori, è il caso ad esempio della sindrome di Van der Woude che si caratterizza per una storia familiare positiva per schisi orofacciali miste e dalla presenza di fossette o fistole sul labbro inferiore.

Confrontate con altre patologie, le schisi orofacciali hanno un elevato tasso di ricorrenza familiare. Il rischio di CL/P nei fratelli di soggetti affetti è 40 volte più alto rispetto alla normale prevalenza nella popolazione e i discendenti di individui malati hanno un rischio maggiore del 2-5% di manifestare anch'essi la malformazione (Lidral et al., 2005).

Il rischio di ricorrenza nei familiari di primo grado di un soggetto malato è pari a 32 volte per la labioschisi, e a 56 volte per la palatoschisi, rispetto al rischio nella popolazione normale. Nei gemelli il tasso di concordanza è pari al 40-60% nei monozigoti e al 3-5% nei dizigoti (Jugessur et al., 2009).

Questi dati sottolineano la rilevanza dei fattori genetici nell'eziologia delle schisi orofacciali; tuttavia, la mancanza di una completa concordanza suggerisce anche che i fattori ambientali giocano un ruolo determinante in queste malformazioni.

## 1.5 Diagnosi

Durante le visite ecografiche in corso di gravidanza, a partire dalla XII settimana è possibile effettuare la diagnosi prenatale di labiopalatoschisi.

La diagnosi di una palatoschisi non è sempre facile, tuttavia un medico esperto può rilevare un movimento atipico della lingua. Nel caso di una palatoschisi di grandi dimensioni, la lingua si muove in alto in uno spazio aperto (schisi) nel tetto della cavità orale, la lingua quindi viene ad occupare una posizione anomala (posteriore e verticale nella cavità orale).

Recentemente è stata introdotta un'ecografia tridimensionale per la diagnosi prenatale delle schisi orofacciali, che sembra promettente per il riconoscimento di un una schisi orofacciale nel feto. L'ecografia tridimensionale permette di visualizzare il feto in tre dimensioni, mostrando un volume e non solo un piano di sezione, come avviene durante l'ecografia tradizionale bidimensionale.

Nel 2003, Mittermayer e Lee hanno riportato un caso, di una donna di 29 anni a 30 settimane di gestazione, in cui è stato individuato nel feto, in sede d'esame ecografico bidimensionale di routine, una schisi labiale unilaterale sinistra. Anche nelle ecografie di follow-up, eseguite a 35 e 38 settimane di gestazione, è stata confermata la schisi sinistra (Figura 1.5.1). Sorprendentemente, l'ecografia 3D a 38 settimane di gestazione ha rivelato la labioschisi ma sul lato destro (figura 1.5.2).



Figura 1.5.1: Immagine ecografica in 2D (a 38 settimane di gestazione) in cui è presente una labioschisi monolaterale sinistra (Mittermayer and Lee, 2003).



Figura 1.5.2: Immagine ecografica in 3D (a 38 settimane di gestazione) in cui è evidente la presenza di labioschisi monolaterale destra (Mittermayer and Lee, 2003).

Una spiegazione del motivo per cui la labioschisi è stata erroneamente considerata sul lato sinistro, può essere dovuto ad un effetto ottico causato dalla vista frontale obliquo dell'ecografia 2D della schisi, probabilmente vicina alla linea mediana.

L'ecografia 3D permette, grazie alla visualizzazione esclusiva delle strutture ossee, di caratterizzare meglio il difetto, discriminando tra un difetto di labioschisi e di labiopalatoschisi. Diversi studi hanno dimostrato che l'ecografia 3D è un metodo diagnostico per schisi orofacciali migliore rispetto all'ecografia 2D (Lee et al., 1995; Lee et al., 2000; Chen et al., 2001; Johnson et al., 2000).

## 1.6 Trattamenti e terapie

Correggere le deformazioni facciali e ottimizzare anche la qualità di fonazione sono due aspetti fondamentali nella cura delle schisi, ma non sono da sottovalutare neanche le terapie psicologiche e gli aspetti emotivi, in quanto è stato dimostrato che soggetti adulti che hanno avuto una completa riparazione della schisi del labbro o del palato percepiscono un forte disagio per ciò che riguarda il loro carattere e la vita sociale (Marcusson, 2001).

Le OFC richiedono quindi trattamenti medico-chirurgici eseguiti da specialisti. La chirurgia ricostruttiva va eseguita in più tappe in base all'accrescimento facciale, mentre trattamenti di riabilitazione ortofonologopedica e della deglutizione sono da eseguirsi precocemente (Vasan, 1999).

La labioschisi se non è trattata precocemente, peggiora aumentando l'ampiezza della schisi, e nelle forme bilaterali può anche provocare un abnorme accrescimento della premaxilla.

Quindi prima s'interviene, più semplice è la chiusura della schisi e migliore è il risultato estetico. Esistono numerose tecniche per la chiusura di tali elementi, anche se ultimamente per quanto compete al labbro è stata adottata praticamente ovunque la tecnica di Millard. Anche i tempi (cioè la maggiore o la minore precocità dell'intervento) possono variare molto secondo le Scuole. Infatti i servizi e i protocolli per il trattamento dei bambini affetti da schisi differiscono da un paese all'altro, basti pensare che solo in Europa, nei 201 team che operano la labio-palatoschisi unilaterale completa, sono applicati 194 diversi protocolli chirurgici (Mossey et al., 2009).

Da un'analisi accurata dei risultati ottenuti, si è arrivati alla conclusione che (compatibilmente con i problemi anestesilogici, non indifferenti per bambini così piccoli), il tempo ottimale per una labioplastica è intorno ad un mese di vita e quello per una palatoplastica intorno ai tre mesi.

L'intervento di labioplastica, secondo Millard, eseguito ad un mese d'età è senza dubbio quello che dà i migliori risultati anche se passibili d'ulteriori ritocchi.

Soltanto in caso di schisi molto aperta si deve procedere prima all'unione delle due parti staccate mediante una "lip adhesion", per procedere poi in un secondo tempo all'intervento vero e proprio. In presenza di una labioschisi bilaterale l'intervento deve essere eseguito contemporaneamente sui due lati interessati, ma comprende un tempo in più, che avviene alcuni mesi dopo per permettere l'allungamento della columella (per ottenere cioè un naso che non sia troppo schiacciato in punta).

In entrambi i casi, è di fondamentale importanza l'unione del muscolo orbicolare per evitare che il neo labbro si presenti poco mobile, con dei rigonfiamenti laterali molto antiestetici (essi rappresentano una delle stigmate delle labioschisi specialmente nell'atto di fischiare).

Purtroppo questa malformazione non si limita a colpire la regione del labbro, ma estende la sua influenza anche alle cartilagini dell'ala nasale, impedendo loro un normale sviluppo. Questo fa sì che il lato colpito si presenti ipoplasico con conseguente appiattimento e distorsione della narice dal lato affetto, e da tutti e due i lati in casi labioschisi bilaterale. Questa alterazione va corretta progressivamente durante la crescita per fare in modo da evitare di avere nell'età adulta una deformazione troppo seria e perciò molto difficile da correggere. Infine la malformazione



## 1. Introduzione

finisce per alterare tutta la struttura del naso con formazione di "gibbo" (la cosiddetta gobba) e deviazione dello stesso a causa del setto che si presenta inevitabilmente sempre deviato.

La chirurgia del naso culmina perciò intorno ai 18 anni nell'uomo, ed ai 16-17 nelle donne, con una rino-settoplastica funzionale che ha il duplice scopo di dare un buon aspetto alla piramide nasale eliminando i vari inestetismi e permettere una buona respirazione correggendo la deviazione del setto nonché la conseguente ipertrofia dei turbinati.

Per quanto riguarda la chirurgia del palato, come già accennato va eseguita possibilmente intorno ai tre mesi d'età, avendo cura di ripristinare nel modo più accurato possibile tutte le strutture anatomiche dello stesso. Ovviamente per evitare sequele cicatriziali, l'intervento va eseguito in un tempo solo, questo anche per fare in modo che il bambino tragga il massimo vantaggio dalla mobilità del palato molle, cosa che è alla base di una buona dizione, cioè ad una mancanza di rinolalia aperta.

Molto più complicata invece è la terapia ortodontica, che consiste appunto nel riportare nella giusta posizione i denti che crescono storti o che non sono presenti per agenesia degli stessi. Com'è facilmente intuibile la malformazione si manifesta pure a livello delle gengive e dei germi dentali con conseguenze importanti che riguardano l'eruzione dei denti definitivi o permanenti.

Esiste, infatti, la possibilità che molti dei denti anteriori tipo incisivi, canini e premolari possono mancare o uscire nelle sedi più disparate, (come nel palato) perciò devono essere riportati in asse mediante trattamenti ortodontici. Molti di essi poi possono essere aiutati a scendere nella loro sede abituale con innesti ossei che possono anche fare da impalcatura per stabilizzare le due arcate mascellari.

Nella gran totalità dei casi infine il mascellare tende a svilupparsi meno della mandibola sia per gli innumerevoli interventi a cui è stato sottoposto sia per un proprio deficit d'accrescimento. Questo fa sì che l'aspetto dell'adolescente che è stato affetto da labiopalatoschisi sia un prognatico, cioè tenda ad avere la mandibola più sviluppata del mascellare. Ciò può in parte essere prevenuto sia con appropriati trattamenti ortodontici o con allestimento di maschere contenitrici, purtroppo però la maggior parte di tali soggetti deve essere sottoposto ad interventi d'avanzamento del mascellare o riposizionamento della mandibola o di tutte e due contemporaneamente (Furlan, 2003).

La labiopalatoschisi è una malformazione molto complessa che richiede una serie d'interventi che si protraggono dalla nascita fino all'età adulta e che devono essere eseguiti da persone diverse. Sono perciò indispensabili un chirurgo plastico ed un ortodontista, ma non sono da escludere i logopedisti e psicologi.

Questi ultimi poi svolgono un ruolo molto importante nell'adolescenza quando il soggetto tendenzialmente sente gravare le imperfezioni sul suo viso generalmente lievi e relegate a piccole cicatrici come un "disagio" che lo rende imperfetto ai suoi occhi e a quelli dei suoi coetanei.

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 quel che riguarda l'impatto sociale e psicologico, ma anche per la società in termini di costi medici a lungo termine (Stanier and Moore, 2004; Wong and Hagg, 2004).

Negli Stati Uniti si stima che il costo dei vari trattamenti, che deve subire un paziente affetto da schisi orofacciale nel corso della sua vita, ammonti approssimativamente a 100000 \$ (Jugessur et al., 2009).

## 1.7 Rischio di cancro in pazienti con schisi orofacciali

Alcuni studi sono orientati a dimostrare una particolare associazione tra soggetti nati con schisi orofacciale e un aumento del rischio di insorgenza di cancro: una ricerca condotta su pazienti Danesi nel 2005 (Bille et al., 2005) ha voluto mettere a confronto l'incidenza di cancro tra soggetti con schisi orofacciali e individui appartenenti alla popolazione generale. I dati statisticamente più significativi, sono stati ottenuti in un'analisi senza stratificazione di sottogruppi di schisi dove è stato constatato infatti, un aumento di rischio di cancro al seno in soggetti con schisi orofacciale non sindromica rispetto ad individui normali. Stratificando invece secondo il sesso, è stato registrato un incremento d'insorgenza di cancro al seno e al cervello fra donne affette da schisi orofacciali, mentre fra i maschi affetti da schisi orofacciale aumenta il rischio di sviluppare cancro ai polmoni (Bille et al., 2005).

L'ipotesi comune è che alcuni geni implicati nello sviluppo normale siano coinvolti anche nella tumorigenesi. Individui affetti da schisi orofacciale hanno una vita breve e ciò può essere ritenuto conseguenza dell'insorgenza di tumori (Windham et al., 1985; Nishi et al., 2000).

Zhu e colleghi infatti hanno riportato un incremento del rischio di cancro in bimbi affetti da schisi orofacciale, un altro studio ha riportato un aumento del rischio di cancro in soggetti affetti da labiopalatoschisi (Billie et al., 2005).

Recenti studi hanno supportato l'ipotesi che alcuni geni siano implicati nelle malformazioni e nel cancro, in particolare il pathway di FGF (Fibroblast Growth Factor) è stato associato a diversi tipi di cancro, in particolare cancro gastrico e al colon-retto (Jang et al., 2001), al seno (Easton et al., 2007; Hunter et al., 2007) e al colon-retto (Sonvilla et al., 2008).

Frebourg et al., nel 2006 hanno individuate mutazioni nel gene CDH1 (epithelial cadherin), proteine di adesione cellulare espresse nelle cellule epiteliali, in due famiglie in cui uno o due membri erano affetti da cancro gastrico e schisi orofacciali.

Lammi et al., nel 2004, hanno riportato mutazioni in AXIS inhibition protein 2 (AXIN2) che hanno causato oligodontia (assenza di sei o più denti) e un aumento di suscettibilità di sviluppare cancro al colon retto. Tale suscettibilità è stata confermata anche da Menezes et al., nel 2008 in pazienti affetti da CL/P.

## 1.8 Fattori di rischio genetico

Lo studio delle schisi orofacciali ha una ricca storia nella genetica umana e fornisce un modello per lo studio di malattie complesse in generale. Vi sono diversi approcci possibili per l'analisi di geni in associazione a malattie:

- studi caso-controllo: prevedono il confronto di genotipi tra casi, cioè soggetti affetti, e controlli, cioè soggetti sani non relazionati ai casi. Questo tipo di studi presenta il vantaggio di creare abbastanza facilmente una casistica numerosa, è molto facile però incorrere in errori di selezione, che possono originare dalla scelta inadeguata dei casi o, più comunemente, dei controlli. Infatti se questi ultimi non sono rappresentativi della popolazione generale, l'associazione eventualmente osservata nel campione potrebbe essere diversa da quella presente nella popolazione. Un altro possibile errore è rappresentato dalla differenza d'informazione ottenuta dai casi rispetto ai controlli. In particolare, i casi spesso tendono ad attribuire ad avvenute esposizioni l'insorgenza della loro patologia, per cui possono ricordare meglio o più intensamente l'avvenuta esposizione;
- studi basati su famiglie e studi di triadi: prevedono un confronto tra alleli trasmessi e alleli non trasmessi da genitori a figli affetti. Questo approccio consente di disporre di controlli interni e supera i limiti connessi con il modello caso-controllo, lo svantaggio invece sta nel trovare una casistica di triadi abbastanza numerosa;
- studi di interazione genica: più loci possono essere studiati in contemporanea, in studi caso-controllo o in studi di triadi, in cerca di una combinazione di fattori associati alla comparsa di malattia.

L'individuazione di loci candidati da studiare può avvenire in diversi modi:

- modelli animali, uso di topi knock-out: l'uso di modelli murini transgenici può permettere di individuare loci che, se mutati, inducono la comparsa della patologia in esame;
- studi genome-wide: studi di associazione che coprono tutto il genoma possono essere utili per individuare nuovi loci di suscettibilità;
- metodo del gene candidato: per esempio, un gene causale per una sindrome che ha come caratteristica la schisi orofacciale, può avere un ruolo anche nell'eziologia delle schisi non sindromiche.

Di seguito sono riportati alcuni esempi di loci e geni studiati in associazione a schisi orofacciali non sindromiche:

- **TGF $\alpha$**

Questo fattore si lega al recettore di crescita epidermica (EGFR) dando un effetto simile a quello indotto dall'EGF; inoltre, esso è espresso nei tessuti del palato in via di sviluppo, soprattutto nella MES (Lidral and Moreno, 2005). Diversi studi hanno registrato un'associazione di TGF $\alpha$  con CL/P (Ardinger et al., 1989; Marazita et al., 2004), altri studi però non hanno confermato ciò (Jugessur et al., 2003).

- **TGFβ3**

Il knock-out di questo gene in modelli murini inibisce la normale fusione tra i processi palatini (Nawshad et al., 2004); topi *Tgfβ3*<sup>-/-</sup> presentano diversi difetti nel MEE tra cui eccesso di proliferazione cellulare, perdita di apoptosi e mancata adesione (Jugessur et al., 2009). Nei polli, dove normalmente il palato secondario è aperto, la somministrazione di TGFβ3 esogena induce la fusione del palato (Nawshad et al., 2004). Nell'uomo recenti analisi genome-wide riportano una certa associazione del locus di TGFβ3 con CL/P (Marazita et al., 2004).

- **MSX1**

Fattore necessario per l'espressione delle proteine BMPs (soprattutto BMP4) nel mesenchima palatale e di SHH (Sonic Hedgehog) nel MEE (Jugessur et al., 2009). Topi knock-out per questo gene sviluppano schisi del palato e altre anomalie craniofacciali (Van den Boogaard et al., 2000). In studi abbastanza recenti è stato registrato che mutazioni in MSX1 sono presenti nel 2% dei pazienti affetti da CL/P non sindromico (Jezewski et al., 2003).

- **PDGFC**

In topi knock-out per questo gene le ossa del palato non si estendono e causano una schisi completa del palato secondario che porta alla morte perinatale per problemi respiratori (Ding et al., 2004). Da studi in Zebrafish sembra che questo fattore sia importante per la chemio-attrazione delle cellule della cresta neurale nella zona del palato (Eberhart et al., 2008). Diversi studi supportano la presenza di un'associazione tra il locus contenente PDGFC e le schisi orofacciali nell'uomo (Jugessur et al., 2009).

- **Famiglia di FGFR**

Si pensa che il segnale trasmesso da questa famiglia di molecole recettrici di FGF sia essenziale per la normale distribuzione delle cellule della cresta neurale nei primordi facciali (Jugessur et al., 2009). A conferma di questa ipotesi si è visto che topi mutanti nel gene *Fgfr1* presentano difetti craniofacciali, tra cui schisi (Trokovic et al., 2003). Nell'uomo diverse forme sindromiche, che riportano tra le loro caratteristiche anche schisi orofacciali, sono determinate da mutazioni nei geni che codificano per una delle tre possibili forme di questi recettori (FGFR1, 2 e 3) (Jugessur et al., 2009). Recentemente, l'analisi di diversi polimorfismi in pazienti affetti da schisi orofacciale non sindromica ha permesso di identificare alcune mutazioni associate presenti nei geni della famiglia di FGFR (Riley and Murray, 2007).

- **IRF6**

Mutazioni in questo gene causano due importanti sindromi: la Sindrome di Van der Woude (VWS) e la Sindrome Popliteale del Pterigium (PPS), le quali presentano come malformazione principale la schisi orofacciale. Diversi studi sull'uomo hanno confermato un'associazione di polimorfismi in questo gene anche con le forme non sindromiche di CL/P (Zuccherò et al., 2004; Rahimov et al., 2008); in particolare, un recente lavoro di Rahimov e collaboratori (2008) ha trovato una significativa associazione di uno SNP, rs642961, sul gene IRF6 che distrugge un sito di legame per il fattore di trascrizione AP-2α. Questa scoperta è una diffusa

## 1. Introduzione

concordanza tra i diversi studi incentrati su questo gene rendono IRF6 uno dei più significativi fattori di rischio genetico per le schisi non sindromiche.

### ▪ **FOXE1**

Membro della famiglia di fattori di trascrizione con dominio a forcina. Mutazioni di questo gene sono associate alla sindrome di Bamfort-Lazarus che include, fra le sue caratteristiche, anche la schisi del palato (Jugessur et al., 2009).

Diversi studi recenti hanno verificato l'esistenza di un'associazione di FOXE1 nelle schisi isolate (Marazita et al., 2004; Marazita et al., 2009; Moreno et al., 2009).

### ▪ **TBX22**

Questo gene è stato il primo identificato come locus causale di una sindrome: la palatoschisi associata al cromosoma X, la quale può presentare anche anchiloglossia dove la normale mobilità della lingua è limitata. Mutazioni in questo gene sono state successivamente trovate anche in una significativa proporzione di pazienti affetti da palatoschisi non sindromica (Marçano et al., 2004). Nei topi *Tbx22* è espresso nelle rime palatine in via di sviluppo e alla base della lingua; la sua funzione nell'uomo sembra essere quella di repressore della trascrizione (Jugessur et al., 2009).

### ▪ **TP63**

Esistono cinque sindromi determinate da mutazioni su questo gene per la proteina tumorale p63, quattro delle quali determinano schisi orofacciali. Inoltre mutazioni di TP63 sono state associate anche a schisi non sindromiche (Leoyklang et al., 2006).

### ▪ **PVRL1**

Il gene PVRL1 (recettore legato ai Poliovirus 1) codifica per la nectina-1, una molecola transmembrana di adesione cellula-cellula simile alle immunoglobuline che, nei topi, è espressa nel MEE dei processi palatini, nell'epitelio olfattivo e sulla superficie dell'epidermide (Jugessur et al., 2009). Una mutazione non senso su questo gene è associata alla sindrome displasia ectodermica con labio-palatoschisi. Un lavoro di Sozen e collaboratori (2001) ha dimostrato che la stessa mutazione rappresenta un fattore di rischio per le schisi non sindromiche. Altri studi hanno confermato ciò (Avila et al., 2006).

### ▪ **SUMO**

La proteina SUMO (Small Ubiquitine-like Modifier) partecipa alla modificazione post-traduzionale di un elevato numero di proteine cellulari, partecipando a importanti processi quali il trasporto nucleare, la regolazione della trascrizione e l'apoptosi. Una forte espressione di questa proteina è stata osservata nel labbro superiore, nel palato primario e sul MEE del palato secondario dell'embrione in via di sviluppo.

Si è ipotizzato che esista un'interazione sinergica tra SUMO, FGF e fattori di rischio ambientale per le schisi orofacciali. Diversi geni associati con CL/P codificano anche per target di SUMO, perciò modificazioni aberranti da parte di SUMO sulle proteine di questi geni possono determinare un alto rischio per la patogenesi di schisi sindromiche e non (Jugessur et al., 2009).

- **BMP**

Le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP), appartenenti alla superfamiglia del TGF- $\beta$ , regolano importanti processi di sviluppo come la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi (Srichomthong et al., 2005).

L'inattivazione condizionale del gene che codifica per il recettore Bmp di tipo 1 (Bmpr 1a), nelle prominenze orofacciali del topo, porta ad un'agenesia dentale e CL/P bilaterale, mentre un'inattivazione condizionale del ligando Bmp4, nello stesso tessuto, produce una schisi isolata del solo palato (Liu et al., 2005).

- **SHH**

Sonic hedgehog è uno dei ligandi più studiati della via di segnalazione del hedgehog (hedgehog signaling pathway); questa via è fondamentale nella regolazione dell'organogenesi nei vertebrati, per esempio, nel differenziamento delle dita e degli arti, nell'organizzazione del sistema nervoso, dei denti e nello sviluppo craniofacciale.

Uno dei geni target è Patched receptor gene (PTCH), le cui mutazioni sono responsabili della sindrome di Gorlin, che comprende nel 4% dei casi anche la schisi orofacciale (Mansilla et al., 2006).

- **Geni del ciclo dei folati**

I folati nell'organismo sono composti essenziali per processi importantissimi come la sintesi delle basi nucleotidiche del DNA, la metilazione di proteine, lipidi e acidi nucleici e la regolazione della concentrazione dell'omocisteina; ciò implica un loro coinvolgimento negli eventi di sviluppo embrionale. Geni che codificano proteine che prendono parte a questo ciclo possono portare, se mutati, a difetti dello sviluppo e malformazioni. Un esempio è il polimorfismo MTHFR:c.677C>T, che in molti lavori risulta correlato all'insorgenza di schisi del labbro con o senza schisi del palato e schisi del solo palato: infatti l'omozigosi c.677TT è maggiormente presente nei casi, rispetto ai controlli; inoltre anche la presenza dell'allele T nella madre risulta associato all'insorgenza della malformazione (Mills et al., 1999; Gaspar et al., 2004).

## 1.9 Fattori di rischio ambientale

Alcuni fattori ambientali giocano un importante ruolo nell'eziologia delle schisi orofacciali non sindromiche, anche in relazione alla loro interazione con determinati genotipi in loci di suscettibilità. Riportiamo di seguito una breve descrizione dei principali fattori ambientali studiati in relazione alle schisi orofacciali:

### ▪ **Fumo in gravidanza**

Il fumo di sigaretta da parte della madre in gravidanza è forse il fattore di rischio ambientale più studiato nell'ambito delle OFC. L'uso di tabacco in corso di gravidanza è stato consistentemente associato ad un modesto incremento del rischio di schisi orofacciali (Andrews et al., 1972; Kallen, 1997), in particolare è stato associato ad aumentato rischio, del 20%, di sviluppare sia CLP, sia CPO (Honein et al., 2007), con un incremento significativo del rischio, al crescere del consumo di sigarette giornaliere, nel primo trimestre di gravidanza (Källén, 1997; Lorente et al., 2000).

In generale, il rischio relativo associato con il fumo materno è minore per le CP rispetto alle CL/P, probabilmente questo fornisce un'ulteriore prova di una differente eziologia delle CL/P rispetto alle CP (Little et al., 2004).

Per poter spiegare la teratogenicità del tabacco, è stato suggerito che il fumo possa influenzare lo sviluppo embrionale determinando un'ipossia fetale che influisce negativamente sull'accrescimento e sullo sviluppo fetale. Inoltre è stato visto che le madri fumatrici hanno un livello serico di folati più basso rispetto alle non fumatrici. L'uso di sigarette da parte della madre determina un ritardo della crescita intrauterina (RCIU), in quanto la nicotina restringe i vasi sanguigni uterini determinando una diminuzione di flusso sanguigno dell'utero, riducendo la quantità di nutrienti a disposizione dell'embrione e/o feto provenienti dal sangue materno e diretti agli spazi intervillosi della placenta. La carenza che ne risulta all'embrione rallenta l'accrescimento cellulare. Alti livelli di carbossiemoglobina, che è prodotta dal fumo delle sigarette, compaiono nel sangue materno e fetale, alterando la capacità del sangue di trasportare ossigeno (Moore & Persaud, 1998). È stato dimostrato sperimentalmente che l'ipossia causata dalla nicotina e dal monossido di carbonio possa indurre schisi orofacciali e altre malformazioni (Shaw et al., 1996). Quindi il fumo di sigaretta può agire come un fattore soglia, esercitando il suo effetto teratogeno solo su madri e/o feti predisposti.

Questa associazione potrebbe essere sottostimata in quanto l'esposizione passiva al fumo non è presa in considerazione nella maggior parte degli studi.

### ▪ **Alcool in gravidanza**

È ormai affermato che l'abuso di alcool in gravidanza porta allo sviluppo di Sindrome Alcolico Fetale (SAF), una patologia che consiste in anomalie craniofacciali (tra cui microcefalia), disfunzioni del sistema nervoso centrale (iperattività, deficit di attenzione, ritardo mentale e disfunzioni dell'apprendimento) e rallentamento della crescita, con possibili complicazioni renali, cardiache e gastriche. Sebbene la presenza di CL/P e CP nel feto non faccia

specificatamente parte dei dismorfismi collegati con SAF, è stata notata comunque una correlazione con l'uso di alcolici. La presenza di CP è stata descritta in circa il 10% dei casi di bambini esposti a dosi elevate di alcool in gravidanza (Lemoine, 1992). Un aumentato rischio specificatamente per CL/P è stato riportato in associazione con l'assunzione di 5 o più bicchieri/die (Werler, 1991). In un altro studio è stato trovato che l'assunzione di 10 o più bicchieri al mese è associato alla comparsa di CL/P isolata e CP isolata (Munger et al., 1996). Il ruolo dell'alcool nelle schisi orofacciali non sindromiche comunque resta ancora incerto in quanto certi studi riportano risultati positivi, ma altri non registrano alcuna associazione; l'effetto teratogeno dell'alcool potrebbe dipendere dalla capacità della madre e del feto di metabolizzarlo (Mossey et al., 2009; Boyles et al., 2010).

### ▪ **Ipossia**

L'ipossia fetale può portare ad un aumento di morte cellulare che può essere associata con lo sviluppo di schisi orofacciali (Sulik et al., 1988). Esistono alcune evidenze che ci suggeriscono che l'ipossia dovuta all'altitudine durante la gravidanza possa portare ad una maggiore incidenza di difetti alla nascita, incluso CLP (Castilla et al., 1999).

### ▪ **Ipertermia**

Fattori fisici come l'ipertermia possono indurre severe malformazioni in molte specie animali fra cui l'uomo. Episodi febbrili, ipertemia maligna, bagni caldi e sauna possono determinare un aumento della temperatura corporea di 1,5-2,5°C che è la soglia per la teratogenesi in molte specie. L'effetto dell'ipertermia dipende dallo stadio di sviluppo dell'embrione. Gravi danni al SNC si possono eventualmente verificare in seguito ad esposizione al calore nel periodo che va dalla IV alla XIV settimana, le malformazioni facciali, fra le quali CL/P possono verificarsi nel periodo che va dalla IV alla VII settimana di gestazione (Pleet et al., 1981).

### ▪ **Multivitaminici**

Anche se una conoscenza approfondita sugli stili di vita alimentari nelle diverse popolazioni umane non è sempre possibile, a causa dei parametri diversi usati per le misurazioni biochimiche e alla non disponibilità di tali misure nei paesi più poveri, vi sono diverse evidenze che riportano l'importanza della nutrizione materna nell'eziologia delle schisi orofacciali (Mossey et al., 2009). In particolare, in molti studi, la somministrazione precoce di multivitaminici in gravidanza è risultata collegata ad una diminuzione del 25% di rischio per questo tipo di malformazioni (Johnson and Little, 2008). Altri dati suggeriscono una possibile interazione tra ipertermia materna e supplemento con multivitaminici, in cui la supplementazione diminuirebbe l'aumentato rischio di schisi associate con l'ipertermia (Botto et al., 2002).

### ▪ **Acido folico**

Esistono diverse evidenze del coinvolgimento del deficit di folati materno nel determinare schisi orofacciali. È stato infatti dimostrato che il consumo di acido folico (FA) nel periodo periconcezionale ha un ruolo preventivo nei confronti di Difetti del Tubo Neurale (NTD), vi è un abbassamento del 72% di ricorrenza di NTD, in madri che hanno preso 4 mg al giorno di FA,



## 1. Introduzione

da prima della gravidanza fino alla XII settimana di gestazione (Medical Research Council, 1991). La somministrazione di acido folico, non solo aumenta il livello di folati negli eritrociti, ma diminuisce anche i livelli di omocisteina plasmatica.

È stato ipotizzato che il deficit di folati potrebbe essere in parte spiegato da una mutazione nel gene che codifica la 5,10-Metilen-THF Reduttasi (MTHFR), in particolare MTHFR677C>T, che porta infatti alla codifica di una variante termolabile dell'enzima che ne riduce l'attività; l'omozigosi per questo polimorfismo è associata ad un aumento di 7,2 volte del rischio per NTD (Ou et al., 1996).

Inoltre, in diversi studi questa variante risulta correlata all'insorgenza di labioschisi con o senza schisi del palato e schisi del solo palato, infatti l'omozigosi 677TT è maggiormente presente nei casi, rispetto ai controlli e anche la presenza dell'allele T nella madre risulta associato all'insorgenza della malformazione (Mills et al., 1999; Gaspar et al., 2004).

Diversi ricercatori hanno ipotizzato che un abbondante apporto di acido folico giornaliero, come quello previsto dai programmi legislativi di fortificazione alimentare attuati in America e in Canada, può mascherare gli effetti della mutazione MTHFR677C>T (Tsai et al., 2009).

### ▪ **Vitamina B6**

Questa vitamina gioca numerosi ruoli importanti nel metabolismo amminoacidico, comprendenti le reazioni di transaminazione e decarbossilazione, ed è il coenzima della degradazione dell'omocisteina, perciò ci sono molte potenziali reazioni dove la vitamina B6 ha un'azione di protezione nei confronti delle schisi orofacciali.

Sembra che la vitamina B6 regoli l'attività degli ormoni, tra cui androgeni, estrogeni, progesterone, retinolo, acido retinoico, ormoni tiroidei, calcitriolo e glucocorticoidi nel legare le proteine recettoriali nucleari influenzando così la trascrizione e l'espressione dei geni (Jacobson, 1997). Il livello citoplasmatico dei recettori dei glucocorticoidi nel palato secondario in via di sviluppo è stato visto essere associato con la suscettibilità nei confronti delle schisi indotte da glucocorticoidi (Salomon et al., 1999). Gli autori di questo studio hanno suggerito che i glucocorticoidi inibiscono la crescita delle cellule del mesenchima del palato nel periodo critico della formazione del palato; infatti, in uno studio condotto su una coltura cellulare di cellule di mesenchima del palato di topo è stato evidenziato che la vitamina B6 inibisce il legame specifico dei glucocorticoidi con i recettori citoplasmatici. Questo suggerisce che la vitamina B6 riduce l'eventualità di schisi indotte da cortisone andando ad alterare il legame dei glucocorticoidi nei confronti dei loro recettori citoplasmatici e di conseguenza ai recettori nucleari (Yoneda et al., 1982).

La vitamina B6 è un cofattore del metabolismo dell'omocisteina e riduce l'insorgenza di schisi negli animali con elevati livelli di omocisteinemia. Deficit di questa vitamina sono tipici di quei paesi come l'Asia, dove c'è un forte consumo di riso raffinato; in queste stesse popolazioni si registra alta incidenza di labioschisi, labio-palatoschisi e palatoschisi (Mossey et al., 2009).

▪ **Zinco**

Lo zinco è importante nello sviluppo fetale e una sua carenza può portare a CPO e ad altre malformazioni negli animali da laboratorio. È stato registrato che madri di bambini affetti da schisi hanno livelli più bassi di zinco negli eritrociti rispetto a madri di figli sani, la stessa differenza è stata osservata tra bambini affetti e non (Krapels et al., 2004).

▪ **Vitamina A o acido retinoico**

L'esposizione fetale a farmaci a base di acido retinoico può portare a gravi anomalie craniofacciali; non è ancora stato verificato se questo dato ha rilevanza anche nell'ambito dell'assunzione di vitamina A nella dieta (Mossey et al., 2009).

▪ **Altri fattori ambientali**

L'assunzione di farmaci anti-convulsivi e corticosteroidi in gravidanza sembra aumentare il rischio di schisi orofacciali nel nascituro (Mossey et al., 2009).

Il rischio di CL/P tra i nati da madri trattate con farmaci antiepilettici (FAE) può essere stimato pari all'1%, circa 10 volte la media del rischio della popolazione (Johnston et al., 1995; Dravet et al., 1992). Questo dato è stato confermato anche nella popolazione italiana (Wyszynski et al., 1996). I FAE tra i quali la carbamazepina, fenitoina, primidone e fenobarbital si sono rivelati degli antagonisti dell'acido folico. Il loro meccanismo d'azione è vario: agiscono su numerosi enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati, compromettendo l'assorbimento dell'acido folico e aumentandone la degradazione.

Esiste un altro gruppo di farmaci che sono antagonisti dell'acido folico, in particolare dell'enzima Diidrofolato Reduttasi. Il loro meccanismo d'azione consiste nel rimuovere il folato da questo enzima, bloccando così la sua conversione nelle forme metabolicamente attive (Lambie et al., 1985). I farmaci appartenenti a questo gruppo sono: aminopterina, methotrexate, sulfasalazine, pyrimethamine, triamterene e trimethoprim. In uno studio è stato visto che il rischio di avere un bambino con schisi orofacciale è aumentato a seguito dell'uso di questi farmaci, durante il secondo e terzo mese dall'ultima mestruazione, ma non prima o successivamente a questo periodo. Inoltre è stato visto che questi farmaci possono determinare altri difetti, quali: difetti al tubo neurale, difetti cardiovascolari e malformazioni urogenitali. Il rischio di avere un bambino con schisi orofacciali e gli altri difetti sopra elencati viene ridotto in maniera considerevole se alle madri, che assumono questi farmaci, viene somministrato un preparato multivitaminico contenente acido folico (Hernandez-Diaz et al., 2000). Non si ha, invece, una diminuzione del rischio nelle madri sottoposte a terapia con farmaci antiepilettici, suggerendo così un diverso meccanismo d'azione oltre a quello di deprivazione dell'acido folico; infatti per questi farmaci è anche stato proposto un effetto tossico diretto (Finnell et al., 1997).

Numerosi studi hanno dimostrato come lo stress materno e i suoi prodotti fisiologici quali i corticosteroidi, sono teratogeni in molti modelli animali (Rowland et al., 1983; Montenegro et al., 1995). Pochi studi sono stati condotti sull'uomo; questi mostrano una potenziale associazione fra eventi o esperienze stressanti prima e durante la gravidanza e anomalie alla

## 1. Introduzione

nascita (Adams et al., 1989; Czeizel et al., 1997; Laumon et al., 1996; Saxen, 1974; Streat et al., 1956). Inoltre molti studi hanno esaminato la possibile associazione tra l'assunzione, da parte della madre, di farmaci contenenti corticosteroidi ed un aumentato rischio di anomalie, in particolare di schisi orofacciali. In tre studi caso-controllo è stato trovato che bambini nati da donne che avevano assunto corticosteroidi durante il primo trimestre di gravidanza hanno un rischio aumentato per le schisi orali non sindromiche (Czeizel et al., 1997; Rodriguez-Pinilla et al., 1998). Altri studi sui corticosteroidi e schisi non hanno trovato prove di una tale associazione, da considerare però, che la maggior parte di questi studi è stata condotta su piccoli campioni (Fraser et al., 1995; Kullander et al., 1976).

## 1.10 Epistasi e interazione gene-ambiente nelle malattie complesse

Una delle più grandi sfide della genetica umana è il riconoscimento di polimorfismi e variazioni di sequenza nel DNA che portano ad un incremento del rischio di malattie.

Le malattie ereditarie tendono ad essere generalmente classificate in due gruppi: malattie mendeliane e malattie multifattoriali o complesse.

Le malattie mendeliane tendono ad essere rare, con una frequenza inferiore allo 0,05% nelle popolazioni.

Nel caso di questo tipo di malattie, come l'anemia falciforme o la fibrosi cistica, l'associazione è con un singolo gene, e quindi la relazione genotipo-fenotipo è di facile interpretazione.

Le patologie complesse rappresentano un pericolo molto più grave per la salute pubblica, in quanto possono avere una frequenza superiore all'1%; infatti in questa categoria ricadono le malattie più frequenti nel mondo occidentale, come l'ipertensione, il diabete, la sclerosi multipla ed anche le schisi orofacciali non sindromiche.

Una caratteristica comune a tutte le malattie complesse è il fatto di presentare un'aumentata familiarità senza però riconoscere il pattern di trasmissione mendeliana, in genere nella stessa famiglia sono presenti più individui affetti dalla stessa patologia, ma ciò non è riconducibile ad un modello di dominanza, né di recessività, né a patologia legata al sesso.

Altra caratteristica importante è che le malattie complesse sono determinate dall'intricata interazione di diversi fattori genetici ed ambientali, chiamati in generale "fattori di suscettibilità" (Cocozza and Vaccaro, 2005). Questi fattori costituiscono "l'architettura genetica" della malattia. L'architettura genetica di un tratto si riferisce alla sua caratterizzazione in termini di effetto diretto dei geni e delle caratteristiche ambientali, così come dell'effetto attribuibile all'interazione tra geni e ambiente. Un'architettura genetica complessa è molto probabilmente la norma, e non l'eccezione, di molti tratti poligenici (Wade, 2001).

La relazione fattori causali e fenotipo è estremamente difficile da individuare in quanto la suscettibilità ad una malattia è determinata da interazioni non lineari tra numerose variabili genetiche ed ambientali (Motsinger and Ritchie, 2006).

La sola componente genetica presenta un notevole grado di complessità. Ancora oggi esistono due principali teorie in conflitto su questa questione:

- Common Disease/Rare Allele (CD/RA): questa teoria afferma che la componente genetica di una malattia complessa è costituita da un gran numero di differenti mutazioni, ognuna con una frequenza molto bassa ed una penetranza alta, avvenute all'interno di un periodo relativamente recente;
- Common Disease/Common Variant (CD/CV): secondo questa teoria la componente genetica di una malattia complessa è costituita da un numero relativamente limitato di mutazioni a bassa penetranza, che hanno una frequenza abbastanza alta nella popolazione normale. L'ipotesi consiste nella combinazione di più forme alleliche

## 1. Introduzione

“negative” che aumentano la suscettibilità alla malattia. In questo contesto tali alleli si sarebbero generati prima della dispersione delle popolazioni umane e, in alcuni contesti, sarebbero stati selezionati positivamente.

L'ipotesi che attualmente sembra la più accreditata è la mediazione tra le due: la maggior parte delle malattie complesse è dovuta a varianti geniche ad alta frequenza e a bassa penetranza che agirebbero in poligenia; un minoritario numero di pazienti riconoscerebbe invece una predisposizione genetica in mutazioni rare ad alta penetranza (Cocozza and Vaccaro, 2005).

Col termine epistasi in genere si definisce quel fenomeno per il quale il valore fenotipico di un gene viene influenzato dal valore fenotipico di un altro gene. L'epistasi, detta anche interazione genica, sta assumendo sempre di più un ruolo cruciale nell'architettura genetica delle malattie complesse (Motsinger and Ritchie, 2006).

L'effetto poligenico non è sempre un effetto additivo, ossia quando ogni gene aggiunge qualcosa al determinismo di quel carattere senza entrare in relazione con altri geni, infatti ci sono sempre più dimostrazioni che i geni interagiscono epistaticamente l'uno con l'altro.

Nasce perciò la necessità non più di associare ad una malattia una forma allelica sola, ma piuttosto la presenza contemporanea di più forme alleliche.

Ad esempio se una popolazione, in base ad una sola variante (gene A), potrà essere suddivisa in tre gruppi rispetto al genotipo (AA, Aa, aa), analizzando due varianti insieme i gruppi diventano 9, analizzando tre varianti 27 e così via. Perciò procedendo in questo modo il numero di pazienti in ogni gruppo diminuisce, rendendo difficile il raggiungimento di una significatività statistica (Cocozza and Vaccaro, 2005).

Un ulteriore problema nello studio della genetica delle malattie complesse è rappresentato poi dall'interazione gene-ambiente. I fattori ambientali possono infatti essere un elemento di confusione, che potrebbe in parte spiegare la frequente mancata replicazione dei risultati degli studi di associazione. Solo recentemente si è iniziato ad esplorare le basi molecolari dell'interazione tra geni e ambiente, soprattutto tra geni e alimentazione, sono infatti nati termini come “nutrigenetica” e “nutrigenomica”.

La nutrigenetica studia l'effetto delle variazioni genetiche sull'interazione tra dieta e specifici fenotipi, con l'obiettivo di valutare i rischi e i benefici che un individuo può ricevere da un certo tipo di alimentazione.

La nutrigenomica studia l'effetto dei nutrienti sul genoma, sul proteoma e sul metaboloma in modo da chiarire come la dieta possa influenzare le vie metaboliche.

Lo studio dell'interazione gene-ambiente, oltre a portare alla spiegazione di parte della variabilità interindividuale nella suscettibilità a molte malattie, potrebbe aprire la strada ad un nuovo modo di fare prevenzione e terapia, con la prospettiva di progettare delle misure personalizzate individuali (Cocozza and Vaccaro, 2005).

L'interazione gene-gene e gene-ambiente associata a malattie complesse umane, o profili farmaco genomici, è difficile da riconoscere per i genetisti, a causa della non linearità (Moore et al., 2006). Ma, l'identificazione, la caratterizzazione e l'interpretazione delle interazioni genetiche e gene-

ambiente potrà portare ad un miglioramento della diagnosi, della prevenzione e del trattamento delle più comuni malattie umane (Motsinger and Ritchie, 2006). A questo scopo esistono diversi approcci di analisi:

- regressione logistica multipla: è la metodica più classica, orientata a trovare la probabilità di un oggetto di essere classificato all'interno di una categoria, in relazione ad una combinazione di fattori di predizione. Questa metodica soffre di gravi limitazioni, in quanto dipende dalla numerosità del campione e impone relazioni fisse tra genotipo e fenotipo;
- reti neurali artificiali (ANN): può essere interpretato come una generalizzazione della regressione logistica in uno spazio non lineare;
- Multifactor Dimensionality Reduction (MDR): questa strategia prevede la riduzione di dimensionalità basata sull'identificazione di particolari associazioni tra fattori ad alto o a basso rischio. Questa variabile monodimensionale viene poi valutata nella sua capacità di predire lo stato di salute e malattia (Cocozza and Vaccaro, 2005).



## 2. Scopo

---





Le schisi orofacciali non sindromiche sono il difetto malformativo congenito più comune, con un'incidenza globale di 1/700 nati vivi. Le schisi sono difetti congeniti dovute alla non fusione di specifiche prominenze orofacciali in fase embrionale; esse rappresentano un difetto severo che comporta gravi difficoltà nell'alimentazione, fin dalle prime ore di vita ed importanti difetti a livello fonetico, con ripercussioni fino all'età adulta. Per questi motivi, richiedono interventi multipli di chirurgia maxillo-facciale e plastica che rappresentano un notevole costo sanitario. Le schisi orofacciali non sindromiche si possono suddividere dal punto di vista eziologico in Labio/Palatoschisi, cioè labioschisi con o senza schisi del palato e Palatoschisi isolate.

Le schisi non sindromiche sono malattie multifattoriali ad eziologia complessa, le cui cause genetiche sono prevalentemente limitate ad analisi su singoli geni scarsamente confermate in studi di replicazione.

Data la natura multifattoriale della patologia, per una reale comprensione delle cause eziologiche è perciò è riduttivo studiare singoli fattori, e risulta quindi necessario considerare l'epistasi di più fattori, cercando di individuare le reti di interazioni legate allo sviluppo della patologia.

Obiettivo specifico di questa ricerca è, pertanto, di applicare le più avanzate tecnologie di genetica molecolare per identificare i principali loci di suscettibilità per le Labio/Palatoschisi e decifrarne il network di interazione che ne compone la base eziologica.

Tali informazioni risulterebbero fondamentali per potenziare l'efficacia della prevenzione primaria, e condurre ad una rilevante riduzione dell'incidenza di tale malfomazione e conseguentemente ad un contenimento delle relative spese sanitarie.



## 3. Materiali e Metodi

---

### 3. Materiali e Metodi

### 3.1 Casistica

La casistica si suddivide in due diversi tipi di campionamento: caso-controllo e triadi, composte da un figlio affetto e i due genitori biologici.

Il campionamento della casistica caso-controllo comprende 401 casi, affetti da schisi orofacciali non sindromiche NSCL/P suddivisi in labioschisi (CL) e labiopalatoschisi (CL/P) e 1323 controlli indipendenti provenienti dal Centro Europa (Tabella I). La raccolta è avvenuta prevalentemente in centri ospedalieri di Chirurgia Maxillo-Facciale dislocati prevalentemente in Germania nel contesto di un progetto per la *German Research Foundation (GRF)*, mentre i controlli provengono da altri studi, e sono quindi controlli sani per la patologia di riferimento oggetto di studio nella nostra ricerca.

Casi		Controlli	
Nord-Germania	401	HNR <sup>1</sup>	383
		POPGEN <sup>2</sup>	472
		KORA <sup>3</sup>	468
Totale	401	Totale	1323

Tabella I: casi e controlli e loro provenienza, raccolti nel contesto del progetto per GRF.

1. Schmermund, A. et al. Assessment of clinically silent atherosclerotic disease and established and novel risk factors for predicting myocardial infarction and cardiac death in healthy middle-aged subjects: rationale and design of the Heinz Nixdorf RECALL Study. Risk Factors, Evaluation of Coronary Calcium and Lifestyle. *Am. Heart J.* 144, 212-218 (2002).

2. Krawczak, M. et al. Population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community Genet.* 9, 55-61 (2006).

3. Wichmann, H.E., Gieger, C. & Illig, T. KORA-gen--resource for population genetics, controls and a broad spectrum of disease phenotypes. *Gesundheitswesen* 67, S26-30 (2005).

Il campionamento della casistica a triadi è stato organizzato nel contesto del progetto europeo *EUROCRAN*, nel periodo 2001-2004, ed è avvenuto principalmente presso centri di Chirurgia Maxillo-Facciale dislocati in Gran Bretagna, Olanda ed Italia. Nel periodo 2006-2007 contestualmente all'entrata nell'unione europea della Slovenia è stato organizzato un campionamento della casistica da Estonia, Slovenia, Bulgaria, Slovacchia e Ungheria, coordinato da un centro in Slovenia. In totale sono state raccolte 866 triadi (Tabella II), in cui i probandi, i figli, erano affetti da schisi orofacciali non sindromiche: NSOFC, labioschisi (CL) e labiopalatoschisi (CL/P) e palatoschisi (CPO).

### 3. Materiali e Metodi

	n. triadi	perc. %
Olanda	319	36,84
Italia	161	18,59
Regno Unito	154	17,78
Ungheria	76	8,78
Slovacchia	65	7,51
Bulgaria	37	4,27
Slovenia	23	2,66
Estonia	22	2,54
Spagna	9	1,04
	866	100,00

Tabella II. Numero di triadi raccolte per ogni paese di provenienza, nel contesto del progetto EUROCRAN.

Tutti i partecipanti allo studio hanno sottoscritto un modulo di consenso informato appositamente predisposto dichiarante le ragioni e gli obiettivi della ricerca.

Per ogni paziente è stata compilata una scheda, specificatamente elaborata, per la raccolta dei dati clinici ed anamnestici. Nella raccolta anamnestica è stata indagata in modo specifico l'esposizione a vari teratogeni, come ad esempio fumo attivo e passivo, farmaci e solventi organici di qualsiasi origine, con particolare attenzione al periodo periconcezionale, inteso 3 mesi prima e 3 mesi dopo il concepimento, che è di fatto il periodo di suscettibilità per il difetto congenito studiato.

Per la madre in particolare è stato valutato l'uso di farmaci, integratori multivitaminici e di folati, esposizione a radiazioni o interventi chirurgici, nell'intero periodo della gravidanza. La scheda è inoltre completata, laddove possibile, dalla compilazione dall'albero genealogico della famiglia.

Ogni paziente è stato valutato relativamente alle caratteristiche cliniche della schisi orofacciale e alla eventuale presenza di altre malformazioni e dismorfismi. I dati della scheda di indagine sono stati raccolti da personale medico pediatra e/o genetista che ha valutato clinicamente ogni paziente affetto. L'accuratezza della raccolta dei dati fenotipici riguardo la schisi e dei dati di esposizione a fattori di rischio ambientale, rappresenta il valore aggiunto ad uno studio di associazione, che può quindi valutare il ruolo di detti fattori in concomitanza con quelli di rischio genetico identificati.

#### 3.1.1 Frequenze delle diverse forme di schisi orofacciale

La tabella III di seguito riporta la distribuzione della casistica totale stratificata per tipologia di schisi orofacciali (OFC): labioschisi (CL), labiopalatoschisi (CLP), labioschisi con o senza palatoschisi (CL/P) e palatoschisi (CPO).

Nella casistica caso-controllo i casi sono tutti affetti da labioschisi con o senza palatoschisi, invece nella casistica a triadi sono presenti anche triadi con il fenotipo di palatoschisi. La differenza di

fenotipi selezionati in queste due diverse raccolte di campioni risiede nel fatto che le casistiche sono state campionate nell'ambito di due diversi progetti, con diverse finalità e solo in questo studio unificate con uno scopo comune. I campioni affetti da palatoschisi nella casistica a triadi rappresentano però un valore aggiunto allo studio, in quanto consentono di avere informazioni preliminari anche riguardo questo fenotipo a diversa eziologia ed eventualmente possono essere escluse dall'analisi statistica laddove si rendesse necessario.

	<b>casi</b>	<b>freq. %</b>	<b>triadi</b>	<b>freq. %</b>
CL	180	44,9	224	25,9
CLP	221	55,1	399	46,1
CL/P	401	100,0	623	72,0
CPO	-		243	28,0

Tabella III: per ogni fenotipo di schisi è stato riportato il numero di triadi o di casi nelle due casistiche

Dalla stratificazione per tipologia di triadi nella casistica a triadi si evince come il fenotipo di labioschisi con o senza palatoschisi rappresenti il tipo di schisi con maggiore frequenza, circa il 70% del campione raccolto, mentre invece le palatoschisi isolate sono più rare e la loro frequenza totale è circa del 30%. Da entrambe le casistiche si evince inoltre come all'interno del fenotipo di labioschisi con o senza palatoschisi, il fenotipo più frequente sia quello di labioschisi con palatoschisi.

### 3.1.2 Rapporto sessi

Per quanto riguarda la casistica a triadi, raccolta per il progetto EUROCRAN, è stato possibile calcolare il rapporto sessi per ciascun fenotipo di schisi. La casistica raccolta presenta prevalentemente interessamento del sesso femminile per il fenotipo di palatoschisi isolata  $SR=0,66$  e del sesso maschile per il fenotipo di labioschisi con o senza palatoschisi, rispettivamente per i fenotipi di labioschisi e labiopalatoschisi,  $SR=1,81$  ed  $SR=1,94$ . I valori di rapporto sessi si allineano ai valori riportati in letteratura scientifica, in cui il fenotipo di labioschisi colpisce prevalentemente il genere maschile, mentre quello di palatoschisi il genere femminile (Murray et al., 2002).

	<b>triadi</b>		
	<b>maschi</b>	<b>femmine</b>	<b>SR</b>
CL	96	53	1,81
CLP	182	94	1,94
CPO	61	92	0,66

Tabella IV. Numero di triadi per genere e fenotipo di schisi.



## 3.2 Raccolta campioni biologici ed estrazione del DNA genomico

Ai partecipanti al progetto è stato eseguito un prelievo di sangue periferico in EDTA (circa 5ml per soggetto). In alternativa, è stato raccolto un campione di cellule di desquamazione boccale mediante strofinamento della mucosa orale con bastoncini ad estremità rivestita di materiale cotonoso (cotton-swabs). Per ogni soggetto sono stati utilizzati 5 bastoncini, che sono stati inseriti in un tubo conico da 15 ml contenente 0.5 ml di soluzione STE buffer (100nM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 0.2mg/ml Proteinasi K e 0.5% SDS).

I campioni ottenuti sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'estrazione del DNA genomico.

### 3.2.1 Estrazione di DNA genomico da 3 ml di sangue periferico

Il DNA genomico viene estratto da sangue periferico mediante KIT FLEXIGENE (QIAGEN).

Il campione di sangue congelato viene sciolto in bagnetto a  $37^{\circ}\text{C}$  e mantenuto in agitazione. In un tubo da 15 ml si trasferiscono 3 ml di sangue a cui vengono aggiunti 7,5 ml di Buffer FG1, per mescolare si inverte il tubo circa 5 volte e dopo la centrifugazione per 5 minuti a 2000 giri viene scartato il surnatante. Successivamente sono stati aggiunti 1,5 ml di mix FG2 e Proteasi (per ogni ml di sangue da processare si mixano 5 ml di Buffer FG2 e 5  $\mu\text{l}$  di Proteasi) mescolando fino ad ottenere un'omogenizzazione del pellet e dopo aver invertito il tubo almeno tre volte è stato incubato in bagnetto a  $65^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti. Sono stati poi aggiunti 1,5 ml di Isopropanolo al 100%, mescolando bene fino ad ottenere un precipitato di DNA ben visibile che viene recuperato tramite un puntale e inserito in una vial da 2 ml contenente 1,5 ml di Etanolo al 70%. Dopo aver sciolto il DNA nell'etanolo e centrifugato per 3 minuti a 2000 giri viene scartato il surnatante. Come ultimo passaggio sono stati aggiunti 300  $\mu\text{l}$  di ddH<sub>2</sub>O e incubato a  $65^{\circ}$  per 10 minuti, in seguito poi, titolando, è stato possibile determinare la concentrazione di DNA estratto.

### 3.2.2 Estrazione di DNA genomico da 400 $\mu\text{l}$ di sangue periferico

Per l'estrazione di DNA da piccoli volumi di sangue intero è stato utilizzato il kit "QIAamp DNA Blood Mini Kit" (QIAGEN).

Questo metodo prevede l'impiego di particolari colonne contenenti una membrana di gel di silice a scambio ionico che trattiene il DNA, evitando così l'uso di fenolo/cloroformio nonché della precipitazione alcolica. Si tratta di una metodica rapida e di facile applicazione che permette di ottenere una quantità di DNA che varia da 8 a 24  $\mu\text{g}$ .

Un volume di 400  $\mu\text{l}$  di sangue viene trasferito in una provetta da 1,5 ml contenente 40  $\mu\text{l}$  di Proteinasi K (20 mg/ml) e quindi aggiunti 400  $\mu\text{l}$  di tampone AL fornito dal kit. Per assicurare una

sospensione omogenea del campione e una lisi efficiente viene impiegato il vortex per almeno 15 secondi.

La soluzione viene poi trasferita in bagnomaria, incubata a 56°C per 10 minuti e centrifugata brevemente in microcentrifuga allo scopo di rimuovere le gocce adese alle pareti interne della provetta.

Aggiunti 400 µl di etanolo 100% ad ogni campione e mescolati con vortex per 15 secondi, vengono centrifugati per qualche secondo a 13000 rpm e 700 µl alla volta di ogni campione vengono trasferiti nelle colonne (QIAamp spin column) collocate in appositi tubi di raccolta da 2 ml; il tutto viene centrifugato a 8000 rpm per 1 minuto eliminando il filtrato raccolto.

Vengono poi effettuati due lavaggi con 500 µl rispettivamente di tampone AW1 e AW2 mediante centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto. Ad ogni passaggio il filtrato è stato eliminato e allo scopo di togliere l'eccesso di tampone, le colonne sono state ulteriormente centrifugate a 13000 rpm per 3 minuti.

A questo punto ogni colonna viene trasferita in una nuova provetta da 1,5 ml, per eluire il DNA trattenuto dalla membrana, vengono aggiunti 200µl di acqua bi distillata, incubati per 5 minuti a temperatura ambiente e centrifugati a 8000 rpm per 1 minuto.

#### 3.2.3 Estrazione di DNA genomico da cellule di desquamazione boccale

Il DNA è stato isolato da cellule di desquamazione provenienti dalla mucosa orale grazie all'impiego di uno specifico kit di estrazione di acidi nucleici da tessuti "QIAamp Mini Kit" (QIAGEN) che permette la purificazione di una quantità di DNA compresa tra 0,5 e 3,5 µg totali. Ogni soggetto ha provveduto a raccogliere il materiale mediante passaggio di cinque tamponi di cotone all'interno della bocca e ponendoli in tubi da 15 ml contenenti 500 µl del tampone di lisi STE buffer (aliquotato sterilmente).

Ogni campione è stato conservato a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA per evitare eventuale contaminazione da parte di DNA batterico o di lievito.

Dopo aver separato i cinque tamponi di cotone dai relativi bastoncini, il lisato cellulare è stato trasferito in una provetta da 2 ml contenente 20 µl di Proteinasi K (20 mg/ml).

Dopo l'aggiunta, ad ogni campione, di 600 µl di tampone AL contenuto nel kit, allo scopo di ottenere una soluzione omogenea si è proceduto a mescolare immediatamente con vortex per almeno 15 secondi.

I campioni, incubati a 56°C in bagnomaria per 10 minuti, vengono poi centrifugati brevemente in microcentrifuga per togliere i residui adesi al tappo e alle pareti interne della provetta.

Aggiunti 600 µl di etanolo assoluto 100%, i campioni vengono nuovamente mescolati con vortex e centrifugati.

### 3. Materiali e Metodi

A questo punto vengono trasferiti 700 µl all'interno delle colonne fornite dal kit, provviste di membrane a scambio ionico, i campioni vengono centrifugati a 8000 rpm per un minuto eliminando poi il liquido raccolto all'interno dei tubi da 2 ml nei quali sono alloggiato le colonne.

Si eseguono due lavaggi consecutivi con 500 µl di tampone AW1 e AW2 rispettivamente, entrambi contenuti nel kit e ricostituiti mediante l'aggiunta di etanolo assoluto, eliminando di volta in volta l'eluato dopo una breve centrifugazione di 1 minuto a 8000 rpm. Dopo aver trasferito le colonne in nuovi tubi di raccolta da 2 ml si è proceduto ad effettuare il secondo lavaggio centrifugando a 13000 rpm per 3 minuti. Una volta eliminata la soluzione di lavaggio è stata eseguita una centrifugazione supplementare a 13000 rpm per un minuto allo scopo di eliminare ogni residuo di tampone AW2.

Le colonnine, a questo punto, sono state trasferite in un nuovo tubo da 1,5 ml dove sono stati raccolti i DNA genomici eluiti mediante aggiunta di 150 µl di acqua bidistillata e centrifugazione a 8000 rpm per un minuto. Per aumentare la resa relativa al DNA purificato le membrane sono state lasciate decantare a temperatura ambiente per almeno un minuto.

#### 3.2.4 Titolazione del DNA genomico

Per conoscere la concentrazione del DNA genomico estratto viene misurato l'assorbimento ottico delle basi puriniche e pirimidiniche nell'ultravioletto a 260 nm.

5 µl di soluzione di DNA estratto sono stati diluiti con 495 µl di acqua distillata, trasferiti in una cuvetta in quarzo da 0.5 ml e l'assorbimento ottico è stato misurato impiegando uno spettrofotometro UV.

La concentrazione effettiva del DNA si ottiene applicando la seguente formula:

$$\text{Conc. DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = OD^{260} \times D \times K / 1000$$

$OD^{260}$ : assorbimento ottico a 260 nm

$D$ : fattore di diluizione = 100

$K$ : fattore di correzione = 50 (per il DNA)

Dalla soluzione di DNA genomico titolato vengono allestite tre aliquote in tubi conici da 1.5 ml con tappo a vite e guarnizione in gomma. Delle tre aliquote due rimangono a concentrazione iniziale, mentre una viene diluita alla concentrazione operativa di 100 ng/µl.

Ogni tubo etichettato con il codice identificativo dell'individuo, con una sigla indicante la tipologia del campione biologico, la data di estrazione del DNA genomico e la sua concentrazione, viene conservato in congelatore a -80°C, fatta eccezione per l'aliquote operativa conservata a -20°C.

## 3.3 Genotipizzazione

### 3.3.1 Illumina BeadChips

La tecnologia Illumina BeadChips con una sensibilità di copertura del genoma HumanHap550, il chip in questione contiene un massimo di 561.466 SNPs.

Il chip caricato in macchina viene sottoposto ad una reazione che prevede l'esecuzione in sequenza di quattro passaggi:

- 1) WGA, Fragmentation, Denaturation
- 2) Hybridization
- 3) Primer extension
- 4) Staining

Il DNA genomico per la reazione deve avere una concentrazione di 50ng/μl, in modo che siano presenti un numero sufficiente di copie di genoma per far avvenire la reazione con successo. Il DNA viene frammentato e denaturato, in modo che i vari diversi segmenti che si generano dalle copie di genoma possano andare ad ibridarsi sui diversi bead che codificano per diversi polimorfismi sparsi nel genoma.

Per la genotipizzazione sono necessari tre Primers per ciascuno SNPs in esame: un primer locus specifico che contiene una sequenza complementare a quella genomica specifica per il locus all'intorno del polimorfismo da studiare, con legata in 3' una sequenza univoca per il polimorfismo per l'ibridazione sul bead, detta illumicode; e altri due primers, detti allele specifici che terminano in 3' con uno dei due alleli complementari per lo SNP in esame. Durante la reazione di ibridazione, due dei tre SNPs si legheranno al DNA, quello che porta l'Illumicode e quello dei due che trova l'allele complementare al sito polimorfico del genoma, come schematizzato in Figura 3.4.1.1.

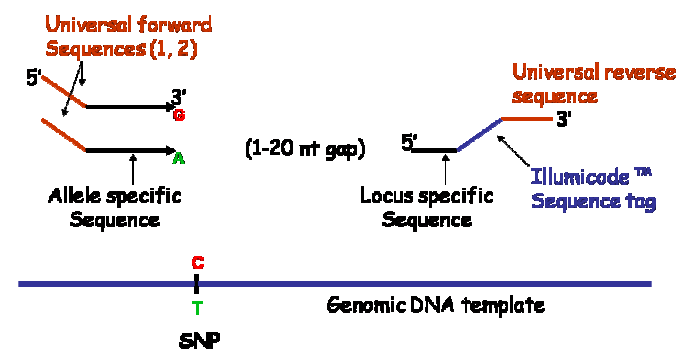


Figura 3.4.1.1: Rappresentazione schematica dei primer di genotipizzazione illumina durante la reazione di ibridazione.

Seccessivamente avviene la reazione di primer extension dove una polimerasi estende il gap di 20 nt che esiste tra il 3' libero del primer allele specifico per il polimorfismo genomico e il 5' libero del primer locus specifico che contiene la sequenza per l'ibridazione al bead detta Illumicode. Una ligasi lega poi le due estremità giustapposte (Figura 3.4.1.2).

### 3. Materiali e Metodi

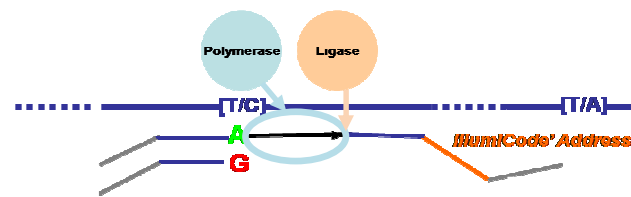


Figura 3.4.1.2: Rappresentazione schematica della reazione di allele specific extension e ligation.

Infine, durante la fase di Staining, il frammento a singola elica genomico legato alla sequenza complementare che porta l'IllumiCode (questa sequenza complementare deriva dall'estensione e ligazione di due primer come descritto sopra) può ibridarsi al bead, che porta sulla sua superficie una sequenza protrudente specifica per lo SNP per cui codifica, complementare a quella del primer locus specifico che consente il legame.

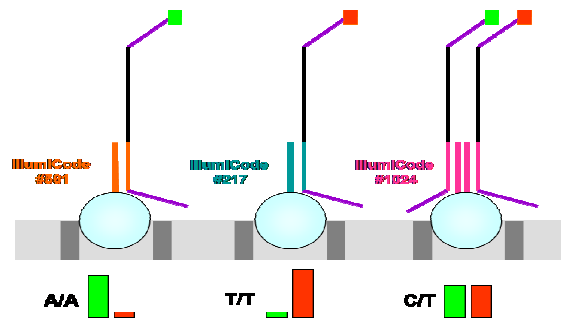


Figura 3.4.1.3: Rappresentazione schematica della reazione finale di staining che consente la genotipizzazione

Come rappresentato nella Figura 3.4.1.3, la genotipizzazione finale, avviene durante la fase di staining in cui sono indispensabili i fluorocromi legati ai due primers allele specifici. Per ciascuno di questi primers infatti, in base alla variante allelica, è legato un diverso fluorocromo, tipicamente uno a fluorescenza verde e uno rossa, cosicchè in base alla fluorescenza rilevata in corrispondenza di ciascun *bead*, per il quale si conosce il polimorfismo relativo, si può assegnare un genotipo. In presenza di un'unica emissione di fluorescenza nel verde o nel rosso il campione sarà omozigote per quel dato polimorfismo, per l'uno o l'altro allele, invece, il colore arancio-giallo indica la presenza di entrambi i fluorocromi e quindi genotipo eterozigote.

In Figura 3.4.1.4 è rappresentato un esempio di output del software Illumina Bead Scan. Il chip da noi utilizzato ha una dimensione tale che possono esserne caricati in macchina, al massimo tre contemporaneamente, quindi vengono analizzati tre campioni alla volta per circa 550000 SNPs.

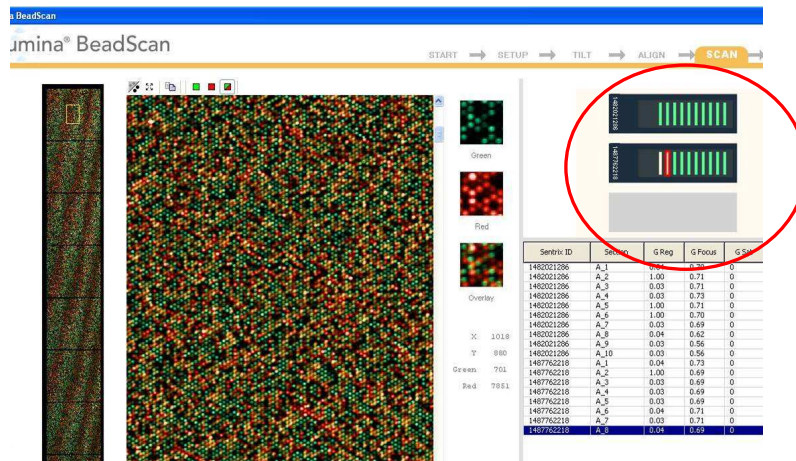


Figura 3.4.1.4: Rappresentazione schematica della reazione finale di staining, che consente la genotipizzazione, in cui sono visibili i tre diversi colori che corrispondono all'identificazione di un genotipo per ogni bead sul chip. Cerchiate in rosso le posizioni disponibili per l'inserimento e l'analisi contemporanea di tre chip, in questo caso sono stati inseriti due chip mentre la terza posizione, grigia, è rimasta vuota.

Per garantire la maggior accuratezza possibile nelle genotipizzazioni, sono stati seguiti alcuni fondamentali controlli di qualità sia per i campioni studiati sia per gli SNPs del chip, esistono dei livelli standard, generalmente riconosciuti sufficienti per tali controlli, l'operatore può arbitrariamente decidere, però di aumentarli o abbassarli. Un campione di DNA è stato incluso nello studio se al termine della genotipizzazione aveva fornito almeno una percentuale di call rate superiore al 95% del totale dei genotipi del chip. Analogamente uno SNP è stato incluso nello studio se correttamente genotipizzato per una percentuale maggiore del 95% del totale dei campioni in analisi, mentre SNPs con un indice MAF (minor allele frequency) minore di 0.01 sono stati esclusi. Dei 561.466 SNPs contenuti nel chip, 521.176 hanno passato i controlli qualità.

Per identificare i campioni problematici è possibile creare uno scatter plot della percentuale di genotipizzazioni con successo, call rate in funzione del numero di campioni analizzati, si individuano facilmente quei campioni, evidenziati nel cerchio a linea tratteggiata, da eliminare dall'analisi (Figura 3.4.1.5).

Per identificare gli SNPs "problematici" si può creare un plot della frequenza di genotipizzazione per ogni singolo SNP in modo da valutare la call frequency e la corretta separazione tra i cluster genotipici. In Figura 3.4.1.6 è riportato un esempio di Plot Call Frequency in cui sono presenti due problemi, per cui è indispensabile l'esclusione dello SNP dallo studio. Infatti, lo SNP in questione oltre ad avere un basso indice di call freq è difficile distinguere a sufficienza il cluster eterozigote (viola) da quello omozigote (blu), quindi i genotipi non possono essere considerati attendibili. Si possono avere SNPs che presentano una sola di queste due problematiche ma devono essere ugualmente eliminati dallo studio.

### 3. Materiali e Metodi

Dato l'enorme numero di SNPs in esame i controlli qualità rimangono automatizzati dal programma mentre rimane all'operatore il compito di impostare i livelli di stringenza di tali controlli ed eventualmente di valutare casi di ambiguità.

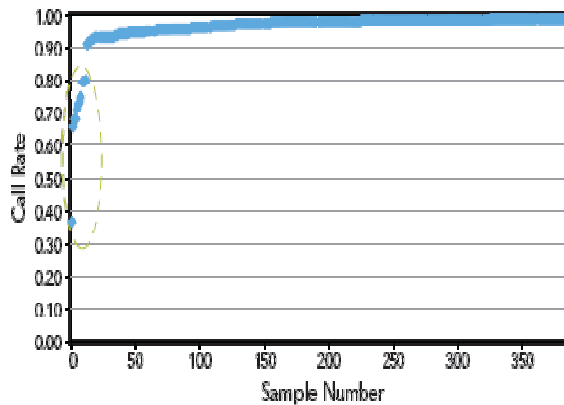


Figura 3.4.1.5: Scatter Plot of Call Rate

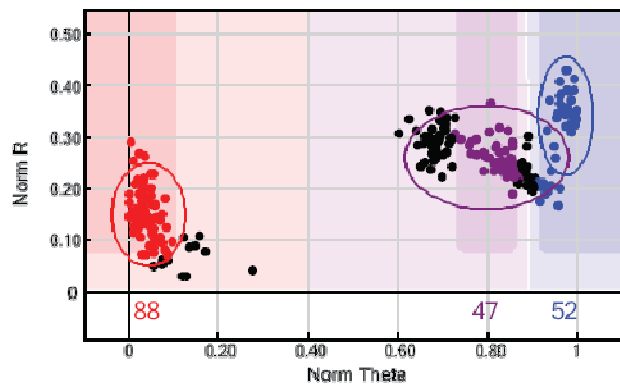


Figura 3.4.1.6: Plot Call Frequency

Gli SNPs sono stati selezionati usando l'algoritmo per i TagSNPs Haploview Software (pairwise tagging parameters:  $r^2 > 0.9$  and  $MAF > 5\%$ , haplotype tagging parameters: minor haplotype frequency (MHF)  $> 5\%$ ) e i dati HapMap per la popolazione in oggetto, CEU.

### 3.3.2 Real-Time PCR (TaqMan)

La PCR real time (RT-PCR) è la tecnologia più sviluppata per PCR negli ultimi anni che permette la visione e la misurazione del prodotto generato durante ogni ciclo del processo di PCR. Tale tecnica è possibile grazie alla presenza di colorazioni fluorescenti, che intercalano il DNA a doppio-filamento, o di oligonucleotidi sonda, disegnati per ibridarsi alla sequenza target di interesse, coniugati con fluorocromi.

La fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto di PCR presente in provetta, per questo essa viene misurata ad ogni ciclo di reazione. Più alto è il numero iniziale della copia dell'acido nucleico target, più rapidamente si osserva un aumento significativo nella fluorescenza sopra il valore basale.

La real time PCR con sonda TaqMan è uno dei primi metodi introdotti per l'RT-PCR ed è largamente applicato sia per la quantificazione del DNA, sia per l'analisi di varianti. 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  $T_m$  (temperatura di melting) aumentato di circa  $10^\circ\text{C}$ , che contengono solitamente una fluorocromo fluorescente con funzione di reporter sulla base in 5' (FAM, VIC) e un fluorocromo con funzione di quencher (solitamente TAMRA) in 3'. Questi oligo non sono estendibili in quanto modificati

chimicamente all'estremità 3'. Una volta irradiato, il fluorocromo eccitato trasferisce l'energia alla molecola quencher vicina. La vicinanza del quencher al reporter impedisce l'emissione di tutta la fluorescenza mentre la sonda è intatta.

Quando la sonda viene distaccata dalla sequenza target ad opera della DNA polimerasi, fluoroforo e quencher vengono separati, il quencher non riesce più ad attuare la sua azione inibitoria e il fluoroforo è libero di dare fluorescenza.

L'assenza di Guanina all'estremità 5' è un requisito specifico delle sonde fluorogeniche. La presenza di una G adiacente al fluorocromo estingue, infatti, la fluorescenza.

La fluorescenza è 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.

Nel nostro lavoro è stata effettuata un'analisi di discriminazione allelica mediante impiego di due diverse sonde (VIC e FAM) di tipo MGB ("Minor Groove Binder") TaqMan in RT-PCT (Applied Biosystems). Una sonda si lega alla sequenza target dove c'è un particolare allele per il polimorfismo, l'altra si lega in presenza dell'allele alternativo.

La procedura prevede l'impiego di 4 µl Master Mix 2x (MMx), contenente la DNA Taq Polimerasi, il Buffer ed i dNTPs, 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 oggetto d'indagine alla concentrazione di 1 ng/µl, per un volume totale di 8 µl. La reazione è stata allestita in apposite piastre da 96 pozzetti, sigillate termicamente con film plastico e centrifugate per 30 secondi a 1000 rpm, allo scopo di eliminare eventuali bolle che potrebbero alterare la lettura.

La piastra viene quindi inserita nell'apparecchio Quantica (Techne) per essere letta otticamente, avviando il programma (Quansoft) di RT-PCR con il software fornito dalla ditta (Techne).

Il programma di RT-PCT 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), in cui le letture ottiche dei fluorocromi FAM e VIC sono previste negli ultimi 30 cicli.

### 3.3.3 Sequenom

Per la genotipizzazione in Sequenom (iPLEX SpectroCHIP MassARRAY, SEQUENOM, Sequenom Inc.) è necessario l'allestimento di piastre figlie da 384 well. L'allestimento di tali piastre è stato condotto grazie all'utilizzo del dispenser robotico, Beckman MC3.

I primer e tutti i reagenti necessari, per i vari step di reazione per la preparazione dello SpectroCHIP vengono ordinati all'azienda produttrice secondo le specifiche richieste.

Gli step di reazione per la preparazione del chip sono: PCR Amplification, SAP Incubation, Primer Extension, Cleaning Resin.

La prima reazione è una normale reazione di PCR che ha lo scopo di amplificare tutti i tratti di genoma d'interesse, cioè i tratti in cui si trovano gli SNPs candidati per l'analisi. Al posto quindi di



### 3. Materiali e Metodi

due soli primers forward e reverse, viene utilizzata una primer mix, che contiene tutte le coppie di primer necessarie. Coma già detto il limite di analisi dichiarato per il sequenom è di 40 SNPs contemporaneamente, ma sperimentalmente il limite funzionale è 35 SNPs.

La reazione viene allestita in un volume di reazione di 5 µl secondo il protocollo seguente:

Reagent	Conc. In 5µl	Volume (1rxn)	Volume (384rxns)*
Nanopure H2O	NA	1.850µl	888µl
PCR Buffer (10x)	1.25x	0.625µl	300µl
MgCl2 (25mM)	1.625mM	0.325µl	156µl
dNTP mix (25mM)**	500mM	0.100µl	48µl
Primer mix (500nM each)	100nM	1.000µl	480µl
Hotstar Taq®(5U/µl)	0.5U/rxn	0.100µl	48µl
Total		5.000µl	2.400µl
*Volumes include a 25% overhang			

Per la reazione di PCR è necessario avere un termociclatore che supporta piastre da 384 pozzetti. A seguire nella piastra contenente i prodotti di PCR, pPCR, vengono aggiunti 2µl di SAP mix, per un volume totale di reazione di 7µl. La SAP mix è allestita secondo il protocollo seguente:

Reagent	Volume (1rxn)	Volume (384rxns)*
Nanopure H2O	1.530µl	734.4 µl
10x SAP buffer	0.170µl	81.6 µl
SAP enzyme (1U/µl)	0.300µl	144.0 µl
Total	2.000µl	960.0 µl
*Volumes include a 25% overhang		

Di nuovo la piastra è incubata nel termociclatore. Dopo questo trattamento che consente di rimuovere i gruppi fosfato dai nucleotidi che non sono stati incorporati, viene allestita la iPLEX mix che consentirà, l'estensione a singola base, permettendo a sua volta la genotipizzazione. Nella piastra contenente i prodotti di PCR, pPCR, vengono aggiunti 2 µl di iPLEX mix, per un volume totale di reazione di 9 µl. Il protocollo per l'iPLEX mix è il seguente:

Reagent	Conc. In 9µl	Volume (1rxn)	Volume (384rxns)**
Nanopure H2O	NA	0.755µl	362.40µl
iPLEX Buffer (10x)	0.222X	0.200µl	96.00µl
iPLEX Extension mix	1X	0.200µl	96.00µl
Primer mix (7µM:14µM)	0.625uM:1.25uM	0.804µl	385.92µl
iPLEX enzyme	1X	0.041µl	19.68µl
Total		2.000µl	960.00µl
**Volumes include a 25% overhang			

La piastra viene nuovamente incubata nel termociclatore. Al termine di quest'ultima reazione di PCR i prodotti vengono diluiti con 16  $\mu$ l di Nanopure H<sub>2</sub>O e purificati con l'aggiunta di una resina in forma di sabbia compatta, la piastra viene poi chiusa con apposito film termosaldabile e centrifugata a 4000 rpm per 7 minuti per favorire il deposito della resina sul fondo dei pozzetti.

Solo ora i campioni hanno subito i trattamenti necessari per l'allestimento dello SpectroCHIP.

Ogni chip con 384 campioni è stato creato in due copie identiche, sul primo viene analizzato il primo assay di SNPs e sul secondo, l'altro.

Inoltre, a seguito delle genotipizzazioni, sono stati condotti dei controlli qualità sulle triadi. I controlli qualità sulle triadi sono più stringenti e problematici rispetto ad uno studio caso controllo. Infatti è sufficiente che uno solo dei tre componenti della triade non risulti un buon campione per le genotipizzazione che l'intera triade deve essere eliminata. Inoltre possono essere presenti inconsistenze mendeliane per alcuni SNPs e non per altri, questo rappresenta un altro caso di esclusione, in altri casi vi è una dubbia corrispondenza tra genitori.

## 3.4 Analisi statistiche

### 3.4.1 Equilibrio di Hardy-Weinberg

Se una popolazione è in equilibrio di Hardy-Weinberg, significa che la riproduzione sessuale non causa la costante riduzione della variabilità genetica a ogni generazione, anzi la variabilità rimane costante di generazione in generazione in assenza però di altre forze perturbanti, quali:

- Effetto del campionamento. È necessario che un campione di popolazione sia per così dire infinito.
- Presenza di immigrazione ed emigrazione, che contribuiscono a modificare il pool genetico, generalmente influenzato dalle sue dinamiche interne.
- Assenza di Panmissia. La probabilità che due individui si incrocino non deve essere influenzata dal genotipo per il carattere in questione. Panmissia significa che i geni di tutti gli individui sono mescolati nel pool genetico e possono essere estratti a sorte per creare i genotipi dei nuovi individui.
- Selezione. Il successo riproduttivo medio degli individui (detto anche fitness) non deve essere influenzato dal genotipo per il carattere in questione. I due (o più) alleli devono quindi avere la stessa probabilità, una volta presenti, di essere trasmessi alle successive generazioni.
- *Mutazione*. Ovviamente le mutazioni alterano la composizione del pool genetico delle nuove generazioni (Snustad e Simmons 2010).

Per un locus biallelico, le frequenze genotipiche vengono definite sulla base delle frequenze alleliche secondo la relazione, definita 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 se la popolazione analizzata è in equilibrio genico di Hardy-Weinberg si utilizza il test del  $\chi^2$  secondo il quale:

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

dove 'g' sono i gradi di libertà, calcolati come (n-1) ovvero il numero di parametri che vengono stimati nell'analisi dei dati meno uno. Il risultato verrà confrontato con i valori tabulati che forniscono, per i diversi gradi di libertà, la probabilità di osservare il corrispondente valore. Se tale valore non è significativo la popolazione analizzata è in equilibrio genico.

### 3.4.2 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 per quel parametro, 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, allora 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 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.

### 3.4.3 Calcolo dell'odds ratio

Negli studi volti a verificare l'esistenza di un'associazione statistica tra un determinato polimorfismo e lo stato di salute/malattia, si possono formulare due diverse ipotesi:

- che vi sia associazione tra un determinato allele o un determinato genotipo con la patologia in esame;
- 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:  $\frac{\frac{p}{(1-p)}}{\frac{q}{(1-q)}} = \frac{p \times (1-q)}{q \times (1-p)}$

### 3. Materiali e Metodi

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

$$\frac{\frac{a}{b}}{\frac{c}{d}} = \frac{a \times d}{c \times b} \text{ dove } \rightarrow$$

	AFFETTO	NON AFFETTO
Presenza polimorfismo	a	b
Assenza polimorfismo	c	d

L'Odds Ratio può assumere valori tra zero e infinito (Figura 3.6.2.1):

- OR < 1 associazione negativa, pertanto, nel nostro caso, l'allele è "protettivo" nei confronti della patologia;
- OR = 1 assenza di associazione, quindi il polimorfismo è indipendente dall'insorgenza della malattia e troviamo la stessa proporzione dell'allele tra gli individui affetti e non affetti.
- OR > 1 associazione positiva, pertanto la presenza dell'allele aumenta il rischio di sviluppare malattia. L'associazione è tanto più elevata quanto più il valore dell'O.R. è grande.

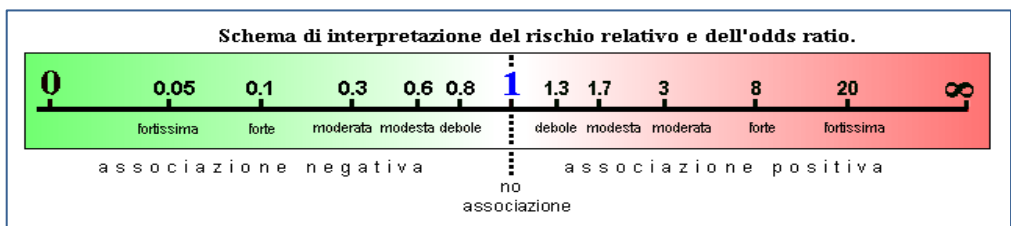


Figura 3.6.2.1: Interpretazione dei valori assunti dall'ODDs

Per verificare se i risultati dell'OR sono significativi si può calcolare l'intervallo di confidenza (IC) 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):

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

Poi si calcola il logaritmo naturale dell'OR e si utilizza la costante pari a 1,96 per un  $\alpha = 0,05$  che corrisponde ad un IC 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.

### 3.4.4 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 possibili composizioni, come riportato in Tabella V. Le coppie di genitori si presentano in 6 diverse combinazioni, Mating Types, MT. Ogni componente la triade, mo: madre; fa: padre; ch: figlio affetto, viene indicato con 2, 1 o 0 a seconda del numero di alleli varianti, ad esempio A, compresi nel suo genotipo (AA: 2; AB: 1; BB: 0).

	<i>mo</i>		<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	

Tabella V: possibili combinazioni genotipiche per una triade composta da madre, padre e figlio affetto.

### 3.4.5 Transmission Disequilibrium Test

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

### 3. Materiali e Metodi

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.

#### 3.4.6 Analisi Log-Lineare dei rischi relativi

L'analisi log-lineare, diversamente dal TDT test che si limita ad analizzare solo alcune triadi informative, considera tutti i possibili 15 tipi di triadi (Wilcox, 1998; Weinberg, 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 VI.

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	$\mu_5$	$p^2(1-p)^2$
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	$\mu_6$	$(1-p)^4$

Tabella VI: Distribuzione delle 15 possibili combinazioni genotipiche per una triade composta da madre, padre e figlio affetto.

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  $\log(2)$  (variabile offset dell'analisi) per la sola triade MFC=111 (viene aggiunto il valore 0 a tutte le altre triadi).



### 3. Materiali e Metodi

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

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  $M_1$  e  $M_2$  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, dose-dipendenti 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.

### 3.4.7 Analisi Log-Lineare dell'interazione gene-ambiente

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 no, 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.

### 3. Materiali e Metodi

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.

#### 3.4.8 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 ( $H_0$ ) 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.

### 3.4.9 La correzione di Yates

La correzione di Yates viene applicata nel caso di tabelle 2x2 che presentino: la numerosità complessiva (n) < 200 oppure uno tra nA, nB, n1, n2 < 40; a, b, c, d > 5. La correzione si attua con la formula:

$$\chi^2 = \frac{(|ad - cb| - n/2)^2 n}{n1 n2 nA nB}$$

### 3.4.10 La 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  $\alpha'$ :  $\alpha'$ :

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

che per i piccoli  $\alpha$  si riduce a:

$$\alpha' = \alpha / k$$

## 3.5 Multifactorial Dimensionality Reduction (MDR)

L'identificazione delle interazioni che coinvolgono fattori genetici e fattori ambientali nelle comuni malattie complesse umane sta assumendo sempre più importanza.

La complessità che sta dietro alla valutazione delle combinazioni di molte variabili diminuisce l'utilità ed il potere dei test statistici parametrici tradizionali.

Tanto aumenta il numero di variabili coinvolte e delle possibili interazioni fra esse, tanto aumenta la "dimensionalità" dell'analisi da eseguire, tanto meno saranno i dati che ricadranno all'interno delle celle di contingenza tra fattori. Questo, nell'analisi di regressione logistica, può portare ad un aumento di errori del primo tipo. La regressione logistica poi, essendo basata su un processo gerarchico di costruzione del modello, ha una capacità limitata nel gestire molti fattori e nel caratterizzare modelli epistatici in assenza di forti effetti principali (Motsinger and Ritchie, 2006).

Per ovviare a questi inconvenienti, è stato sviluppato un nuovo metodo statistico: l'analisi Multifactorial Dimensionality Reduction (MDR).

L'MDR è un test non parametrico e non basato su un modello genetico a priori, alternativo alla regressione logistica, volto ad individuare e caratterizzare interazioni non lineari tra più variabili discrete genetiche ed ambientali in assenza di qualsiasi effetto principale significativo (Moore J. et al., MDR Software Overview Guide Release 1.0.0). Esso classifica i genotipi in "alto-rischio" e "basso-rischio", o "risposta" e "non-risposta", in modo da ridurre la multidimensionalità dei dati in una sola dimensione, migliora così la capacità di individuare combinazioni genetiche e ambientali che conferiscono maggior rischio di malattia.

Come molti altri metodi statistici, l'efficacia dell'MDR dipende da una sua corretta applicazione; visto che questo metodo è usato frequentemente e sta guadagnando consensi negli studi di malattie umane, è importante che gli approcci di utilizzo del programma siano correttamente compresi dagli utenti (Motsinger and Ritchie, 2006).

L'MDR è stato recentemente usato per identificare interazioni in alcuni dataset reali: campioni di cancro al seno sporadico, di ipertensione e diabete di tipo II (Ritchie et al., 2001; Moore and Williams, 2002; Cho et al., 2004). In questi studi il programma ha dimostrato un elevato potere di identificare interazioni, anche in presenza di problemi nei dataset, quali dati mancanti o errori di genotipizzazione.

Per il nostro studio è stato usato il programma MDR versione 2.0 beta 8 fornito dal sito:

<http://www.multifactordimensionalityreduction.org/>

### 3.5.1 Preparazione e caratteristiche dei dati

La dimensione e la struttura dei dati è molto importante. L'analisi in MDR necessita, come file di input, di un file di testo tabulato dove sulla prima riga troviamo i nomi delle variabili categoriche studiate, in colonna i genotipi per ogni individuo, per ogni variabile, nel formato che descritto in seguito, e sull'ultima colonna la classe riferita alla variabile dipendente.

L'analisi in MDR può essere facilmente applicata a studi caso-controllo o a studi di coppie discordanti di fratelli, con piccole o addirittura nessuna modificazione dei dati.

L'MDR è stato disegnato per analizzare l'interazione in dataset composti da variabili categoriche indipendenti, come SNPs o altre variazioni di sequenza, che hanno come punto finale una variabile dipendente che deve essere dicotomica, come caso/controllo, responder/non-responder, o tossicità/non-tossicità.

La variante dicotomica viene indicata con due possibili indici numerici: 1 = affetto e 0 = non affetto. Le variabili categoriche possono essere indicate come genotipi in lettere (AA, Aa o aa), o come numero di alleli malattia posseduti (0, 1 o 2).

Un particolare tipo di dati derivati dalle famiglie sono le triadi dove, come abbiamo già visto, si conoscono i genotipi dei due genitori e del figlio affetto. In questo caso anche questi dati possono essere ricondotti ad un'analisi di fratelli discordanti, con la necessità di creare dei pseudo-controlli sulla base dei genotipi trasmessi e non trasmessi ai figli affetti. Usando la conoscenza degli alleli trasmessi dai due genitori al bimbo affetto si può creare teoricamente un nuovo bambino, detto "antibimbo", portare degli alleli non trasmessi al bimbo malato reale (Motsinger and Ritchie, 2006).

Per esempio, se la madre ha un genotipo Aa per un certo polimorfismo e il suo bimbo affetto ha un genotipo AA, esso deve aver ricevuto dalla madre l'allele A, quindi l'antibimbo teorico avrà ricevuto al contrario l'allele a. Questo ragionamento deve essere fatto per ogni variante studiata, per entrambi i genitori, in modo da creare delle coppie di fratelli tra bimbo e antibimbo.

In questo caso la variabile dipendente sarà 1 per il bimbo e 0 per l'antibimbo.

Le variabili categoriche indipendenti invece assumeranno i tre possibili valori 0, 1 o 2 in base al numero di alleli malattia trasmessi dai genitori.

Nel caso di studi caso-controllo, il dataset è composto da individui non correlati tra loro, perciò l'ordine degli individui è irrilevante e può essere mescolato casualmente durante il test. Se invece il dataset proviene da uno studio di famiglie o fratelli, o da uno studio bimbo-antibimbo, o ancora è basato su confronti tra popolazioni, l'ordine degli individui è molto importante e deve essere mantenuto; in questo caso le coppie a confronto vanno mantenute insieme durante i vari test del programma. L'operatore può stabilire nella configurazione dei parametri se rimescolare casualmente l'ordine degli individui o se mantenere la loro distribuzione uguale a quella fornita inizialmente.

Più il campione analizzato è grande, più è potente l'analisi; simulazioni preliminari ci dicono che dataset composti da meno di 50 casi e 50 controlli mostrano un decremento di potere statistico (Motsinger and Ritchie, 2006).

Quando vi sono dei dati mancanti all'interno del set fornito, l'MDR li include come se fossero un genotipo addizionale; ciò non rappresenta un problema quando i dati mancanti sono pochi, ma nel caso in cui le incognite risultano numerose, si rischia di ricostruire modelli basati maggiormente sui dati mancanti, rispetto a quelli esistenti.

### 3. Materiali e Metodi

Nel caso di analisi su casi e controlli non accoppiati tra loro, se il campione non è bilanciato tra numero di casi e numero di controlli, si possono usare degli accorgimenti forniti dal programma per renderli bilanciati:

- **Sovra-campionamento:** si ricampionano in modo casuale individui provenienti dalla classe meno numerosa fino ad avere un bilanciamento tra casi e controlli;
- **Sotto-campionamento:** si eliminano casualmente individui provenienti dalla classe più numerosa.

Non esiste una regola per determinare quale dei due metodi è preferibile; sussiste comunque un rischio associato a entrambi questi accorgimenti, da una parte di creare un dataset non verosimile, e dall'altra di ridurre la numerosità del campione e quindi il potere del test (Motsinger and Ritchie, 2006).

#### 3.5.2 Dettagli del metodo e configurazione dei parametri

L'MDR analizza i dati aumentando gradualmente il numero di variabili  $N$  preso in considerazione e, ad ogni set di  $N$  variabili, fornisce il modello migliore di interazione.

Ad esempio in uno studio caso-controllo su 10 diversi polimorfismi situati in geni diversi di cui voglio conoscere l'interazione epistatica, l'MDR valuta il modello migliore a 1 polimorfismo, a 2 polimorfismi, a 3 polimorfismi, e così via fino al valore massimo di 10 polimorfismi.

L'analisi può essere suddivisa in diverse fasi:

- **Fase 1.** Il set di dati è suddiviso in partizioni multiple, il cui numero può essere deciso dall'utente, per il test di validazione incrociato. Questo test prova a trovare un modello che, non solo rappresenti i dati analizzati, ma che possa anche predire i dati futuri sconosciuti. Per fare ciò produce un set di dati da analizzare (training data) estrapolandoli dal set iniziale, da essi crea un modello che viene poi valutato sulla parte restante dei dati (testing data). Nel caso di test di validazione incrociato decuplo, per esempio, il set di dati per l'analisi è costituito dal 90% dei dati iniziali, mentre il restante 10% sarà il set usato per la valutazione. Il test viene fatto su ogni possibile 90% dei dati possibile.
- **Fase 2.** Un set di  $N$  fattori genetici ed ambientali tra quelli che compongono il dataset viene selezionato, partendo da un solo fattore, ripetuto per 2, 3, ...,  $N$  fattori (il numero massimo di fattori da studiare può essere stabilito dall'utente).
- **Fase 3.** Tutti gli  $N$  fattori selezionati e le loro possibili classi (genotipi) sono rappresentati in uno spazio multidimensionale a  $N$  dimensioni; ad esempio in caso di due loci con tre possibili genotipi ciascuno, ci sono  $3^2$ , quindi nove, possibili combinazioni a due genotipi.
- **Fase 4.** Successivamente viene calcolato il rapporto tra casi e controlli ad ogni combinazione di genotipi. Ogni classe multifattoriale dello spazio  $N$ -dimensionale viene allora classificata in alto-rischio se il numero di casi supera quello dei controlli, o in basso-rischio se il numero di controlli supera quello dei casi. In questo modo si riduce lo spazio multidimensionale a una sola dimensione con due possibili livelli.

- Fase 5. Tra tutte le combinazioni a N fattori, viene scelto il modello che presenta il più basso tasso di classificazione errata degli individui. Questo modello avrà perciò il più basso errore di classificazione tra tutti i modelli a N loci.
- Fase 6. Per verificare la capacità predittiva del modello selezionato, esso viene testato sul set di dati rimanenti (testing data) calcolando l'errore predittivo. Matematicamente, il calcolo dell'errore predittivo e dell'errore di classificazione è uguale, la differenza risiede sul tipo di dati su cui viene calcolato l'errore, infatti l'errore predittivo è calcolato sui dati di testing, mentre l'errore di classificazione è calcolato sui dati di training (Figura 3.5.2.1)

Per studi con più di due loci presi in considerazione questi step sono ripetuti per ricostruire un modello per ogni 1, 2, 3..., N combinazione di fattori.

Il risultato è una serie di modelli, uno per ogni dimensione di modello possibile. Tra questi l'operatore sceglie quel modello che massimizza la consistenza del test di validazione incrociato e minimizza l'errore predittivo.

La consistenza del test di validazione incrociato è la misura del numero di volte in cui un modello derivato da analisi in MDR è ricavato in ogni possibile 90% del set di dati.

Quando la consistenza è massima per un modello, ma l'errore è minore per un altro, si adotta la strategia della massima parsimonia.

Da notare che, per la selezione del modello migliore, è importante valutare l'errore predittivo e non l'errore di classificazione; questo perché l'errore di classificazione aumenta comunque all'aumentare del numero di loci presi in considerazione.

Un'ulteriore verifica dell'ipotesi del migliore modello selezionato può essere attuata valutandone l'errore di predizione attraverso un test di permutazione.

La teoria che sta dietro al test di permutazione si basa sulla creazione di una distribuzione empirica dell'errore predittivo che ci si aspetta per puro effetto del caso. Questa distribuzione è ricostruita a partire da ogni singolo dataset derivato dalla randomizzazione del dataset iniziale, che ne mima le caratteristiche ed i parametri di configurazione. Una volta costruiti questi set di dati randomizzati, vengono tutti analizzati tramite analisi in MDR, si sceglie il modello migliore, e se ne calcola l'errore predittivo. Tutti gli errori predittivi così calcolati vanno a costituire la distribuzione empirica degli errori predittivi; su questa distribuzione di va a veder dove cade l'errore predittivo del modello migliore derivata dall'analisi iniziale da testare, questo restituisce un p-value di significanza dell'analisi stessa (Motsinger and Ritchie, 2006).

### 3.5.3 Risultati e output del programma

Una volta fatta l'analisi, l'output iniziale del programma è una tabella dove è riportato, per ogni combinazione a 1, 2, 3..., N loci, il modello migliore. Per ogni modello migliore selezionato vengono riportati tre valori:

- **Accuratezza nel training dataset** ossia il rapporto tra il numero di classificazioni corrette effettuate, sul numero totale di individui classificati, nei dati usati per costruire il modello.



### 3. Materiali e Metodi

- **Accuratezza nel testing dataset** cioè il rapporto tra il numero di classificazioni corrette effettuate, sul numero totale di individui classificati, nei dati usati per verificare il modello.
- **Consistenza CV** cioè il numero di volte che quel modello a N loci è risultato migliore all'interno di tutti i test di validazione incrociati effettuati su quel dataset.

Cliccando su uno dei modelli selezionati nella tabella è possibile conoscerne:

- **Graphical Model** cioè lo schema ad N dimensioni con numero di casi e controlli e classificazione alto-rischio/basso-rischio;
- **Best model** in cui sono indicati vari parametri statistici di accuratezza e precisione calcolati per quel modello (Moore et al., MDR Software Overview Guide Release 1.0.0);
- **If-Then results** indica come sono state classificate le varie combinazioni di fattori.

Selezionando modelli diversi nella tabella riassuntiva di output, questi risultati restano sempre uguali in quanto rappresentano una sintesi dell'analisi su tutti gli N fattori presenti nel dataset inizialmente fornito:

- **CV results** sono parametri statistici calcolati per ogni combinazione a N loci.
- **Entropy** è una rappresentazione grafica del tipo e dell'intensità di interazione fra tutti i fattori analizzati. Ci sono diverse scelte per visualizzare questa rappresentazione; per esempio è possibile visualizzare un dendrogramma di interazioni, che è una specie di albero filogenetico che raggruppa i fattori maggiormente relazionati tra loro in modo graduale; distinguendo i diversi tipi di interazione con colori diversi dei rami: l'iterazione sinergica significa (rosso) che i due fattori insieme portano ad un effetto maggiore rispetto alla somma dei singoli effetti di quei fattori; l'interazione ridondante (blu) significa che i due fattori insieme portano ad un effetto pari a quello di uno dei due fattori preso singolarmente.

Il grafico delle interazioni può essere rappresentato anche come una rete tra i vari fattori, dove si mantiene la colorazione in base alla natura dell'interazione stessa, ma inoltre viene indicato un valore di entropia, sulla base del quale si stabilisce anche lo spessore delle linee che uniscono i vari fattori.

L'entropia è definita come una misura di casualità o di disordine all'interno di un sistema; più in specifico, più è basso il valore di entropia, più è alta la probabilità che quel sistema sia in un altro stato maggiormente probabile (Moore et al., MDR Software Overview Guide Release 1.0.0).

## 4. Risultati

---

## 4. Risultati

## 4.1 Associazione tra FAF1 e le palatoschisi

Il gene FAF1 è stato mappato nel braccio corto del cromosoma 1, a livello della regione 1p33, precisamente localizzato nel segmento da 50.679.523 bp a 51.198.524 dal pter di tale cromosoma. I processi molecolari che coinvolgono il gene non sono ancora del tutto stati chiariti, ma è stato associato a numerose componenti molecolari che mediano l'apoptosi e in particolare sembra coinvolto come membro del fas-DISC (fas death-inducing signaling complex) e nella cascata delle caspasi.

Mutazioni nel gene FAF1 provocano la sindrome di Pierre Robin (o sequenza di Pierre Robin) caratterizzata da una triade di anomalie della morfologia oro-facciale: retrognazia, glossoptosi e schisi della parte mediale posteriore del palato molle.

Quindi considerando l'approccio del gene candidato è stato studiato il polimorfismo rs3827730. Tale variante rs3827730 consiste in uno SNP, T>C con allele ancestrale T, che si trova all'interno dell'introne 18 del gene FAF1 sul cromosoma 1, in posizione 1p33. La posizione aminoacidica corrispondente è 375.

Questo studio prevede una casistica che consiste di 284 triadi EUROCRAN composte da soggetti affetti da palatoschisi isolata (CPO) non sindromica e dai due genitori. Per ogni triade sono inoltre stati raccolti dati descrittivi dell'inquadramento clinico del figlio affetto, della gravidanza, della provenienza geografica dei genitori, della loro occupazione e della possibile interazione con fattori di rischio ambientale.

### 4.1.1 Frequenze genotipiche e geniche

La tabella VII riportata di seguito mostra le frequenze genotipiche e alleliche relative al polimorfismo rs3827730 e il calcolo dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, in cui emerge che l'allele ancestrale è il maggiormente rappresentato nella casistica generale, mentre l'omozigosi per l'allele minore è relativamente rara.

Mo	HW				Fa	HW				Ch	HW			
CC	40	14,8%	37,6	13,9%	CC	27	10,0%	26,7	9,8%	CC	25	9,2%	25,1	9,3%
TC	122	45,0%	126,7	46,8%	TC	116	42,8%	116,7	43,1%	TC	115	42,4%	114,8	42,4%
TT	109	40,2%	106,6	39,4%	TT	128	47,2%	127,7	47,1%	TT	131	48,3%	131,1	48,4%
C	202	37,3%	$\chi^2_{\psi}$	0,26	C	170	31,4%	$\chi^2_{\psi}$	0,00	C	165	30,4%	$\chi^2_{\psi}$	0,01
T	340	62,7%	p	0,88	T	372	68,6%	p	1,00	T	377	69,6%	p	1,00
N	271				N	271				N	271			

Tabella VII: frequenze genotipiche e alleliche relative del polimorfismo rs3827730 nella casistica EUROCRAN. Sono mostrati i dati relativi alle madri (Mo), ai padri (Fa) ed ai figli affetti (Ch). In nero sono: il conteggio dei soggetti per ogni genotipo (N) e le loro relative frequenze. In verde sono i valori (HW) e le relative frequenze attesi considerando la popolazione in equilibrio di Hardy-Weinberg. In blu sono: le frequenze alleliche assolute e relative.  $\chi^2_{\psi}$ : Test Chi<sup>2</sup> di Yates.

## 4. Risultati

### 4.1.2 Transmission disequilibrium test

I valori di trasmissione (e non trasmissione) per il polimorfismo rs3827730 T>C sono riferiti all'allele minore o derivato. Nella tabella VIII sottostante sono riportati i valori di TDT e p-value relativi a tale polimorfismo.

CPO rs3827730	
T	98
NT	140
TDT	7,41
p c2	0,006

Tabella VIII: transmission disequilibrium test (TDT): sono stati riportati i valori di TDT e p-value relativi ai tre SNPs in esame nella casistica CPO considerata per l'analisi.

La trasmissione dell'allele minore (non ancestrale) è risultata asimmetrica, con un valore di TDT elevato, di 7.41; questo dato è risultato significativo se rapportato ad un p-value dello 0,006.

Alla luce dei dati ottenuti, per ottenere informazioni aggiuntive sulla popolazione generale, è stata sviluppata una stratificazione secondo il genere (maschio/femmina) del figlio, ovvero del soggetto affetto dalla patologia componente la triade.

I dati ottenuti sono riportati nella seguente tabella IX.

	GENERE rs3827730	
	M	F
T	40	54
NT	66	70
TDT	6,38	2,06
p c2	0,012	0,151

Tabella IX: TDT relativo alla stratificazione per genere.

L'analisi ha mostrato come ci siano evidenze significative in cui è possibile notare una predisposizione alla non trasmissione dell'allele minore nel caso in cui il figlio sia maschio, supportato da un p-value significativo.

Per lo studio della malformazione in esame risulta importante considerare se possano esserci influenze di tipo ambientale, e in che misura possano influenzare la trasmissione degli alleli considerati nello studio. La popolazione in esame è stata quindi stratificata in base alla supplementazione con acido folico in gravidanza.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella X, in cui sono presenti dati significativi, in particolare è evidente una trasmissione asimmetrica, a favore della non trasmissione, in corrispondenza dell'avvenuta supplementazione.

	FOLIC ACID (YES/NO) rs3827730	
	Y	N
T	58	36
NT	91	45
TDT	7,31	1,00
p c2	0,007	0,317

Tabella X: TDT relativo alla stratificazione per assunzione di acido folico in gravidanza.

L'analisi del TDT relativo all'interazione tra assunzione di acido folico e trasmissione allelica è stata poi ulteriormente ampliata stratificando la popolazione per genere del figlio affetto (Tabella XI).

rs3827730	MALE		FEMALE	
	FOLIC ACID (YES/NO)			
	Y	N	Y	N
T	22	15	36	17
NT	39	23	52	18
TDT	4,74	1,68	2,91	0,03
p c2	0,030	0,194	0,088	0,866

Tabella XI: TDT relativo alla stratificazione per assunzione di acido folico in gravidanza e genere

Dalla tabella XII emerge una prevalenza di non trasmissione, nei figli maschi, nel caso in cui la madre abbia assunto acido folico in gravidanza.

È stata condotta un'ulteriore stratificazione considerando il fumo di sigaretta in gravidanza.

Anche in questa analisi è presente una trasmissione asimmetrica e significativa, che interessa il polimorfismo oggetto di studio, in cui è presente una minore trasmissione dell'allele minore nel caso di assenza di uso di tabacco durante la gravidanza (Tabella XII).

	SMOKE (YES/NO) rs3827730	
	Y	N
T	19	77
NT	31	107
TDT	2,88	4,89
p c2	0,090	0,027

Tabella XII: TDT relativo alla stratificazione per uso di tabacco in gravidanza

#### 4. Risultati

Questa stratificazione è stata poi integrata suddividendo la popolazione in esame in base al genere del figlio affetto. La tabella XIII di seguito riporta i risultati ottenuti.

rs3827730	MASCHI		FEMMINE	
	SMOKE (YES/NO)			
	Y	N	Y	N
T	11	29	8	46
NT	11	55	20	49
TDT	0,00	8,05	5,14	0,09
p c2	1,000	0,005	0,023	0,758

Tabella XIII: TDT relativo alla stratificazione per fumo in gravidanza e genere.

Anche questa stratificazione ha prodotto risultati significativi in cui si registra un aumento della non trasmissione in assenza di uso di tabacco, nei figli maschi e in caso di uso di tabacco nelle figlie femmine.

#### 4.1.3 Analisi Log-lineare dei Rischi Relativi

L'analisi log-lineare ha permesso il calcolo dei rischi relativi (RR) per il polimorfismo rs3827730 ai genotipi eterozigote (TC) ed omozigote (CC). Di seguito sono riportate le tabelle XIV dei RR calcolati per tale polimorfismo.

rs3827730 T>C

	CPO	RR							
mother	TC	1,24	(	0,88	-	1,73	)	p =	0,215
mother	CC	1,99	(	1,16	-	3,41	)	p =	0,013
child	TC	0,70	(	0,51	-	0,97	)	p =	0,033
child	CC	0,62	(	0,35	-	1,09	)	p =	0,100

	CPO	RR							
mother	C-	1,24	(	0,88	-	1,73	)	p =	0,215
child	C-	0,70	(	0,51	-	0,97	)	p =	0,033
mother	CC	1,61	(	1,06	-	2,44	)	p =	0,025
child	CC	0,89	(	0,56	-	1,41	)	p =	0,618

Tabella XIV: rischi relativi delle madri e dei figli secondo un dato genotipo, con relativo p-value

La prima tabella XIV evidenzia come il genotipo CC portato dalla madre determina un aumento del rischio relativo di circa due volte, con un p-value significativo, mentre il genotipo TC del figlio risulta protettivo, con un rischio relativo di 0.70.

La seconda tabella XIII, in accordo con i dati presenti nella prima, mostra che l'allele C nel modello dominante presente nel figlio, ha un effetto protettivo, mentre si ha un aumento del rischio nel modello recessivo, se presente nella madre. Tali dati risultano significativi in quanto supportati da p-value inferiori alla soglia dello 0.05.

Per ampliare tale analisi sono state introdotte delle stratificazioni nella popolazione generale, che riprendono quelle già effettuate per il calcolo dei TDT.

La popolazione è stata quindi inizialmente suddivisa in base al genere del figlio e di seguito vengono riportate le tabelle XV relative al polimorfismo studiato; con i valori di  $\chi^2$  e di Prob  $> \chi^2$ , che vengono introdotti per verificare se le frequenze osservate differiscono significativamente dalle frequenze teoriche.

rs3827730 GENDER (MALE/FEMALE)											
m.d.	CPO	RR					$\chi^2$	p			
mother	male	1,58	(	0,83	-	3,00	)	p =	0,165	0,98	0,32
mother	fem	1,06	(	0,68	-	1,65	)	p =	0,802		
child	male	0,49	(	0,29	-	0,81	)	p =	0,005	3,31	0,07
child	fem	0,91	(	0,58	-	1,41	)	p =	0,665		

rs3827730 GENDER (MALE/FEMALE)											
m.r.	CPO	RR					$\chi^2$	p			
mother	male	1,37	(	0,74	-	2,53	)	p =	0,320	0,09	0,77
mother	fem	1,54	(	0,92	-	2,58	)	p =	0,103		
child	male	0,88	(	0,45	-	1,73	)	p =	0,712	0,68	0,41
child	fem	0,60	(	0,32	-	1,13	)	p =	0,112		

Tabelle XV: rischi relativi calcolati stratificando per genere.

I dati ottenuti non risultano significativi, anche se alcuni dati mostrano un RR importante, poiché al fine di fornire dati veritieri è necessario considerare il  $\chi^2$  e il Prob  $> \chi^2$ , che in questo caso non risultano significativi; è presente solo una tendenza alla protezione per il figlio maschio.

Successivamente è stata effettuata la stratificazione in base alla supplementazione con folati in gravidanza da parte della madre (Tabelle XVI).

rs3827730 FOLIC ACID (+FA/noFA)											
m.d.	CPO	RR					$\chi^2$	p			
mother	+FA	1,75	(	1,06	-	2,92	)	p =	0,030	3,45	0,06
mother	noFA	0,87	(	0,51	-	1,48	)	p =	0,607		
child	+FA	0,73	(	0,47	-	1,14	)	p =	0,166	0,10	0,75
child	noFA	0,66	(	0,39	-	1,11	)	p =	0,119		

rs3827730 FOLIC ACID (+FA/noFA)											
m.r.	CPO	RR					$\chi^2$	p			
mother	+FA	1,39	(	0,86	-	2,27	)	p =	0,179	1,34	0,24
mother	noFA	1,25	(	0,61	-	2,58	)	p =	0,539		
child	+FA	0,51	(	0,28	-	0,94	)	p =	0,030	2,43	0,12
child	noFA	1,09	(	0,52	-	2,29	)	p =	0,826		

Tabelle XVI: rischi relativi calcolati stratificando secondo la supplementazione con acido folico



## 4. Risultati

Tali valori indicano un effetto protettivo per il figlio nel caso in cui la madre abbia correttamente assunto acido folico in gravidanza, ma nel modello dominante, l'assunzione di acido folico porta, nella madre, a un rischio aumentato di trasmissione dell'allele minore.

Le tabelle XVII mostrano i calcoli statistici dei rischi relativi associati ad uso di tabacco durante il periodo di gravidanza da parte della madre.

rs3827730 SMOKE (+Sm/noSm)										
m.d.	CPO	RR					p =		$\chi^2$	P
mother	+Sm	4,60	(	1,83	-	11,57	)	0,001	5,22	0,02
mother	noSm	1,42	(	0,96	-	2,09	)	0,080		
child	+Sm	0,39	(	0,18	-	0,82	)	0,013	3,08	0,07
child	noSm	0,82	(	0,56	-	1,19	)	0,298		

m.r.	CPO	RR					p =		$\chi^2$	p
mother	+Sm	3,44	(	1,51	-	7,81	)	0,003	5,53	0,02
mother	noSm	1,13	(	0,72	-	1,78	)	0,599		
child	+Sm	1,27	(	0,46	-	3,48	)	0,648	1,66	0,20
child	noSm	0,60	(	0,36	-	1,01	)	0,056		

Tabelle XVII: rischi relativi calcolati stratificando per uso di tabacco, per il polimorfismo rs3827730.

Dai dati in tabella è possibile notare come il rischio relativo di trasmettere l'allele minore aumenta per le madri che hanno fatto uso di tabacco in gravidanza, sia nel modello dominante che nel modello recessivo.

### 4.1.4 Analisi log-lineare dell'interazione Gene-Ambiente

L'analisi dell'interazione gene-ambiente (gene-environment interaction GEI) viene convenientemente eseguita applicando il modello log-lineare. L'analisi viene eseguita dicotomizzando la casistica a seconda dell'esposizione o non-esposizione al fattore di rischio ambientale oggetto di indagine.

Attraverso l'implementazione di programmi di calcolo, quali STATA, vengono calcolati i rischi relativi ai diversi genotipi nella madre e nel figlio, nelle condizioni di esposizione e di non-esposizione. Da questi vengono infine derivati i rapporti di rischio, che forniscono una misura del grado di interazione.

#### 4.1.4.1 Analisi GEI con la supplementazione con folati in gravidanza

Il calcolo dei valori di RR è stato eseguito secondo il modello dominante, nelle triadi in cui la madre ha avuto integrazione con folati o multivitaminici durante il secondo-terzo mese di gravidanza e nelle triadi nelle quali la madre non ha avuto la supplementazione durante il periodo gestazionale, critico per la chiusura del palato; calcolando poi la significatività delle eventuali differenze

osservate nei RR in condizione di supplementazione o non-supplementazione con folati in gravidanza.

L'analisi GEI in questo caso è stata integrata introducendo una nuova stratificazione, ovvero la suddivisione della popolazione in esame per genere del nascituro, mantenendo costante la stratificazione per assunzione o meno di acido folico in gravidanza da parte della madre.

Questa ulteriore stratificazione permette di verificare se, relativamente all'assunzione o meno di acido folico, ci sia una trasmissione dell'allele minore preferenziale al figlio maschio o alla figlia femmina (Tabelle XVIII).

rs3827730 <b>MALE</b> – FOLIC ACID (YES/NO)										
m.d.	CPO	RR	(		-	)	p =	$\chi^2$	p	
mother	+FA	1,01	(	0,40	-	2,54	)	0,984	0,09	0,76
mother	noFA	1,22	(	0,56	-	2,63	)	0,617		
child	+FA	0,49	(	0,25	-	0,98	)	0,043	0,00	0,98
child	noFA	0,50	(	0,23	-	1,07	)	0,076		

rs3827730 <b>FEMALE</b> – FOLIC ACID (YES/NO)										
m.r.	CPO	RR	(		-	)	p =	$\chi^2$	p	
mother	+FA	0,75	(	0,29	-	1,91	)	0,549	2,35	0,12
mother	noFA	2,08	(	0,82	-	5,30	)	0,124		
child	+FA	0,58	(	0,21	-	1,59	)	0,290	1,22	0,27
child	noFA	1,28	(	0,47	-	3,53	)	0,627		

rs3827730 <b>MALE</b> – FOLIC ACID (YES/NO)										
m.d.	CPO	RR	(		-	)	p =	$\chi^2$	p	
mother	+FA	2,24	(	1,20	-	4,18	)	0,011	4,60	0,03
mother	noFA	0,75	(	0,34	-	1,63	)	0,465		
child	+FA	1,01	(	0,56	-	1,81	)	0,980	0,36	0,54
child	noFA	0,75	(	0,34	-	1,63	)	0,465		

rs3827730 <b>FEMALE</b> – FOLIC ACID (YES/NO)										
m.r.	CPO	RR	(		-	)	p =	$\chi^2$	p	
mother	+FA	1,80	(	1,00	-	3,22	)	0,049	1,51	0,22
mother	noFA	0,75	(	0,21	-	2,70	)	0,659		
child	+FA	0,46	(	0,21	-	0,98	)	0,045	1,60	0,20
child	noFA	1,11	(	0,35	-	3,51	)	0,860		

Tabelle XVIII: rischi relativi calcolati stratificando secondo la supplementazione con acido folico e per genere.

Il polimorfismo rs3827730 presenta un aumento del rischio relativo per la madre di trasmettere l'allele minore in caso di assunzione di acido folico, nel modello dominante (TC/CC).

#### 4.1.4.2 Analisi GEI con l'esposizione in gravidanza al fumo di sigaretta

L'analisi GEI, relativa all'esposizione delle madri al fumo di sigaretta durante il periodo critico di chiusura del palato (secondo-terzo trimestre di gravidanza), è stata eseguita in modo analogo a quella relativa all'integrazione con folati.

Così come per l'analisi precedente la casistica è stata stratificata oltre che per esposizione o meno al fumo di sigaretta, per genere del figlio affetto (Tabelle XIX). Come nel caso precedente, questa

#### 4. Risultati

ulteriore stratificazione, è stata effettuata per verificare se la trasmissione dell'allele minore, nel modello dominante e recessivo, possa dipendere dal genere del nascituro.

rs3827730 **MALE** – SMOKE (YES/NO)

m.d.	CPO	RR					$\chi^2$	p		
mother	+Sm	3,80	(	1,01	-	14,31	)	p = 0,049	0,62	0,43
mother	noSm	2,10	(	1,15	-	3,81	)	p = 0,015		
child	+Sm	0,59	(	0,20	-	1,69	)	p = 0,323	0,11	0,74
child	noSm	0,48	(	0,28	-	0,84	)	p = 0,010		

m.r.	CPO	RR					$\chi^2$	p		
mother	+Sm	3,06	(	0,85	-	11,00	)	p = 0,086	2,29	0,13
mother	noSm	1,01	(	0,50	-	2,03	)	p = 0,988		
child	+Sm	1,99	(	0,50	-	7,94	)	p = 0,330	1,96	0,16
child	noSm	0,65	(	0,30	-	1,41	)	p = 0,271		

rs3827730 **FEMALE** – SMOKE (YES/NO)

m.d.	CPO	RR					$\chi^2$	p		
mother	+Sm	5,41	(	1,46	-	19,99	)	p = 0,011	4,72	0,02
mother	noSm	1,12	(	0,67	-	1,89	)	p = 0,659		
child	+Sm	0,26	(	0,09	-	0,77	)	p = 0,016	6,80	0,009
child	noSm	1,30	(	0,77	-	2,20	)	p = 0,321		

m.r.	CPO	RR					$\chi^2$	p		
mother	+Sm	3,64	(	1,25	-	10,64	)	p = 0,018	2,87	0,09
mother	noSm	1,28	(	0,70	-	2,32	)	p = 0,420		
child	+Sm	0,79	(	0,17	-	3,68	)	p = 0,769	0,12	0,72
child	noSm	0,59	(	0,29	-	1,19	)	p = 0,138		

Tabelle XIX: rischi relativi calcolati stratificando per esposizione a fumo di sigaretta e per genere per il polimorfismo rs3827730 (m.d. modello dominante e m.r. modello recessivo).

La stratificazione per esposizione al fumo, associata al genere del figlio affetto, evidenzia un rischio relativo aumentato di 5,41 volte, nel modello dominante, di trasmissione dell'allele minore per la madre esposta a fumo di sigaretta, nel caso la figlia sia femmina e un livello di protezione, sempre per il genere femminile, per genotipo TC/CC, nel caso la madre sia stata esposta al fumo. Questo non significa che il fumo da protezione, ma che il rischio è aumentato nel caso il figlio abbia un genotipo TT.

## 4.2 Associazione tra IRF6 e le Labio/Palatoschisi

Il gene IRF6, considerato il gene candidato per le labiopalatoschisi, poiché responsabile della sindrome di Van der Woude (VWS), condizione sindromica più frequente all'interno, appunto, delle labio-palatoschisi, è oggetto del presente studio. Sono state genotipizzate le varianti rs642961 e rs2235371 applicando l'analisi di discriminazione allelica, mediante PCR real time, nella casistica EUROCRAN (EU).

La variante rs642961 consiste in uno SNP, G>A con allele ancestrale G, che si trova in un enhancer del gene IRF6 sul cromosoma 1, in posizione 1q32.3-q41. La posizione amminoacidica corrispondente è 477.

La variante rs2235371 consiste in un SNP, A>G con allele ancestrale G, che si trova all'interno dell'esone 7 del gene IRF6 sul cromosoma 1, in posizione 1q32.3-q41. La posizione amminoacidica corrispondente è 274, la mutazione è una missenso p.V274I.

### 4.2.1 Frequenze genotipiche e geniche

Da questa tabella XX possiamo vedere come l'allele G del polimorfismo rs2235371 abbia un'altissima frequenza all'interno della casistica globale. L'allele G risulta essere associato con le schisi orofacciali non sindromiche, ma essendo l'allele ancestrale, comune, con una frequenza superiore al 97%, non si è ritenuto interessante stratificare la casistica per questa variante.

Mo	HW				Fa	HW				Ch	HW			
GG	511	60.8%	504.7	60.0%	GG	496	59.0%	497.0	59.1%	GG	469	55.8%	476.4	56.7%
GA	281	33.4%	293.6	34.9%	GA	301	35.8%	299.0	35.6%	GA	328	39.0%	313.1	37.2%
AA	49	5.8%	42.7	5.1%	AA	44	5.2%	45.0	5.3%	AA	44	5.2%	51.4	6.1%
G	1303	77.5%	$\chi^2\psi$	1.35	G	1293	76.9%	$\chi^2\psi$	0.01	G	1266	75.3%	$\chi^2\psi$	1.70
A	379	22.5%	p	0.51	A	389	23.1%	p	0.99	A	416	24.7%	p	0.43
N	841				N	841				N	841			

Mo	HW				Fa	HW				Ch	HW			
GG	805	97.8%	804.1	97.7%	GG	801	97.3%	801.1	97.3%	GG	804	97.7%	804.1	97.7%
GA	17	2.1%	18.8	2.3%	GA	22	2.7%	21.7	2.6%	GA	19	2.3%	18.8	2.3%
AA	1	0.1%	0.1	0.0%	AA	0	0.0%	0.1	0.0%	AA	0	0.0%	0.1	0.0%
G	1627	98.8%	$\chi^2\psi$	1.48	G	1624	98.7%	$\chi^2\psi$	0.85	G	1627	98.8%	$\chi^2\psi$	1.39
A	19	1.2%	p	0.48	A	22	1.3%	p	0.65	A	19	1.2%	p	0.50
N	841				N	841				N	841			

Tabelle XX: frequenze genotipiche e alleliche relative al polimorfismo rs642961 (sopra) ed al polimorfismo rs2235371 (sotto) nella casistica EUROCRAN. Sono riportati i dati relativi alle madri (Mo), ai padri (Fa) ed ai figli affetti (Ch). In nero sono: il conteggio dei soggetti per ogni genotipo (N) e le loro relative frequenze. In verde sono indicati i valori (HW) e le relative frequenze attese considerando la popolazione in equilibrio di Hardy-Weinberg. In blu sono: le frequenze alleliche assolute e relative. -2y: Test Chi2 di Yates.

#### 4. Risultati

#### 4.2.2 Transmission disequilibrium test

I valori di trasmissione (e non trasmissione) per il polimorfismo rs642961 G>A, e per il polimorfismo rs2235371 G>A sono riferiti all'allele minore o derivato. Nelle seguenti tabelle XXI sono riportati i valori di TDT di entrambi i polimorfismi.

rs642961							
	OFC	CL/P	CL	CLP	UCL/P	BCL/P	CPO
T	323	254	117	137	92	27	69
NT	259	188	68	120	69	21	71
$\chi^2$	7,04	9,86	13,0	1,12	3,29	0,75	0,03
p	0,008	0,002	0,000	0,289	0,070	0,386	0,866

rs2235371							
	OFC	CL/P	CL	CLP	UCL/P	BCL/P	CPO
T	18	13	2	11	6	0	5
NT	21	14	7	7	3	2	7
$\chi^2$	0,23	0,04	2,78	0,89	1,00	2,00	0,33
p	0,631	0,847	0,096	0,346	0,317	0,157	0,564

Tabelle XXI: valori dei TDT calcolati sulla casistica Eurocran, stratificata secondo il tipo di schisi, per il polimorfismo rs642961 e rs2235371, con relativo  $\chi^2$  e p-value.

Nella globalità delle schisi orofacciali risulta una sovra-trasmissione dell'allele minore A, per il polimorfismo rs642961. In particolare questa evidenza si ritrova nelle labioschisi con o senza palatoschisi, principalmente in due tipologie: la labioschisi isolata e la labioschisi unilaterale con o senza palatoschisi. Per il polimorfismo rs2235371 invece non si riscontra nessuna sovra-trasmissione.

La casistica è stata poi stratificata per verificare in che modo alcuni principali fattori ambientali possano essere coinvolti nella trasmissione/non-trasmissione dell'allele minore del polimorfismo rs642961. I fattori ambientali studiati sono la supplementazione con folati in gravidanza (Tabelle XXII) e il fumo di sigaretta (Tabelle XXIII).

folate Y							
EU							
	OFC	CL/P	CL	CLP	UCL/P	BCL/P	CPO
T	225	178	82	96	74	19	46
NT	168	133	53	80	54	13	34
$\chi^2$	8,27	6,51	6,23	1,45	3,13	1,13	1,80
p	0,004	0,011	0,013	0,228	0,077	0,289	0,180

folate N							
EU							
	OFC	CL/P	CL	CLP	UCL/P	BCL/P	CPO
T	94	70	30	40	17	8	21
NT	91	53	14	39	15	8	32
$\chi^2$	0,05	2,35	5,82	0,01	0,13	0,00	2,28
p	0,825	0,125	0,016	0,910	0,724	1,000	0,131

Tabelle XXII: valori dei TDT calcolati sulla casistica Eurocran (EU), stratificata secondo esposizione (folateY) o meno al fumo di sigaretta (folate N) e al tipo di schisi, per il polimorfismo rs642961, con relativo  $\chi^2$  e p-value.

Nella casistica globale la supplementazione o meno con i folati non comporta una diversa associazione. L'allele minore A sembra, infatti, associare con il fenotipo di labioschisi isolata indipendentemente dall'assunzione di folati.

Per quanto concerne la stratificazione, nella popolazione generale, per il fumo di sigaretta in gravidanza, i risultati del TDT sono riportati nelle tabelle XXIII.

smoke Y							
EU							
	OFC	CL/P	CL	CLP	UCL/P	BCL/P	CPO
T	88	79	33	46	26	6	9
NT	64	47	12	35	16	4	17
$\chi^2$	3,79	8,13	9,80	1,49	2,38	0,40	2,46
p	0,052	0,004	0,002	0,222	0,123	0,527	0,117

smoke N							
EU							
	OFC	CL/P	CL	CLP	UCL/P	BCL/P	CPO
T	236	174	84	90	66	20	58
NT	199	139	56	83	52	17	53
$\chi^2$	3,15	3,91	5,60	0,28	1,66	0,24	0,23
p	0,076	0,048	0,018	0,595	0,197	0,622	0,635

Tabelle XXIII: valori dei TDT calcolati sulla casistica Eurocran (EU), stratificata secondo assunzione (smoke Y) o meno (smoke N) e al tipo di schisi, per il polimorfismo rs642961, con relativo  $\chi^2$  e p-value.

All'interno della casistica globale EU, l'allele minore è sovra-trasmesso, sia che la madre abbia fumato in gravidanza, sia che la madre non abbia fumato. E' possibile quindi supporre che il fumo non intervenga direttamente nell'alterazione di quello che è lo specifico processo di sviluppo embrionale del labbro e palato e che quindi non comporti la trasmissione preferenziale di un allele, piuttosto di un altro, che potrebbe provocare il fenotipo di schisi.

### 4.2.3 Analisi log-lineare dei Rischi Relativi

L'analisi log-lineare delle triadi inserite nello studio ha consentito di calcolare i rischi relativi (RR) per il polimorfismo rs642961 ai genotipi eterozigote (GA) ed omozigote (AA) nella madre e nel figlio affetto, e per il polimorfismo rs2235371 ai genotipi eterozigote (GA) ed omozigote (AA) nella madre e nel figlio affetto. Nel primo polimorfismo è, infatti, l'allele A derivato ad associare con alcuni tipi di schisi orofacciali non sindromiche, mentre nel secondo polimorfismo è l'allele G ancestrale a mostrare un'associazione.

Nelle tabelle XXIV sono riportati i rischi relativi associati ai genotipi IRF6 rs642961 nelle madri e nei figli, calcolati nella casistica complessiva di schisi orofacciali (OFC), labioschisi con o senza palatoschisi (CL/P), labioschisi senza palatoschisi, labioschisi unilaterali con o senza palatoschisi (UCL/P), bilaterali con o senza palatoschisi (BCL/P) e relativamente alle palatoschisi isolate (CPO).

		OFC	RR				
<b>OFC</b>	mo	GA	0,91	( 0,76 - 1,10 )	p =	0,325	
	mo	AA	1,07	( 0,74 - 1,54 )	p =	0,724	
	ch	GA	1,33	( 1,10 - 1,60 )	p =	0,003	
	ch	AA	1,35	( 0,91 - 2,00 )	p =	0,130	

		CL/P	RR				
<b>CL/P</b>	mo	GA	1,00	( 0,81 - 1,24 )	p =	0,977	
	mo	AA	1,27	( 0,84 - 1,91 )	p =	0,266	
	ch	GA	1,43	( 1,15 - 1,78 )	p =	0,001	
	ch	AA	1,69	( 1,09 - 2,60 )	p =	0,018	

		CL	RR				
<b>CL</b>	mo	GA	1,17	( 0,83 - 1,66 )	p =	0,369	
	mo	AA	1,33	( 0,68 - 2,60 )	p =	0,412	
	ch	GA	1,99	( 1,38 - 2,86 )	p =	0,000	
	ch	AA	2,81	( 1,43 - 5,54 )	p =	0,003	

		CLP	RR				
<b>CLP</b>	mo	GA	0,91	( 0,69 - 1,19 )	p =	0,491	
	mo	AA	1,24	( 0,74 - 2,10 )	p =	0,416	
	ch	GA	1,18	( 0,89 - 1,55 )	p =	0,250	
	ch	AA	1,21	( 0,68 - 2,14 )	p =	0,515	

		CPO	RR				
<b>CPO</b>	mo	GA	0,72	( 0,50 - 1,02 )	p =	0,064	
	mo	AA	0,59	( 0,25 - 1,40 )	p =	0,232	
	ch	GA	1,11	( 0,78 - 1,58 )	p =	0,561	
	ch	AA	0,49	( 0,16 - 1,45 )	p =	0,196	

Tabelle XXIV: rischi relativi (RR) associati ai genotipi IRF6 rs642961 nelle madri e nei figli. Per ogni genotipo è indicato l'intervallo di confidenza al 95% (tra parentesi) e la significatività (p).

Per quanto riguarda i rischi relativi (RR) associati ai genotipi IRF6 rs2235371 nelle madri e nei figli, calcolati nella casistica complessiva di schisi orofacciali (OFC), labioschisi con o senza palatoschisi (CL/P), labioschisi senza palatoschisi, labioschisi con palatoschisi, labioschisi unilaterali con o senza palatoschisi (UCL/P), bilaterali con o senza palatoschisi (BCL/P) e relativamente alle palatoschisi isolate (CPO), sono riportati nelle seguenti tabelle XXV.

		OFC		RR			
<b>OFC</b>	mo	GA	0,78	( 0,41 - 1,47 )	p =	0,443	
	mo	AA	6,91	( 0,82 - 58,14 )	p =	0,075	
	ch	GA	0,87	( 0,46 - 1,63 )	p =	0,655	
	ch	AA	-	-	p =	0,997	
		CL/P		RR			
<b>CL/P</b>	mo	GA	0,50	( 0,22 - 1,12 )	p =	0,093	
	mo	AA	7,31	( 0,84 - 63,76 )	p =	0,072	
	ch	GA	0,94	( 0,44 - 2,01 )	p =	0,867	
	ch	AA	-	-	p =	0,997	
		CL		RR			
<b>CL</b>	mo	GA	0,80	( 0,21 - 3,01 )	p =	0,737	
	mo	AA	-	-	p =	n/c	
	ch	GA	0,29	( 0,06 - 1,39 )	p =	0,120	
	ch	AA	-	-	p =	0,997	
		CLP		RR			
<b>CLP</b>	mo	GA	0,39	( 0,14 - 1,09 )	p =	0,074	
	mo	AA	9,23	( 0,97 - 87,49 )	p =	0,053	
	ch	GA	1,58	( 0,61 - 4,10 )	p =	0,347	
	ch	AA	-	-	p =	n/c	
		CPO		RR			
<b>CPO</b>	mo	GA	2,00	( 0,60 - 6,64 )	p =	0,258	
	mo	AA	-	-	p =	n/c	
	ch	GA	0,71	( 0,23 - 2,25 )	p =	0,566	
	ch	AA	-	-	p =	n/c	

Tabelle XXV: Rischi relativi (RR) associati ai genotipi IRF6 rs2235371 nelle madri e nei figli, Per ogni genotipo è indicato l'intervallo di confidenza al 95% (tra parentesi) e la significatività (p).

E' possibile notare da questa prima analisi come solamente il polimorfismo rs642961 mostri dei rischi relativi aumentati in rapporto a certi particolari fenotipi di schisi, mentre il polimorfismo rs2235371 non mostra nessuna variazione significativa nei rischi relativi, né verso un effetto protettivo, né verso un effetto di rischio.

Per quanto riguarda le labioschisi con o senza palatoschisi, all'interno della casistica globale, per il polimorfismo rs642961 il rischio relativo risulta aumentato di circa 1.5 volte per i probandi che sono eterozigoti od omozigoti per l'allele A. Nello specifico l'eterozigote presenta un rischio di 1.4 volte



#### 4. Risultati

aumentato (RR 1.43; 95% C.I. 1.15-1.78) con un livello di significatività p-value=0.001; mentre l'omozigote presenta un rischio aumentato di circa 1.6 volte (RR 1.69; 95% C.I. 1.09-2.60) con un livello di significatività p-value=0.018.

Stratificando poi la casistica a seconda del tipo di schisi, queste evidenze risultano riconducibili alla labioschisi isolata. La labioschisi isolata mostra un rischio aumentato di 2 volte nell'eterozigote (RR 1.99; 95% C.I. 1.38-2.86) con un livello di significatività p-value=0.000 e 3 volte nell'omozigote (RR 2.81; 95% C.I. 1.43-5.53) con un livello di significatività p-value=0.003.

Anche in questo caso l'analisi d'interazione gene-ambiente (gene-environment interaction, GEI) è stata calcolata dicotomizzando le triadi a seconda che siano state esposte o non ad un 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 d'interazione. Seguendo questo modello, i rischi relativi sono stati calcolati a partire dalla casistica globale, mantenendo la stessa stratificazione per la tipologia di schisi e dicotomizzando secondo il sesso (considerandolo come un fattore ambientale). Nel calcolo si è arbitrariamente stabilito che: maschio=n (non esposto) e femmina=e (esposto).

Poiché l'allele A del polimorfismo rs642961 sembra avere effetto anche in eterozigosi, il calcolo dei rischi relativi è stato condotto utilizzando un modello di trasmissione dominante (Tabelle XXVI).

	OFC	RR			$\chi^2$	p
<b>OFC</b>	mo	M	1,08 ( 0,71 - 1,64 )	p = 0,719	2,24	0,135
	mo	F	0,73 ( 0,55 - 0,97 )	p = 0,032		
	ch	M	1,43 ( 1,12 - 1,82 )	p = 0,004	0,78	0,377
	ch	F	1,21 ( 0,91 - 1,60 )	p = 0,194		
<b>CL/P</b>	mo	M	1,02 ( 0,65 - 1,61 )	p = 0,929	0,84	0,301
	mo	F	0,78 ( 0,55 - 1,10 )	p = 0,163		
	ch	M	1,68 ( 1,27 - 2,21 )	p = 0,000	3,50	0,061
	ch	F	1,10 ( 0,78 - 1,55 )	p = 0,593		
<b>CL</b>	mo	M	0,70 ( 0,31 - 1,58 )	p = 0,388	0,70	0,402
	mo	F	1,06 ( 0,62 - 1,82 )	p = 0,826		
	ch	M	2,17 ( 1,37 - 3,44 )	p = 0,001	0,75	0,385
	ch	F	1,58 ( 0,92 - 2,74 )	p = 0,099		
<b>CLP</b>	mo	M	1,28 ( 0,74 - 2,21 )	p = 0,376	3,90	0,048
	mo	F	0,62 ( 0,40 - 0,99 )	p = 0,043		
	ch	M	1,44 ( 1,01 - 2,04 )	p = 0,044	3,21	0,073
	ch	F	0,85 ( 0,54 - 1,34 )	p = 0,485		

	CPO	RR			$\chi^2$	p
<b>CPO</b>	mo	M	1,42 ( 0,47 - 4,24 )	p = 0,533	1,66	0,197
	mo	F	0,64 ( 0,39 - 1,05 )	p = 0,076		
	ch	M	0,82 ( 0,47 - 1,43 )	p = 0,479	2,19	0,138
	ch	F	1,43 ( 0,88 - 2,35 )	p = 0,151		

Tabelle XXVI: rischi relativi (RR) associati ai genotipi IRF6 rs642961 nelle madri (mo) e nei figli (ch), ripartiti per triadi con affetto maschio (M) o femmina (F), calcolati: nella casistica EU e stratificati per tipologia di schisi. Per ogni genotipo è indicato l'intervallo di confidenza al 95% (tra parentesi) e la significatività (p).

Figli maschi eterozigoti con labioschisi isolata mostrano un rischio relativo aumentato di 2 volte (RR 2.17; 95% C.I. 1.37-3.44) con un livello di significatività p-value=0.001. Figli maschi eterozigoti con labiopalatoschisi hanno un rischio aumentato di 1.4 volte con un livello di significatività borderline. Per lo stesso fenotipo madri omozigoti mostrano un effetto protettivo.

#### 4.2.4 Analisi log-lineare dell'interazione Gene-Ambiente

L'analisi dell'interazione gene-ambiente (gene-environment interaction GEI) viene convenientemente eseguita applicando il modello log-lineare. L'analisi viene eseguita dicotomizzando la casistica a seconda dell'esposizione o non-esposizione al fattore di rischio ambientale oggetto di indagine.

##### 4.2.4.1 Analisi GEI con la supplementazione con folati in gravidanza

Mantenendo la stratificazione principale riguardo alla tipologia di schisi sono stati calcolati i rischi relativi dicotomizzando per quanto riguarda la supplementazione o meno in gravidanza con folati e per il fatto che la madre abbia fumato o meno in gravidanza.

L'assenza di un effetto statisticamente significativo è stato riscontrato nella casistica globale (Tabelle XXVII).

	OFC	RR			$\chi^2$	p
<b>OFC</b>	mo	FA	1,05 ( 0,72 - 1,54 )	p = 0,789	1,25	0,264
	mo	noFA	0,79 ( 0,58 - 1,09 )	p = 0,151		
	ch	FA	1,51 ( 1,20 - 1,91 )	p = 0,000	2,91	0,088
	ch	noFA	1,08 ( 0,79 - 1,48 )	p = 0,638		

	CL/P	RR			$\chi^2$	p
<b>CL/P</b>	mo	FA	1,10 ( 0,73 - 1,67 )	p = 0,647	0,29	0,589
	mo	noFA	0,94 ( 0,64 - 1,38 )	p = 0,763		
	ch	FA	1,53 ( 1,17 - 2,00 )	p = 0,002	0,55	0,457
	ch	noFA	1,28 ( 0,88 - 1,88 )	p = 0,201		

#### 4. Risultati

		CL	RR			$\chi^2$	p
<b>CL</b>	mo	FA	1,03	( 0,54 - 1,95 )	p = 0,935	0,59	0,441
	mo	noFA	0,72	( 0,38 - 1,36 )	p = 0,311		
	ch	FA	1,96	( 1,26 - 3,02 )	p = 0,003	0,00	0,973
	ch	noFA	1,93	( 0,98 - 3,78 )	p = 0,055		
<b>CLP</b>		CLP	RR			$\chi^2$	p
	mo	FA	1,15	( 0,67 - 1,97 )	p = 0,623	0,04	0,842
	mo	noFA	1,06	( 0,67 - 1,70 )	p = 0,793		
	ch	FA	1,33	( 0,95 - 1,88 )	p = 0,099	0,92	0,338
ch	noFA	1,01	( 0,63 - 1,61 )	p = 0,983			
<b>CPO</b>		CPO	RR			$\chi^2$	p
	mo	FA	0,75	( 0,26 - 2,16 )	p = 0,591	0,37	0,541
	mo	noFA	0,51	( 0,28 - 0,92 )	p = 0,026		
	ch	FA	1,54	( 0,95 - 2,48 )	p = 0,080	3,09	0,787
ch	noFA	0,78	( 0,44 - 1,40 )	p = 0,407			

Tabelle XXVII: rischi relativi (RR) associati ai genotipi IRF6 rs642961 nelle madri (mo) e nei figli (ch), ripartiti per triadi, con supplementazione in gravidanza di acido folico (FA) o senza integrazione (noFA). Calcolati: nella casistica EU e stratificati per tipologia di schisi. Per ogni genotipo è indicato l'intervallo di confidenza al 95% (tra parentesi) e la significatività (p).

Per quanto riguarda l'interazione con i folati in gravidanza, assumendo il modello dominante, si vede, come, figli che sono stati esposti alla supplementazione con folati, nei casi di labioschisi isolata, mostrino un rischio aumentato di 2 volte (chFA=1.96, 95%CI 1.19-3.75).

#### 4.2.4.2 Analisi GEI con l'esposizione in gravidanza al fumo di sigaretta

L'analisi GEI relativa all'esposizione delle madri al fumo di sigaretta durante il periodo critico di chiusura del palato (secondo-terzo trimestre di gravidanza) è stata eseguita in modo analogo a quella relativa all'integrazione con folati. L'analisi è stata eseguita seguendo il modello dominante (Tabelle XXVIII).

		OFC	RR			$\chi^2$	p
<b>OFC</b>	mo	S	1,82	( 0,96 - 3,45 )	p = 0,068	2,87	0,090
	mo	noS	1,01	( 0,81 - 1,26 )	p = 0,922		
	ch	S	1,22	( 0,86 - 1,72 )	p = 0,265	0,46	0,497
	ch	noS	1,40	( 1,12 - 1,75 )	p = 0,003		
<b>CL/P</b>		CL/P	RR			$\chi^2$	p
	mo	S	1,68	( 0,83 - 3,42 )	p = 0,148	0,93	0,334
	mo	noS	1,16	( 0,90 - 1,50 )	p = 0,259		
	ch	S	1,48	( 0,99 - 2,19 )	p = 0,053	0,01	0,942
ch	noS	1,45	( 1,12 - 1,89 )	p = 0,005			
<b>CL</b>		CL	RR			$\chi^2$	p
	mo	S	2,62	( 0,91 - 7,58 )	p = 0,075	1,63	0,201
	mo	noS	1,25	( 0,83 - 1,88 )	p = 0,296		
	ch	S	2,33	( 1,17 - 4,66 )	p = 0,016	0,20	0,656
ch	noS	1,94	( 1,27 - 2,97 )	p = 0,002			

CLP	CLP		RR		p =	$\chi^2$	p
	mo	ch	S	noS			
	mo	S	1,26	( 0,48 - 3,34 )	0,635	0,06	0,802
	mo	noS	1,11	( 0,79 - 1,55 )	0,546		
	ch	S	1,17	( 0,72 - 1,90 )	0,518	0,01	0,911
	ch	noS	1,21	( 0,87 - 1,70 )	0,259		

CPO	CPO		RR		p =	$\chi^2$	p
	mo	ch	S	noS			
	mo	S	2,20	( 0,47 - 10,34 )	0,317	1,88	0,170
	mo	noS	0,71	( 0,46 - 1,10 )	0,126		
	ch	S	0,66	( 0,31 - 1,39 )	0,271	2,60	0,106
	ch	noS	1,34	( 0,87 - 2,07 )	0,188		

Tabelle XXVIII: rischi relativi (RR) associati ai genotipi IRF6 rs642961 nelle madri (mo) e nei figli (ch), ripartiti per triadi con fumo di sigaretta in gravidanza (S) o senza integrazione (noS), calcolati: nella casistica EU e stratificati per tipologia di schisi. Per ogni genotipo è indicato l'intervallo di confidenza al 95% (tra parentesi) e la significatività (p).

Per quanto riguarda l'esposizione al fumo in gravidanza, assumendo il modello dominante, si osserva, nei probandi affetti da labioschisi isolata, sia esposti sia non esposti al fumo di sigaretta, una tendenza all'aumento del rischio relativo, con un valore di significatività border-line. Il RR è aumentato di circa 2 volte (chS=2.33, 95%CI 1.17-4.66) negli esposti a fumo di sigaretta, di 2 volte circa (chnoS=1.94, 95%CI 1.27-2.97) nei non-esposti.

### 4.3 Analisi Genome-wide di Loci associati a Labio/Palatoschisi

In questo studio per la prima volta è stata condotta un'analisi per trovare i maggiori loci di associazione all'interno dell'intero genoma, GWAS, con le schisi orofacciali non sindromiche. A tal fine sono stati genotipizzati, con tecnologia Illumina BeadChip HumanHap550, 224 casi affetti da NSCL/P e 383 controlli, tutti provenienti da regioni dell'Europa Centrale.

Il chip utilizzato contiene 561.466 SNPs di cui 521.176 hanno superato i controlli qualità e sono quindi effettivamente stati genotipizzati per un totale di 607 campioni. Per poter valutare questo enorme numero di dati e poterne trarre dei risultati, a seguito di detta analisi, viene generato dall'apposito software di dialogo con lo strumento illumina BeadReader, un plot di output, definito Manhattan Plot (Figura 4.1.1).

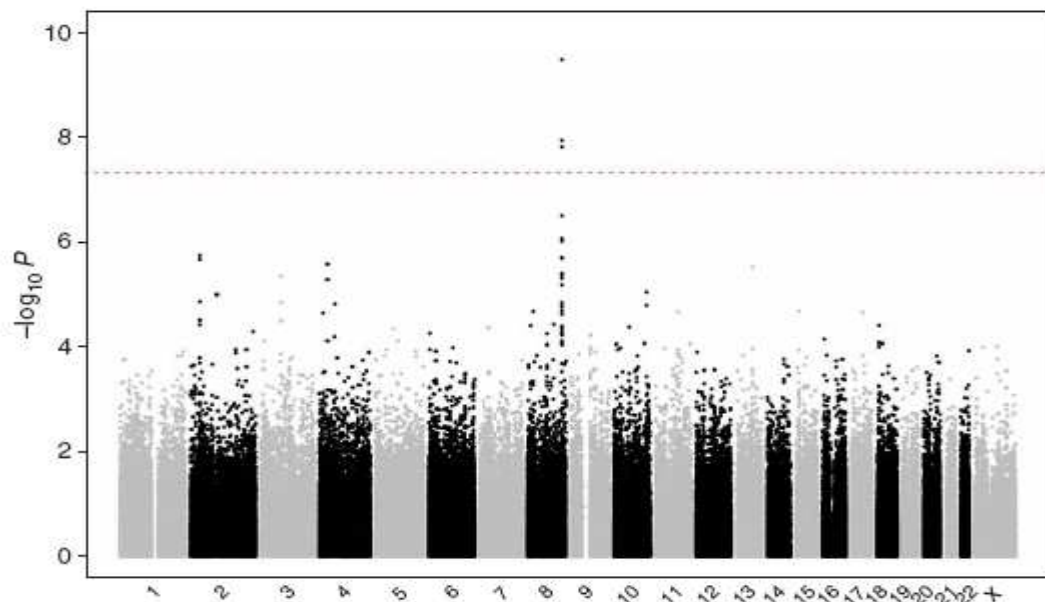


Figura 4.3.1: Manhattan Plot, in cui l'area di ciascun cromosoma è posizionata, in ascissa, a partire dall'estremità del braccio corto, p, fino all'estremità opposta del braccio lungo, q. In figura sono mostrati in sequenza i cromosomi umani e per ciascuno i puntini indicano regioni di possibile associazione, a seconda dell'altezza del picco di punti il valore di significatività di associazione aumenta. La soglia di significatività è indicata dalla linea rossa tratteggiata, solo una regione all'interno del cromosoma 8 risulta fortemente associata (Birbaum et al., 2009).

Dall'analisi è stata identificata una regione di circa 640 kb al locus cromosomico 8q24.21, nella quale sono contenuti numerosi markers con evidenze di associazione ai fenotipi di schisi.

Tra tutti gli SNPs presenti nella regione di associazione di 640 kb, quello con il maggior livello di significatività, p-value, è rs987525 con un p di  $3.41 \cdot 10^{-10}$  (Tabella XXIX).

SNP	Position [bp]; NCBI build 36	Alleles	MAF <sup>a</sup> cases	MAF <sup>a</sup> controls	P value
rs987525	130015336	A/C	0.395 (A)	0.224 (A)	3.41 x 10 <sup>-10</sup>
rs997310	129989462	A/C	0.426 (A)	0.269 (A)	1.19 x 10 <sup>-8</sup>
rs882083	130051938	C/T	0.413 (C)	0.423 (T)	1.60 x 10 <sup>-8</sup>
rs7017252	130020026	C/T	0.455 (C)	0.396 (T)	3.22 x 10 <sup>-7</sup>
rs12546523	130055292	A/G	0.366 (G)	0.491 (A)	8.73 x 10 <sup>-7</sup>
rs12547241	130021691	A/G	0.388 (G)	0.469 (A)	9.94 x 10 <sup>-7</sup>
rs11989880	129942164	C/T	0.496 (T)	0.356 (T)	1.99 x 10 <sup>-6</sup>
rs12548036	130017064	G/T	0.498 (G)	0.363 (T)	2.08 x 10 <sup>-6</sup>
rs11787407	130054622	A/G	0.364 (A)	0.497 (A)	4.10 x 10 <sup>-6</sup>
rs1157136	129971092	C/T	0.408 (T)	0.454 (C)	4.18 x 10 <sup>-6</sup>
rs7015145	129778467	A/G	0.491 (G)	0.375 (A)	4.86 x 10 <sup>-6</sup>
rs1530300	129988640	C/T	0.471 (C)	0.335 (C)	4.95 x 10 <sup>-6</sup>
rs1470206	130046646	C/T	0.359 (T)	0.49 (T)	6.67 x 10 <sup>-6</sup>
rs9297775	129805894	A/C	0.489 (A)	0.36 (A)	1.44 x 10 <sup>-5</sup>
rs6996786	129817168	G/T	0.489 (T)	0.36 (T)	1.44 x 10 <sup>-5</sup>
rs1030608	129808934	A/G	0.433 (G)	0.437 (A)	1.69 x 10 <sup>-5</sup>
rs1030609	129809059	A/C	0.433 (C)	0.436 (A)	1.70 x 10 <sup>-5</sup>
rs1519841	129988982	A/G	0.484 (A)	0.39 (G)	1.72 x 10 <sup>-5</sup>
rs12542837	129995843	C/T	0.487 (T)	0.389 (C)	2.06 x 10 <sup>-5</sup>
rs1519847	129984942	A/G	0.489 (G)	0.388 (A)	2.42 x 10 <sup>-5</sup>

Tabella XXIX: Parte iniziale dell'elenco degli SNPs con evidenze di associazione nella regione di 640 kb identificata (Birbaum et al., 2009).

### 4.3.1 Caratterizzazione del locus cromosomico 8q24.21

All'interno della regione di associazione identificata dall'analisi genome wide, sono presenti molti SNPs con elevati livelli di associazione al fenotipo clinico. Per meglio caratterizzare detta regione, sono stati selezionati al suo interno, ben 146 SNPs, grazie ad un apposito algoritmo del software Haploview; in questo modo la regione è stata completamente saturata.

Inoltre per garantire una caratterizzazione ancora più accurata e dal potere statistico maggiore, la casistica in analisi è stata ampliata, da 224 casi a 462 e da 383 controlli a 954. Le genotipizzazioni sono state condotte con tecnologia Illumina BeadChip Infinium II, dove il chip è stato disegnato ad hoc per gli SNPs desiderati. Dei 146 SNPs, 125 hanno superato i controlli qualità.

Nella figura 4.3.1.1 è possibile analizzare nel dettaglio la regione, da 129.700.000 a 130.340.000 bp, al locus cromosomico 8q24.21 saturata con i 125 SNPs selezionati. Grazie ad haploview software si è misurato il linkage disequilibrium tra tutti gli SNPs selezionati, in cui è ovviamente compreso quello che aveva mostrato il maggior livello di significatività di associazione dall'analisi genome wide, rs987525 (Figura 4.3.1.2).

#### 4. Risultati

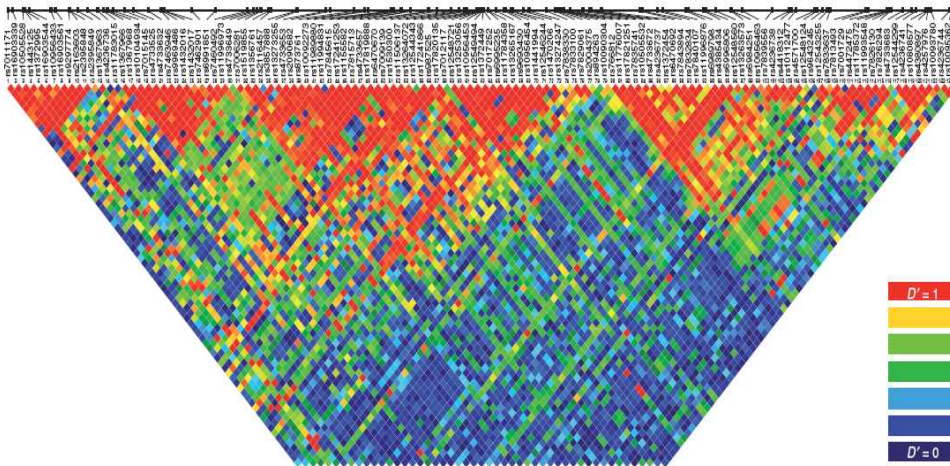


Figura 4.3.1.1: LD plot per la regio di circa 640 kb di associazione (Birbaum et al., 2009).

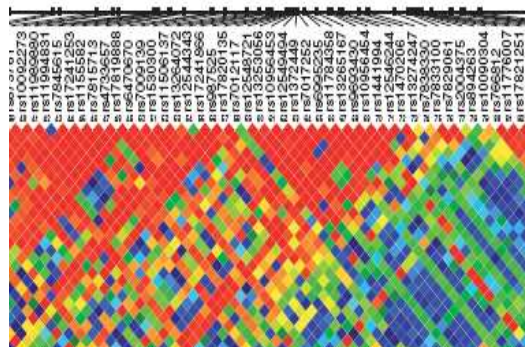


Figura 4.3.1.2: Zoom nel LD plot. Indicato con la freccia lo SNP rs987525 (Birbaum et al., 2009).

Con un codice colore, per ciascun incrocio possibile tra gli SNPs presenti nel plot, viene misurato il livello di linkage, con il colore blu viene indicata l'assenza di linkage e il relativo indice  $D'$  in questo caso è pari a 0, con il colore rosso invece si indica un completo linkage tra i due SNPs interessati con valore massimo del relativo indice  $D'$  che è pari a 1. La gradazione di colori tra i due valori, massimo e minimo, indicano valori intermedi di linkage.

Da questa genotipizzazione, di nuovo il miglior locus di associazione è risultato essere rs987525, nella tabella XXX sono stati riportati gli SNPs con maggiore significatività di associazione.

SNP	Position (bp) <sup>a</sup>	Alleles	MAF, cases	MAF, controls	P value
rs987525	130015336	A/C	0.381 (A)	0.202 (A)	$3.34 \times 10^{-24}$
rs17241253	129959370	C/T	0.339 (C)	0.171 (C)	$1.11 \times 10^{-23}$
rs1530300	129988640	C/T	0.478 (C)	0.301 (C)	$2.79 \times 10^{-20}$
rs1372449	130019572	A/G	0.448 (G)	0.389 (A)	$1.13 \times 10^{-16}$
rs7017252	130020026	C/T	0.449 (C)	0.393 (T)	$1.09 \times 10^{-15}$
rs3857888	129894043	C/G	0.397 (G)	0.447 (C)	$7.77 \times 10^{-15}$
rs13274247	130050650	A/G	0.414 (G)	0.433 (A)	$8.87 \times 10^{-15}$
rs11989880	129942164	C/T	0.488 (T)	0.343 (T)	$4.28 \times 10^{-14}$
rs17820135	130016968	G/T	0.182 (G)	0.087 (G)	$6.03 \times 10^{-14}$
rs17821251	130078415	C/T	0.177 (C)	0.081 (C)	$1.15 \times 10^{-13}$

Tabella XXX: SNPs di maggior associazione con NSCL/P in ordine decrescente di significatività (Birnbau et al., 2009).

In conclusione anche da questa analisi lo SNPs di maggiore associazione per il fenotipo di NSCL/P è rs987525 A>C; in particolare, è l'allele ancestrale A, che è conservato attraverso le specie, ad essere associato al fenotipo clinico.

L'allele di rischio A, ancestrale, ha una frequenza più alta rispetto all'allele derivato C solo nella popolazione Africana. Nell'uomo infatti, l'allele ancestrale A non è conservato e il derivato C ha una frequenza maggiore nella popolazione globale.

Nella Figura 4.2.3 sono riportati diagrammi a torta, in corrispondenza di varie zone geografiche, delle frequenze dell'allele di rischio A, per lo SNP rs987525 in rosso, e dell'allele derivato C in grigio.



Figura 4.3.1.3: Distribuzione delle frequenze alleliche per lo SNPs rs987525 nella popolazione globale.

I dati riguardo la distribuzione delle frequenze alleliche per lo SNPs rs987525 sono state tratte dal pannello HGDP-CEPH.



## 4.4 Studio di Replicazione

Successivamente, per replicare il risultato ottenuto dalla prima analisi, è stato condotto un secondo studio di genome wide, per avere quindi conferma che realmente il locus di maggior associazione fosse quello precedentemente identificato e focalizzare meglio l'attenzione su quelli che erano i loci di associazione con valore di significatività inferiore, allargando la casistica, in modo da aumentare il loro potere statistico di significatività.

La casistica inclusa in questa seconda analisi genome wide comprende 401 casi affetti da NSCL/P e 1323 controlli, tutti di provenienza centro europea. La raccolta di questi campioni nuovamente è stata condotta nell'ambito del progetto GRF.

Le genotipizzazioni sono state ottenute con la medesima tecnologia Illumina utilizzata per la prima, BeadChip HumanHap 550. Dei 561.466 SNPs contenuti nel chip, 521.288 hanno superato i controlli qualità, 112 SNPs in più quindi rispetto alla prima analisi, probabilmente dovuto all'allargamento della casistica. Della casistica totale le genotipizzazioni hanno superato i controlli qualità per 399 casi e 1318 controlli.

Il nuovo Manhattan Plot fornisce un quadro completo dei risultati ottenuti per l'associazione di qualsiasi possibile locus nell'intero genoma con il fenotipo clinico, in cui il livello di significatività è indicato dalla linea rossa tratteggiata.

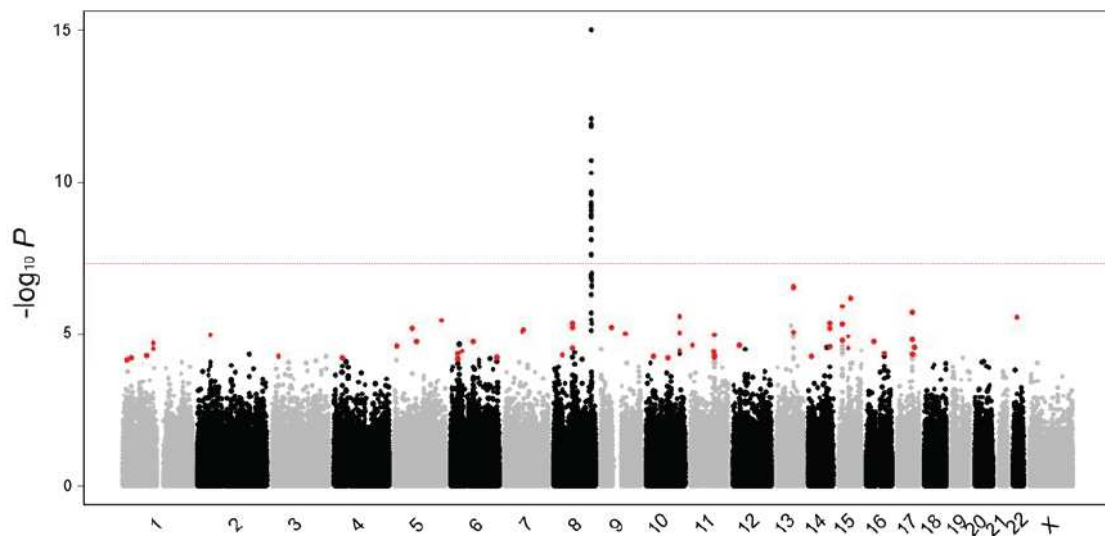


Figura 4.2.1: Manhattan Plot. Nel grafico sono riportati in ascissa i cromosomi umani, all'interno dei quali i puntini indicano regioni di possibile associazione, l'altezza del picco di punti è direttamente proporzionale al valore di significatività di associazione. La soglia di significatività è indicata dalla linea rossa tratteggiata (Manqold et al., 2010).

Risulta molto evidente come il locus di maggior associazione con il fenotipo clinico sia nuovamente 8q24.21. Questo risultato è estremamente importante poiché conferma in modo indiscutibile quanto già precedentemente dimostrato, inoltre il potere statistico dell'associazione risulta rafforzato dall'allargamento della casistica studiata. Inoltre uno studio indipendente ha recentemente ottenuto il medesimo risultato (Grant et al., 2009).

I punti rossi, visibili in Figura 4.2.1, indicano loci scelti per lo studio di replicazione in quanto presentavano SNPs ad alta associazione, ma la loro significatività non supera il livello soglia.

Nel caso in cui la significatività di un singolo locus è molto elevata il potere statistico dell'associazione di altri loci inevitabilmente diminuisce; potendo quindi ipoteticamente eliminare la presenza di questo locus otterremmo risultati più significativi per altri. Alla luce di ciò è sorta l'idea di analizzare separatamente questi loci di associazione "minore", identificati in figura con i punti rossi.

Escluso quindi 8q24.21, gli SNPs che hanno una significatività p-value <  $10^{-5}$  sono 20, presenti nella tabella XXXI.

SNP	Chromosome	Position [bp]; NCBI build 36	Alleles	Genotypes cases	MAF cases	Genotypes controls	MAF controls	P value
rs8001641	13	79590812	A/G	138/198/63	0.406 (G)	327/630/357	0.489 (A)	$2.83 \times 10^{-7}$
rs1215465	13	79589353	A/G	37/168/194	0.303 (A)	230/608/478	0.406 (A)	$3.12 \times 10^{-7}$
rs1873147	15	61099685	C/T	40/178/181	0.323 (C)	73/475/769	0.236 (C)	$7.04 \times 10^{-7}$
rs1258763	15	30837715	A/G	219/163/17	0.247 (G)	578/590/149	0.337 (G)	$1.30 \times 10^{-6}$
rs17760296	17	51970616	G/T	20/146/233	0.233 (G)	30/362/924	0.160 (G)	$2.02 \times 10^{-6}$
rs4752028	10	118824981	C/T	28/133/238	0.237 (C)	37/354/925	0.163 (C)	$2.67 \times 10^{-6}$
rs6005657	22	26565087	C/T	260/129/10	0.187 (T)	1019/277/22	0.122 (T)	$2.89 \times 10^{-6}$
rs6860533	5	169411938	C/T	0/35/364	0.044 (C)	0/43/1275	0.016 (C)	$3.65 \times 10^{-6}$
rs9298070	8	64033212	G/T	54/175/170	0.355 (G)	274/630/411	0.448 (G)	$4.72 \times 10^{-6}$
rs1768112	14	94431442	C/T	48/193/158	0.362 (C)	284/629/403	0.455 (C)	$4.85 \times 10^{-6}$
rs2840190	15	30847699	A/G	21/150/228	0.241 (A)	47/348/923	0.168 (A)	$4.91 \times 10^{-6}$
rs1550546	13	69556405	A/G	94/209/96	0.497 (A)	435/639/210	0.412 (G)	$5.47 \times 10^{-6}$
rs3780136	9	36835973	A/C	21/117/261	0.199 (A)	32/279/988	0.132 (A)	$6.33 \times 10^{-6}$
rs4237066	8	64010852	A/G	174/179/46	0.340 (G)	434/634/250	0.430 (G)	$6.36 \times 10^{-6}$
rs10063997	5	65952941	C/T	31/150/218	0.266 (C)	51/401/866	0.191 (C)	$6.72 \times 10^{-6}$
rs1341001	14	94432449	A/G	38/184/177	0.326 (A)	243/610/464	0.416 (A)	$6.83 \times 10^{-6}$
rs757839	7	70213204	G/T	367/32/0	0.040 (T)	1094/214/9	0.088 (T)	$7.56 \times 10^{-6}$
rs9574565	13	79566875	C/T	266/118/15	0.185 (T)	714/516/88	0.263 (T)	$9.22 \times 10^{-6}$
rs7078160	10	118817550	A/G	28/130/241	0.233 (A)	37/356/925	0.163 (A)	$9.50 \times 10^{-6}$
rs3860938	9	85297847	A/C	9/103/287	0.152 (A)	11/231/1075	0.096 (A)	$9.92 \times 10^{-6}$

Tabella XXXI: elenco dei 20 SNPs con un p-value <  $10^{-5}$  (Mangold et al., 2010).

Questi 20 SNPs sono quindi stati selezionati per un'indagine di replicazione. In aggiunta sono stati scelti altri SNPs con un p-value <  $10^{-4}$  ed altri SNPs che dalla letteratura si ritengono di interesse per l'eziologia delle NSCL/P.

#### 4. Risultati

##### 4.4.1 Associazione tra Loci GWAS e Labio/Palatoschisi

Selezionati i 20 SNPs, uno fra questi, rs1550546, non è stato possibile studiarlo perché impossibile inserirlo nel disegno dell'assay. Come precedentemente anticipato, in aggiunta a questi SNPs, ne sono stati selezionati altri, per un totale di 64, combinando i risultati dell'analisi genome wide con un p-value al minimo inferiore a  $10^{-4}$  e le conoscenze che ci provengono dalla letteratura, che ci fornisce evidenze di associazione tra vari SNPs e il fenotipo clinico studiato, come nel caso dello SNP rs642961 in un enhancer del gene IRF6 (Rahimov et al., 2008).

La casistica inclusa in questa replicazione comprende 793 triadi provenienti dal progetto EUROCRAN. In questo modo si vogliono replicare le associazioni con nuovi loci predetti dall'analisi genome wide, ed altri potenziali, su di una casistica del tutto indipendente da quella di partenza.

La tecnologia scelta per eseguire dette genotipizzazioni è MALDI-TOFF mass spectrometry, sequenom Inc., con l'allestimento di SpectroChip x384 sample.

Nella tabella XXXII vi è l'elenco dei 64 SNPs per cui sono stati disegnati due diversi assay di genotipizzazione, in quanto il limite funzionale di analisi contemporanea di polimorfismi per detta tecnologia è 35. Il primo assay conteneva 34 SNPs e il secondo 30.

Rang	SNP-ID	Chr	Position	Rang	SNP-ID	Chr	Position	Rang	SNP-ID	Chr	Position
1	rs8001641	13	79590812	23	rs3860938	9	85297847	45	rs10840002	11	8199602
2	rs1215465	13	79589353	24	rs227731	17	52128237	46	rs31837	5	11450573
3	rs1873147	15	51393685	25	rs3743106	15	38851101	47	rs1956455	14	93711620
4	rs1258763	15	30337715	26	rs1350059	8	64011110	48	rs1808191	17	60214490
5	rs17760296	17	51970616	27	rs1898395	10	118818359	49	rs11852746	15	53771557
6	rs4752028	10	118814981	28	rs227730	17	52128950	50	rs4481881	1	107487941
7	rs6005657	22	26566087	29	rs1939110	11	86192720	51	rs1365425	11	83811667
8	rs6860533	5	169411938	30	rs2013063	6	26102077	52	rs716952	6	39457343
9	rs1508890	5	54315764	31	rs12799567	11	86182004	53	rs1394551	16	61092744
10	rs9298070	8	54033212	32	rs12805405	11	86186576	54	rs7012010	8	27504646
11	rs1768112	14	94431442	33	rs2794719	6	26196869	55	rs12744552	1	84989273
12	rs2840190	15	30347689	34	rs9295684	6	26177648	56	rs259498	3	21911586
13	rs8003220	14	105143361	35	rs987525	8	130015386	57	rs10508707	10	26184471
14	rs3780136	9	36935973	36	rs11989880	8	129942164	58	rs2518659	14	30341238
15	rs4237066	8	54310252	37	rs642961	1	208055893	59	rs7740603	6	165558886
16	rs10063997	5	55952941	38	rs7590268	2	43393629	60	rs10740466	10	78846284
17	rs1341001	14	94432449	39	rs1011061	15	53774790	61	rs2197100	6	165551781
18	rs757839	7	70213204	40	rs9343824	6	79554288	62	rs7678773	4	90653335
19	rs6951350	7	58399279	41	rs17797149	16	29043276	63	rs16834735	1	32049029
20	rs11623115	14	103539445	42	rs4703516	5	89690722	64	rs7538442	1	12538865
21	rs9574565	13	79366875	43	rs4307594	1	107494690				
22	rs7078160	10	118817550	44	rs4559766	12	23605289				

Tabella XXXII: elenco dei 64 SNPs selezionati per l'analisi di replicazione.

Dei 64 SNPs genotipizzati 47 hanno dato un indice di call rate adatto ai controlli qualità. Di tutti i 47 SNPs tipizzati con successo, 11 SNPs, che identificano sei diversi loci genici, presentavano un  $P < 0.05$ , di questi solamente due sono rimasti statisticamente significativi dopo correzione statistica con test di Bonferroni: rs227731 al locus genico 17q22 e rs7078160 al locus genico 10q25.3. Tutti gli 11 SNPs risultati significativi dalla replicazione in Sequenom erano già stati predetti dall'analisi genome-wide. Combinando per questi 11 i valori di significatività dell'una e dell'altra analisi cinque

sono risultati i loci di migliore associazione con il fenotipo clinico studiato, tra i quali due sono gli SNPs sopra citati, risultati i migliori associati dall'analisi di replicazione.

Nella tabella XXXIII sono riportati i cinque SNPs, che identificano cinque diversi loci di associazione.

SNP Position in build 36	Chr.	Alleles <sup>a</sup>	Sample	MAF <sup>b</sup> cases/ MAF controls	T/NT <sup>c</sup>	P value <sup>d</sup>
rs227731	17	A/C	GWAS	0.496 (A)/0.416 (C)	349/258	1.58 × 10 <sup>-5</sup>
52128237			Replication			2.21 × 10 <sup>-4</sup>
			Combined			1.07 × 10 <sup>-8</sup>
rs7078160	10	A/G	GWAS	0.233 (A)/0.163 (A)	243/176	9.50 × 10 <sup>-6</sup>
118817550			Replication			1.06 × 10 <sup>-3</sup>
			Combined			1.92 × 10 <sup>-8</sup>
rs7590268	2	G/T	GWAS	0.297 (G)/0.221 (G)	235/179	1.11 × 10 <sup>-5</sup>
43393629			Replication			5.92 × 10 <sup>-3</sup>
			Combined			8.62 × 10 <sup>-8</sup>
rs9574565	13	C/T	GWAS	0.185 (T)/0.263 (T)	227/177	9.22 × 10 <sup>-6</sup>
79566875			Replication			1.29 × 10 <sup>-2</sup>
			Combined			3.44 × 10 <sup>-7</sup>
rs1258763	15	A/G	GWAS	0.247 (G)/0.337 (G)	269/223	1.30 × 10 <sup>-6</sup>
30837715			Replication			3.81 × 10 <sup>-2</sup>
			Combined			1.14 × 10 <sup>-6</sup>

Tabella XXXIII: elenco dei 5 SNPs maggiormente associati (Mangold et al., 2010).

Per ciascuno dei cinque SNPs con associazione positiva sono stati esplorati i loci genici:

- Lo SNP rs227731, al locus genico 17q22, si trova 100 kb a monte del gene *NOG*, che traduce per una proteina antagonista dei fattori facenti parte della superfamiglia *TGFβ*, tra cui si trova anche la proteina *BMP4* (*bone morphogenetic protein 4*). Dalla letteratura questa proteina era già conosciuta per essere coinvolta nella regolazione dello sviluppo del palato ed è stata riportata essere associata allo sviluppo di schisi orofacciali nell'uomo (He et al., 2010).
- Lo SNPs rs7078160, al locus genico 10q25.3, si trova 53 kb downstream al gene *VAX1* (*ventral anterior homeobox 1 isoform a*). Nel modello murino si è evidenziato come esso sia associato a malformazioni dell'area cranio facciale tra cui schisi orofacciali (Hallonet et al., 1999).
- Lo SNPs rs7590268, al locus genico 2p21, si trova nell'introne 31 del gene *THADA*, *thyroid adenoma associated*, questo gene è direttamente coinvolto nel pathway apoptotico e nella trasduzione del segnale di morte cellulare (Drieschner et al., 2007).
- Lo SNPs rs9574565, al locus genico 13q31.1, si trova 241 kb downstream al gene *SPRY2* (*sprouty homolog 2*) nel modello murino lo sviluppo del palato e delle aree orofacciali risultano dose dipendente e malformazioni a livello di dette aree risultano da un'overespressione di questo gene (Welsh et al., 2007 e Goodnough et al., 2007).
- Lo SNPs rs1258763, al locus genico 15q14, si trova 23 kb downstream al gene *GREM1* (*gremlin-1*) un altro gene che ha un ruolo come antagonista di proteine come *BMP4*, che come già detto, è coinvolta nella regolazione della palatogenesi ed è coinvolta nell'eziologia delle schisi nell'uomo (He et al., 2010).

#### 4. Risultati

Per questi cinque SNPs di associazione, per rs987525 (8q24.21), e per rs642961 (IRF6), che sono i loci genici con le principali evidenze di associazione per le labioschisi con o senza schisi del palato, sono state condotte diverse analisi statistiche, per attribuire un valore ed una direzione alla loro associazione al difetto congenito e per esplorare eventuali interazioni geniche ed ambientali.

##### 4.4.1.1 Transmission Disequilibrium Test

I valori di trasmissione e non trasmissione per tutti i polimorfismi studiati sono riferiti all'allele che si ritiene di rischio e cioè l'allele risultato in associazione alle schisi. Nelle tabelle seguenti, sono riportati i valori di TDT, calcolati sulla casistica globale del campionamento EUROCRAN, per ciascuno dei sette SNPs di maggiore associazione.

Nelle tabelle XXXIV i TDT sono stati calcolati seguendo una stratificazione secondo il tipo di schisi da cui è affetto il probando della triade.

rs227731 A>C – NOG – 17q22						rs7078160 G>A – VAX – 10q25.3				
	OFC	CL/P	CL	CLP	CPO	OFC	CL/P	CL	CLP	CPO
	795	574	200	374	221	774	558	196	362	216
T	424	310	122	188	114	236	176	68	108	60
NT	339	235	84	151	104	262	190	77	113	72
TDT	9.47	10.32	7.01	4.04	0.46	1.36	0.54	0.56	0.11	1.09
p c2	0.002	0.001	0.008	0.044	0.498	0.244	0.464	0.455	0.737	0.296

rs7590268 A>C – THADA – 2p21						rs9574565 T>C – SPRY2 – 13q31.1				
	OFC	CL/P	CL	CLP	CPO	OFC	CL/P	CL	CLP	CPO
	542	401	139	262	141	761	545	193	352	216
T	196	151	55	96	45	293	214	70	144	79
NT	218	157	53	104	61	212	141	60	81	71
TDT	1.17	0.12	0.04	0.32	2.42	12.99	15.01	0.77	17.64	0.43
p c2	0.280	0.732	0.847	0.572	0.120	0.000	0.000	0.380	0.000	0.514

rs1258763 G>A – GREM1 – 15q14						rs987525 C>A – 8q24.21				
	OFC	CL/P	CL	CLP	CPO	OFC	CL/P	CL	CLP	CPO
	554	418	151	267	136	920	667	239	428	253
T	287	223	78	145	64	434	340	117	223	94
NT	188	141	52	89	47	306	222	76	146	84
TDT	20.63	18.47	5.20	13.40	2.60	22.14	24.78	8.71	16.07	0.56
p c2	0.000	0.000	0.023	0.000	0.107	0.000	0.000	0.003	0.000	0.454

rs642961 G>A – IRF6 – 1p32					
	OFC	CL/P	CL	CLP	CPO
	936	669	246	423	267
T	308	214	77	137	94
NT	348	260	125	135	88
TDT	2.44	4.46	11.41	0.01	0.20
p c2	0.118	0.035	0.001	0.903	0.657

Tabella XXXIV: TDT calcolati con stratificazione della casistica secondo il tipo di schisi da cui è affetto il probando della triade, rispettivamente per gli SNPs rs227731, rs7078160, rs7590268, rs9574565, rs1258763, rs987525 e rs642961.

Per ogni stratificazione eseguita secondo il fenotipo di schisi per ogni SNPs studiato sono state calcolate il numero delle volte che l'allele di rischio associato con il fenotipo di schisi è stato trasmesso e non trasmesso. Per verificare se l'eventuale sbilanciamento verso la trasmissione o la non trasmissione dell'allele sia casuale o significativa è stato calcolato il test TDT che approssima ad un test  $\chi^2$  e il relativo livello di significatività del test stesso, *p-value*.

Si può osservare dalla tabella come ci sia trasmissione asimmetrica dell'allele C per il polimorfismo rs227731, in associazione ai fenotipi di labioschisi con o senza schisi del palato. Per il polimorfismo rs9574565 si può osservare una trasmissione asimmetrica dell'allele C in associazione al fenotipo di labioschisi con schisi del palato; lo stesso vale per l'allele A del polimorfismo rs1258763. Mentre per il polimorfismo rs987525 si osserva una forte trasmissione asimmetrica dell'allele A in associazione alle labioschisi con o senza palatoschisi, ed infine per il polimorfismo rs642961 si osserva uno sbilanciamento verso la trasmissione dell'allele A, anche se con valori inferiori rispetto ai precedenti. Ciò che accomuna queste osservazione è il fatto che tutte trasmissioni asimmetriche degli alleli di rischio per i polimorfismi di associazione alle schisi studiati si concentrano nei fenotipi di labio/palatoschisi e mai per il fenotipo di palatoschisi isolata. Questo trova giustificazione nel fatto che i due gruppi di schisi siano da considerarsi patologie ad eziologia distinta. I polimorfismi dei geni che si trovano associati ad uno dei gruppi possono quindi ragionevolmente non esserlo per l'altro.

Nelle tabelle XXXV i TDT sono stati calcolati mantenendo la stratificazione secondo il tipo di schisi da cui è affetto il probando della triade ed aggiungendo una stratificazione secondo il genere del probando per verificare se ci fosse una trasmissione asimmetrica preferenzialmente in un sesso o in un altro.

#### 4. Risultati

rs227731 A>C – NOG – 17q22										
OFC		CL/P		CL		CLP		CPO		
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
325	470	201	373	72	128	129	245	124	97	
T	163	261	100	210	41	81	59	129	63	51
NT	146	193	83	152	28	56	55	96	63	41
TDT	0.94	10.19	1.58	9.29	2.45	4.56	0.14	4.84	0.00	1.09
p c2	0.333	0.001	0.209	0.002	0.118	0.033	0.708	0.028	1.000	0.297

rs7078160 G>A – VAX – 10q25.3										
OFC		CL/P		CL		CLP		CPO		
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
317	457	194	364	72	124	122	240	123	93	
T	101	135	63	113	24	44	39	69	38	22
NT	100	162	65	125	25	52	40	73	35	37
TDT	0.00	2.45	0.03	0.61	0.02	0.67	0.01	0.11	0.12	3.81
p c2	0.944	0.117	0.860	0.437	0.886	0.414	0.910	0.737	0.725	0.051

rs7590268 A>C – THADA – 2p21										
OFC		CL/P		CL		CLP		CPO		
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
218	324	134	267	66	127	86	176	84	57	
T	73	123	42	109	23	47	26	70	31	14
NT	100	118	59	98	18	42	38	66	41	20
TDT	4.21	0.10	2.86	0.58	0.61	0.28	2.25	0.12	1.39	1.06
p c2	0.040	0.747	0.091	0.445	0.435	0.596	0.134	0.732	0.239	0.303

rs9574565 T>C – SPRY2 – 13q31.1										
OFC		CL/P		CL		CLP		CPO		
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
301	460	176	369	66	127	110	242	125	91	
T	117	176	68	146	23	47	45	99	49	30
NT	75	137	40	101	18	42	22	59	35	36
TDT	9.19	4.86	7.26	8.20	0.61	0.28	7.90	10.13	2.33	0.55
p c2	0.002	0.027	0.007	0.004	0.435	0.596	0.005	0.001	0.127	0.460

rs1258763 G>A – GREM1 – 15q14										
OFC		CL/P		CL		CLP		CPO		
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
229	325	145	273	52	99	93	174	84	52	
T	117	170	79	144	27	51	52	93	38	26
NT	90	98	60	81	18	34	42	47	30	17
TDT	3.52	19.34	2.60	17.64	1.80	3.40	1.06	15.11	0.94	1.88
p c2	0.061	0.000	0.107	0.000	0.180	0.065	0.302	0.000	0.332	0.170

	rs987525 C>A – 8q24.21									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
	371	549	224	443	83	156	141	287	147	106
T	154	280	110	230	40	77	70	153	44	50
NT	122	184	74	148	27	49	47	99	48	36
TDT	3.71	19.86	7.04	17.79	2.52	6.22	4.52	11.57	0.17	2.28
p c2	0.054	0.000	0.008	0.000	0.112	0.013	0.033	0.001	0.677	0.131

	rs642961 G>A – IRF6 – 1p32									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
	390	546	236	433	92	154	144	279	154	113
T	126	182	75	139	29	48	46	91	51	43
NT	147	201	89	171	43	82	46	89	58	30
TDT	1.62	0.94	1.20	3.30	2.72	8.89	0.00	0.02	0.45	2.32
p c2	0.204	0.332	0.274	0.069	0.099	0.003	1.000	0.881	0.503	0.128

Tabella XXXV: TDT calcolati con stratificazione della casistica secondo il tipo di schisi da cui è affetto il probando della triade e secondo il genere del probando stesso, rispettivamente per gli SNPs rs227731, rs7078160, rs7590268, rs9574565, rs1258763, rs987525 e rs642961.

Si può osservare come da questa successiva stratificazione, rimangono le evidenze di trasmissione asimmetrica per i fenotipi di schisi che già precedentemente avevano mostrato la stessa asimmetria. Per ciascun fenotipo poi è possibile osservare come per i polimorfismi dei geni NOG e GREM1 lo sbilanciamento verso la trasmissione dell'allele di rischio in particolare per il fenotipo di labioschisi con palatoschisi si concentra nei probandi di genere femminile. Per i polimorfismi di SPRY2 e del locus 8q24.21 l'asimmetria è presente in entrambi i generi dei probandi, suggerendo che probabilmente questo sbilanciamento è indipendente dal sesso. Per i polimorfismi per cui non si erano evidenziate asimmetrie di trasmissione in precedenza, non se ne sono rilevate poi stratificando ulteriormente la casistica.

Nelle tabelle XXXVI i TDT sono stati calcolati mantenendo la stratificazione secondo il tipo di schisi da cui è affetto il probando della triade ed aggiungendo una stratificazione secondo l'esposizione subita durante la gestazione al fumo di sigaretta o meno.

	rs227731 A>C – NOG – 17q22									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS
	190	605	147	427	43	157	104	270	43	178
T	114	310	96	214	31	91	65	123	18	96
NT	70	269	47	188	18	66	29	122	23	81
TDT	10.52	2.90	16.79	1.68	3.45	3.98	13.79	0.00	0.61	1.27
p c2	0.001	0.088	0.000	0.195	0.063	0.046	0.000	0.949	0.435	0.260



#### 4. Risultati

rs7078160 G>A – VAX – 10q25.3										
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS
	199	575	154	404	48	148	106	256	45	171
T	63	173	50	126	15	53	35	73	13	47
NT	63	199	55	135	21	56	34	79	8	64
TDT	0.00	1.82	0.24	0.31	1.00	0.08	0.01	0.24	1.19	2.60
p c2	1.000	0.178	0.626	0.577	0.317	0.774	0.904	0.626	0.275	0.107

rs7590268 A>C – THADA – 2p21										
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS
	131	411	104	297	42	151	73	189	27	114
T	52	144	43	108	18	52	28	68	9	36
NT	52	166	40	117	13	47	27	77	12	49
TDT	0.00	1.56	0.11	0.36	0.81	0.25	0.02	0.56	0.43	1.99
p c2	1.000	0.211	0.742	0.549	0.369	0.615	0.893	0.455	0.513	0.159

rs9574565 T>C – SPRY2 – 13q31.1										
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS
	180	581	132	413	42	151	90	262	48	168
T	77	216	56	158	18	52	38	106	21	58
NT	55	157	37	104	13	47	24	57	18	53
TDT	3.67	9.33	3.88	11.13	0.81	0.25	3.16	14.73	0.23	0.23
p c2	0.056	0.002	0.049	0.001	0.369	0.615	0.075	0.000	0.631	0.635

rs1258763 G>A – GREM1 – 15q14										
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS
	143	411	115	303	35	116	80	187	28	108
T	71	216	61	162	11	67	50	95	10	54
NT	49	139	40	101	13	39	27	62	9	38
TDT	4.03	16.70	4.37	14.15	0.17	7.40	6.87	6.94	0.05	2.78
p c2	0.045	0.000	0.037	0.000	0.683	0.007	0.009	0.008	0.819	0.095

rs987525 C>A – 8q24.21										
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS
	224	696	168	499	50	189	118	310	56	197
T	119	315	102	238	33	84	69	154	17	77
NT	84	222	62	160	13	63	49	97	22	62
TDT	6.03	16.11	9.76	15.29	8.70	3.00	3.39	12.94	0.64	1.62
p c2	0.014	0.000	0.002	0.000	0.003	0.083	0.066	0.000	0.423	0.203

	rs642961 G>A – IRF6 – 1p32									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS	S	noS
	234	702	177	492	54	192	123	300	57	210
T	68	240	53	161	18	59	35	102	15	79
NT	97	251	80	180	31	94	49	86	17	71
TDT	5.10	0.25	5.48	1.06	3.45	8.01	2.33	1.36	0.13	0.43
p c2	0.024	0.620	0.019	0.304	0.063	0.005	0.127	0.243	0.724	0.514

Tabella XXXVI: TDT calcolati con stratificazione della casistica secondo il tipo di schisi da cui è affetto il probando della triade e secondo l'esposizione al fumo di sigaretta durante la gestazione, del probando stesso, rispettivamente per gli SNPs rs227731, rs7078160, rs7590268, rs9574565, rs1258763, rs987525 e rs642961.

Si può osservare come da questa successiva stratificazione, rimangono di nuovo evidenze di trasmissione asimmetrica per i fenotipi di schisi che già precedentemente avevano mostrato la stessa asimmetria. Per il polimorfismo del gene NOG lo sbilanciamento verso la trasmissione dell'allele di rischio in particolare per il fenotipo di labioschisi con palatoschisi si concentra nei probandi esposti al fumo di sigaretta durante la gestazione; per il polimorfismo di SPRY2 invece lo sbilanciamento verso la trasmissione dell'allele di rischio sempre per il fenotipo di labioschisi con palatoschisi si concentra nei probandi non esposti al fumo. Per i polimorfismi di GREM1, IRF6 e del locus 8q24.21, l'asimmetria è presente in entrambi le condizioni, di esposizione e non, dei probandi, suggerendo che probabilmente questo sbilanciamento è indipendente dal fumo.

Nel gruppo di tabelle XXXVII i TDT sono stati calcolati nel gruppo di tutti i probandi esposti al fumo di sigaretta durante la gestazione, mantenendo la stratificazione secondo il tipo di schisi di cui è affetto il probando della triade e il genere; successivamente sono stati calcolati i TDT (tabelle XXXVIII) nel gruppo di tutti i probandi non esposti al fumo di sigaretta con lo stesso tipo di stratificazione.

I polimorfismi dei geni THADA e VAX non hanno dato evidenze significative di una trasmissione asimmetrica dell'allele di rischio in associazione ad un qualche fenotipo di schisi o ad uno dei due fattori ambientali studiati, genere e fumo, di conseguenza per essi non sono state eseguite le stratificazioni successive.

	rs227731 A>C – NOG – 17q22									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S
	76	114	54	93	16	27	38	66	22	21
T	39	75	33	63	9	22	24	41	6	12
NT	33	37	18	29	7	11	11	18	15	8
TDT	0.50	12.89	4.41	12.57	0.25	3.67	4.83	8.97	3.86	0.80
p c2	0.480	0.000	0.036	0.000	0.617	0.056	0.028	0.003	0.050	0.371

#### 4. Risultati

rs9574565 T>C – SPRY2 – 13q31.1										
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S
	74	106	47	85	16	26	31	59	27	21
T	34	43	20	36	7	11	13	25	14	7
NT	21	34	13	24	3	10	10	14	8	10
TDT	3.07	1.05	1.48	2.40	1.60	0.05	0.39	3.10	1.64	0.53
p c2	0.080	0.305	0.223	0.121	0.206	0.827	0.532	0.078	0.201	0.467

rs1258763 G>A – GREM1 – 15q14										
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S
	50	93	34	81	11	24	23	57	16	12
T	21	50	15	46	1	10	14	36	6	4
NT	15	34	13	27	4	9	9	18	2	7
TDT	1.00	3.05	0.14	4.95	1.80	0.05	1.09	6.00	2.00	0.82
p c2	0.317	0.081	0.705	0.026	0.180	0.819	0.297	0.014	0.157	0.366

rs987525 C>A – 8q24.21										
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S
	93	131	58	110	17	33	41	77	35	21
T	41	78	36	66	12	21	24	45	5	12
NT	39	45	23	39	6	7	17	32	16	6
TDT	0.05	8.85	2.86	6.94	2.00	7.00	1.20	2.19	5.76	2.00
p c2	0.823	0.003	0.091	0.008	0.157	0.008	0.274	0.138	0.016	0.157

rs642961 G>A – IRF6 – 1p32										
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S	M/S	F/S
	98	136	64	113	21	33	43	80	34	23
T	28	40	20	33	8	10	12	23	8	7
NT	46	51	34	46	11	20	23	26	12	5
TDT	4.38	1.33	3.63	2.14	0.47	3.33	3.46	0.18	0.80	0.33
p c2	0.036	0.249	0.057	0.144	0.491	0.068	0.063	0.668	0.371	0.564

Tabella XXXVII: TDT calcolati con stratificazione della casistica secondo il tipo di schisi da cui è affetto il probando della triade e secondo il genere dello stesso, rispettivamente per gli SNPs rs227731, rs9574565, rs1258763, rs987525 e rs642961, nel gruppo di tutti i probandi esposti al fumo di sigaretta durante la gestazione.

Il risultato interessante che si osserva da questa stratificazione è che i polimorfismi del gene NOG e del locus 8q24.21 che avevano mostrato una trasmissione asimmetrica nei probandi esposti a

fumo di sigaretta, in realtà mostrano una trasmissione sbilanciata dell'allele di rischio a seguito di esposizione a fumo di sigaretta, quando il probando è femmina.

Di seguito invece vediamo la medesima stratificazione nel gruppo dei probandi non esposti al fumo (Tabelle XXXVIII).

	rs227731 A>C – NOG – 17q22									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS
	249	356	147	280	56	101	91	179	102	76
T	124	186	67	147	32	59	35	88	57	39
NT	113	156	65	123	21	45	44	78	48	33
TDT	0.51	2.63	0.03	2.13	2.28	1.88	1.03	0.60	0.77	0.50
p c2	0.475	0.105	0.862	0.144	0.131	0.170	0.311	0.438	0.380	0.480

	rs9574565 T>C – SPRY2 – 13q31.1									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS
	227	354	129	284	50	101	79	183	98	70
T	83	133	48	110	16	36	32	74	35	23
NT	54	103	27	77	15	32	12	45	27	26
TDT	6.14	3.81	5.88	5.82	0.03	0.24	9.09	7.07	1.03	0.18
p c2	0.013	0.051	0.015	0.016	0.857	0.628	0.003	0.008	0.310	0.668

	rs1258763 G>A – GREM1 – 15q14									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS
	179	232	111	192	41	75	70	117	68	40
T	96	120	64	98	26	41	38	57	32	22
NT	75	64	47	54	14	25	33	29	28	10
TDT	2.58	17.04	2.60	12.74	3.60	3.88	0.35	9.12	0.27	4.50
p c2	0.108	0.000	0.107	0.000	0.058	0.049	0.553	0.003	0.606	0.034

	rs987525 C>A – 8q24.21									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS
	278	418	166	333	66	123	100	210	112	85
T	113	202	74	164	28	56	46	108	39	38
NT	83	139	51	109	21	42	30	67	32	30
TDT	4.59	11.64	4.23	11.08	1.00	2.00	3.37	9.61	0.69	0.94
p c2	0.032	0.001	0.040	0.001	0.317	0.157	0.066	0.002	0.406	0.332

#### 4. Risultati

	rs642961 G>A – IRF6 – 1p32									
	OFC		CL/P		CL		CLP		CPO	
	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS	M/noS	F/noS
	292	410	172	320	71	121	101	199	120	90
T	98	142	55	106	21	38	34	68	43	36
NT	101	150	55	125	32	62	23	63	46	25
TDT	0.05	0.22	0.00	1.56	2.28	5.76	2.12	0.19	0.10	1.98
p c2	0.832	0.640	1.000	0.211	0.131	0.016	0.145	0.662	0.750	0.159

Tabella XXXVIII: TDT calcolati con stratificazione della casistica secondo il tipo di schisi da cui è affetto il probando della triade e secondo il genere dello stesso, rispettivamente per gli SNPs rs227731, rs9574565, rs1258763, rs987525 e rs642961, nel gruppo di tutti i probandi non esposti al fumo di sigaretta durante la gestazione.

Il polimorfismo del gene SPRY2 che dava evidenze di trasmissione sbilanciata nei casi di non esposizione, dai risultati di questa stratificazione, continua a mostrarla indipendentemente dal sesso; il polimorfismo del gene GREM1 invece mostra uno sbilanciamento solo nel caso in cui il probando sia di genere femminile e il polimorfismo del locus 8q24.21 mostra uno sbilanciamento per i probandi femmina non esposti. In particolare per questo polimorfismo si può notare in modo netto come nel caso di fenotipo di labioschisi si ha un'over-trasmissione dell'allele di rischio nei probandi femmina esposti al fumo e nel caso di fenotipo di labioschisi con palatoschisi si ha un'over-trasmissione dell'allele di rischio nei probandi femmina non esposti al fumo.

#### 4.4.1.2 Analisi Log-lineare dei Rischi Relativi

L'analisi log-lineare ha consentito di calcolare i rischi relativi (RR), per i polimorfismi studiati ai genotipi eterozigote ed omozigote nel probando affetto. Per i polimorfismi dei geni VAX e THADA non sono state trovate evidenze significative di over-trasmissione dell'allele di rischio associato ai fenotipi di schisi, di conseguenza l'analisi log-lineare dei rischi relativi ai genotipi dei probandi non è risultata significativa.

Nella tabella XXXIX che segue, per ciascun polimorfismo, sono indicati sia la coppia allelica di riferimento, sia l'allele di rischio associato ai fenotipi di schisi del quale si è effettuata l'analisi di trasmissione e per cui si sono calcolati i rischi relativi. I rischi associati ai vari genotipi sono stati calcolati inizialmente, secondo un modello di regressione log-lineare *dose-dependent*, i rischi quindi si intendono relativi al rischio di avere un dato fenotipo di schisi, in associazione con un genotipo composto dall'allele di rischio in singola o doppia dose, rispetto al genotipo opposto in cui l'allele di rischio non è presente.

Ref. Gene	SNPs code	Alleles	Het.	Hom.
NOG	rs227731	A>C	AC	CC
SPRY2	rs9574565	T>C	TC	CC
GREM1	rs1258763	G>A	GA	AA
IRF6	rs642961	G>A	GA	AA
8q24.21	rs987525	C>A	CA	AA

Tabella XXXIX: polimorfismi, geni e alleli corrispondenti al locus polimorfico

Rischi relativi (RR), associati ai genotipi nei probandi affetti, sono stati calcolati nella casistica complessiva di schisi orofacciali (OFC), nelle sole labioschisi con o senza palatoschisi (CL/P), nelle sole labioschisi senza palatoschisi (CL), nelle sole labioschisi con palatoschisi (CLP) ed infine nelle palatoschisi isolate (CPO) (Tabelle XL).

rs227731 A>C – NOG – 17q22	
OFC	AC 1.15 ( 0.95 - 1.39 ) p = 0.162
	CC 1.56 ( 1.18 - 2.07 ) p = 0.002
CL/P	AC 1.72 ( 1.40 - 2.10 ) p = 0.000
	CC 2.06 ( 1.44 - 2.95 ) p = 0.000
CL	AC 1.69 ( 1.21 - 2.37 ) p = 0.002
	CC 2.02 ( 1.10 - 3.70 ) p = 0.023
CLP	AC 1.73 ( 1.34 - 2.23 ) p = 0.000
	CC 2.08 ( 1.33 - 3.26 ) p = 0.001
CPO	AC 1.15 ( 0.82 - 1.61 ) p = 0.408
	CC 1.17 ( 0.58 - 2.38 ) p = 0.659

rs9574565 T>C – SPRY2 – 13q31.1	
OFC	TC 1.13 ( 0.78 - 1.62 ) p = 0.517
	CC 1.60 ( 1.07 - 2.40 ) p = 0.023
CL/P	TC 1.28 ( 0.81 - 2.02 ) p = 0.293
	CC 1.94 ( 1.18 - 3.20 ) p = 0.009
CL	TC 1.34 ( 0.62 - 2.86 ) p = 0.456
	CC 1.48 ( 0.64 - 3.44 ) p = 0.359
CLP	TC 1.20 ( 0.68 - 2.11 ) p = 0.539
	CC 2.19 ( 1.18 - 4.06 ) p = 0.013
CPO	TC 0.84 ( 0.46 - 1.53 ) p = 0.564
	CC 1.02 ( 0.51 - 2.03 ) p = 0.963

#### 4. Risultati

rs1258763 G>A – GREM1 – 15q14	
OFC	GA 1.18 ( 0.84 - 1.66 ) p= 0.341
	AA 1.98 ( 1.34 - 2.94 ) p= 0.001
CL/P	GA 1.17 ( 0.79 - 1.74 ) p= 0.437
	AA 2.09 ( 1.33 - 3.29 ) p= 0.001
CL	GA 1.43 ( 0.72 - 2.83 ) p= 0.311
	AA 2.18 ( 0.99 - 4.79 ) p= 0.052
CLP	GA 1.05 ( 0.65 - 1.70 ) p= 0.845
	AA 2.06 ( 1.18 - 3.59 ) p= 0.011
CPO	GA 1.21 ( 0.62 - 2.37 ) p= 0.583
	AA 1.68 ( 0.76 - 3.70 ) p= 0.198

rs987525 C>A – 8q24.21	
OFC	CA 1.52 ( 1.28 - 1.81 ) p= 0.000
	AA 1.81 ( 1.32 - 2.48 ) p= 0.000
CL/P	CA 1.72 ( 1.40 - 2.10 ) p= 0.000
	AA 2.06 ( 1.44 - 2.95 ) p= 0.000
CL	CA 1.69 ( 1.21 - 2.37 ) p= 0.002
	AA 2.02 ( 1.10 - 3.70 ) p= 0.023
CLP	CA 1.73 ( 1.34 - 2.23 ) p= 0.000
	AA 2.08 ( 1.33 - 3.26 ) p= 0.001
CPO	CA 1.15 ( 0.82 - 1.61 ) p= 0.408
	AA 1.17 ( 0.58 - 2.38 ) p= 0.659

rs642961 G>A – IRF6 – 1p32	
OFC	GA 1.15 ( 0.97 - 1.37 ) p= 0.105
	AA 1.21 ( 0.84 - 1.74 ) p= 0.299
CL/P	GA 1.27 ( 1.03 - 1.56 ) p= 0.023
	AA 1.34 ( 0.87 - 2.05 ) p= 0.181
CL	GA 1.87 ( 1.33 - 2.63 ) p= 0.000
	AA 2.38 ( 1.24 - 4.56 ) p= 0.009
CLP	GA 1.01 ( 0.78 - 1.31 ) p= 0.939
	AA 0.91 ( 0.51 - 1.62 ) p= 0.746
CPO	GA 0.90 ( 0.65 - 1.25 ) p= 0.523
	AA 0.97 ( 0.49 - 1.94 ) p= 0.941

Tabella XL: Rischi relativi stratificati per tipo di schisi e per la presenza dell'allele di rischio al genotipo del probando in singola o doppia dose. Per ogni genotipo è indicato l'intervallo di confidenza al 95%, tra parentesi tonde e la significatività p-value, laddove essa sia rappresentata da tre cifre zero dopo la virgola, significa che il livello di significatività è maggiore dell'ordine di grandezza di  $10^{-3}$ .

Nella serie di tabelle XLII si può innanzitutto notare come i rischi relativi siano statisticamente significativi per quei tipi di schisi che avevano mostrato evidenze di trasmissione asimmetrica dell'allele di rischio per i vari polimorfismi. Il genotipo del probando non conferisce un rischio maggiore per il fenotipo di palatoschisi isolata per nessuno dei polimorfismi studiati, come del resto era atteso avendo individuato i polimorfismi in loci di associazione con il fenotipo di labioschisi con o senza palatoschisi. Inoltre si può notare come per tutti i polimorfismi un rischio relativo statisticamente significativo si trova sempre associato al genotipo omozigote per l'allele di rischio e solo per rs227731 e rs987525 anche per il genotipo eterozigote. Da questa osservazione si può dedurre che probabilmente questi fattori genetici di rischio lavorano secondo un modello recessivo e non secondo un modello additivo dose dipendente.

Dunque i rischi relativi sono stati ricalcolati per tutti i cinque polimorfismi secondo un modello recessivo, che valuta cioè il rischio di avere un dato fenotipo di schisi, in associazione con un genotipo composto dall'allele di rischio in doppia dose, rispetto ai genotipi in cui l'allele di rischio è presente in una dose od in cui l'allele di rischio non è presente. Il risultato è stato che il modello recessivo si applica bene a tutti i polimorfismi, tranne a rs987525 per il quale invece l'allele A di rischio ha un comportamento da allele dominante.

L'analisi di interazione gene-ambiente (gene-environment interaction, GEI), è stata poi calcolata dicotomizzando le triadi, a seconda che siano state esposte o non, ad un fattore ambientale oggetto di studio, calcolando i rischi relativi ai diversi genotipi nel figlio nelle condizioni di esposizione e di non-esposizione, e calcolando infine la significatività statistica delle differenze di rischio. Questi valori forniscono una misura del grado di interazione. Seguendo questo modello i rischi relativi sono stati calcolati a partire dalla casistica globale mantenendo la stessa stratificazione per la tipologia di schisi e dicotomizzando secondo il sesso, considerandolo come un fattore ambientale. Nel calcolo si è arbitrariamente stabilito che: maschio=n, non esposto e femmina=e, esposto. Applicando la funzione POISSON il programma STATA ha restituito i seguenti output relativi al modello dominante d. La significatività delle eventuali differenze osservate nei RR in condizione di esposizione o non-esposizione al fumo in gravidanza è stata calcolata applicando la funzione TEST.

Durante le stratificazioni successive della casistica, secondo i fattori ambientali studiati, genere ed esposizione al fumo di sigaretta, i rischi relativi per i genotipi dei probandi sono stati calcolati secondo un modello recessivo per tutti i polimorfismi tranne come detto sopra rs987525 per cui è stato utilizzato un modello dominante. Nelle tabelle XLI di seguito si possono osservare i rischi relativi a ciascun tipo di schisi per ciascun polimorfismo stratificati secondo il genere del probando.

		rs227731 A>C – NOG – 17q22				
OFC	M	1.28	( 0.93 - 1.75 )	p =	0.129	
	F	1.41	( 1.08 - 1.83 )	p =	0.010	
CL/P	M	1.76	( 1.20 - 2.59 )	p =	0.004	
	F	1.36	( 1.02 - 1.82 )	p =	0.037	
CL	M	1.60	( 0.86 - 2.98 )	p =	0.135	
	F	1.25	( 0.77 - 2.04 )	p =	0.367	
CLP	M	1.85	( 1.13 - 3.03 )	p =	0.014	
	F	1.42	( 0.99 - 2.05 )	p =	0.055	
CPO	M	0.70	( 0.39 - 1.23 )	p =	0.213	
	F	1.57	( 0.85 - 2.88 )	p =	0.149	

		rs9574565 T>C – SPRY2 – 13q31.1				
OFC	M	1.63	( 1.21 - 2.19 )	p =	0.001	
	F	1.30	( 1.02 - 1.66 )	p =	0.037	
CL/P	M	1.98	( 1.35 - 2.91 )	p =	0.000	
	F	1.35	( 1.02 - 1.78 )	p =	0.035	
CL	M	1.64	( 0.89 - 3.02 )	p =	0.116	
	F	0.90	( 0.57 - 1.43 )	p =	0.658	
CLP	M	2.24	( 1.37 - 3.67 )	p =	0.001	
	F	1.68	( 1.19 - 2.38 )	p =	0.003	
CPO	M	1.31	( 0.83 - 2.07 )	p =	0.250	
	F	1.11	( 0.67 - 1.85 )	p =	0.675	



#### 4. Risultati

rs1258763 G>A – GREM1 – 15q14	
OFC	M 1.56 ( 1.13 - 2.17 ) p = 0.008
	F 1.81 ( 1.37 - 2.39 ) p = 0.000
CL/P	M 1.63 ( 1.08 - 2.46 ) p = 0.020
	F 1.96 ( 1.44 - 2.67 ) p = 0.000
CL	M 1.91 ( 0.96 - 3.79 ) p = 0.064
	F 1.41 ( 0.85 - 2.33 ) p = 0.184
CLP	M 1.50 ( 0.90 - 2.51 ) p = 0.121
	F 2.40 ( 1.62 - 3.55 ) p = 0.000
CPO	M 1.43 ( 0.83 - 2.48 ) p = 0.199
	F 1.22 ( 0.62 - 2.40 ) p = 0.573

rs987525 C>A – 8q24.21	
OFC	M 1.28 ( 0.98 - 1.67 ) p = 0.068
	F 1.73 ( 1.39 - 2.15 ) p = 0.000
CL/P	M 1.47 ( 1.06 - 2.04 ) p = 0.021
	F 1.91 ( 1.49 - 2.46 ) p = 0.000
CL	M 1.28 ( 0.74 - 2.22 ) p = 0.368
	F 2.00 ( 1.31 - 3.05 ) p = 0.001
CLP	M 1.57 ( 1.04 - 2.36 ) p = 0.030
	F 1.86 ( 1.36 - 2.55 ) p = 0.000
CPO	M 0.97 ( 0.62 - 1.53 ) p = 0.901
	F 1.39 ( 0.85 - 2.28 ) p = 0.185

rs642961 G>A – IRF6 – 1p32	
OFC	M 1.08 ( 0.66 - 1.77 ) p = 0.755
	F 1.01 ( 0.67 - 1.53 ) p = 0.947
CL/P	M 1.11 ( 0.59 - 2.09 ) p = 0.749
	F 0.99 ( 0.63 - 1.55 ) p = 0.966
CL	M 0.86 ( 0.33 - 2.30 ) p = 0.769
	F 1.50 ( 0.80 - 2.81 ) p = 0.207
CLP	M 1.34 ( 0.59 - 3.07 ) p = 0.486
	F 0.71 ( 0.37 - 1.37 ) p = 0.311
CPO	M 1.07 ( 0.49 - 2.33 ) p = 0.865
	F 1.08 ( 0.41 - 2.85 ) p = 0.878

Tabella XLI: Rischi relativi stratificati per tipo di schisi e genere del probando per ogni tipo di SNP considerato

Da questa prima stratificazione è possibile evidenziare come per il polimorfismo del gene IRF6 non sembra esserci un'associazione con il genere del probando, mentre invece per gli altri polimorfismi appare evidente una qualche associazione significativa, in particolare per il fenotipo di labioschisi con palatoschisi. Detta associazione risulta però ancora criptica, infatti sembra che ci sia un'associazione del rischio con entrambi i generi possibili del probando e dunque non è ancora chiaro quale sia il ruolo del polimorfismo. A tale scopo viene calcolato il test del  $\chi^2$  all'interno della stratificazione eseguita per le due variabili booleane, maschio e femmina in questo caso, ma non ci sono differenze significative tra l'effetto del genotipo omozigote per l'allele di rischio in uno o nell'altro genere. Tali dati non significativi non sono quindi riportati.

Nelle tabelle XLII di seguito con la metodica precedente si è stratificata la casistica sulla base dell'esposizione o meno al fumo di sigaretta durante la gravidanza.

rs227731 A>C – NOG – 17q22						
OFC	S	2.74	( 1.84 - 4.06 )	p =	0.000	chi2( 1) = 17.16 Prob > chi2 = 0.0000
	noS	1.05	( 0.83 - 1.33 )	p =	0.676	
CL/P	S	2.97	( 1.91 - 4.63 )	p =	0.000	chi2( 1) = 13.00 Prob > chi2 = 0.0003
	noS	1.16	( 0.88 - 1.52 )	p =	0.299	
CL	S	2.50	( 1.15 - 5.43 )	p =	0.020	chi2( 1) = 3.08 Prob > chi2 = 0.0795
	noS	1.14	( 0.73 - 1.77 )	p =	0.557	
CLP	S	3.29	( 1.93 - 5.62 )	p =	0.000	chi2( 1) = 10.83 Prob > chi2 = 0.0010
	noS	1.15	( 0.81 - 1.63 )	p =	0.443	
CPO	S	1.93	( 0.79 - 4.71 )	p =	0.150	chi2( 1) = 2.94 Prob > chi2 = 0.0862
	noS	0.81	( 0.50 - 1.29 )	p =	0.367	

rs9574565 T>C – SPRY2 – 13q31.1						
OFC	S	1.90	( 1.31 - 2.75 )	p =	0.001	
	noS	1.28	( 1.03 - 1.60 )	p =	0.027	
CL/P	S	1.89	( 1.23 - 2.92 )	p =	0.004	
	noS	1.43	( 1.10 - 1.86 )	p =	0.008	
CL	S	1.58	( 0.75 - 3.35 )	p =	0.230	
	noS	0.96	( 0.63 - 1.48 )	p =	0.862	
CLP	S	1.88	( 1.11 - 3.19 )	p =	0.019	
	noS	1.84	( 1.31 - 2.58 )	p =	0.000	
CPO	S	1.91	( 0.94 - 3.87 )	p =	0.072	
	noS	1.01	( 0.67 - 1.51 )	p =	0.966	

rs1258763 G>A – GREM1 – 15q14						
OFC	S	1.90	( 1.28 - 2.81 )	p =	0.001	
	noS	1.66	( 1.29 - 2.14 )	p =	0.000	
CL/P	S	1.89	( 1.22 - 2.94 )	p =	0.005	
	noS	1.85	( 1.37 - 2.49 )	p =	0.000	
CL	S	1.16	( 0.54 - 2.48 )	p =	0.701	
	noS	1.75	( 1.08 - 2.85 )	p =	0.024	
CLP	S	2.43	( 1.40 - 4.19 )	p =	0.001	
	noS	1.91	( 1.31 - 2.78 )	p =	0.001	
CPO	S	1.91	( 0.81 - 4.48 )	p =	0.137	
	noS	1.22	( 0.74 - 2.01 )	p =	0.433	

rs987525 C>A – 8q24.21						
OFC	S	1.17	( 0.87 - 1.59 )	p =	0.298	chi2( 1) = 5.05 Prob > chi2 = 0.0247
	noS	1.79	( 1.45 - 2.20 )	p =	0.000	
CL/P	S	1.37	( 0.97 - 1.94 )	p =	0.073	chi2( 1) = 2.90 Prob > chi2 = 0.0886
	noS	1.98	( 1.55 - 2.53 )	p =	0.000	
CL	S	1.89	( 1.02 - 3.49 )	p =	0.043	chi2( 1) = 0.09 Prob > chi2 = 0.7673
	noS	1.69	( 1.13 - 2.52 )	p =	0.010	
CLP	S	1.18	( 0.77 - 1.80 )	p =	0.438	chi2( 1) = 5.29 Prob > chi2 = 0.0214
	noS	2.17	( 1.59 - 2.96 )	p =	0.000	
CPO	S	0.73	( 0.38 - 1.42 )	p =	0.355	chi2( 1) = 2.87 Prob > chi2 = 0.0903
	noS	1.43	( 0.96 - 2.12 )	p =	0.082	

#### 4. Risultati

rs642961 G>A – IRF6 – 1p32						
OFC	S	2.03	( 1.11 - 3.70 )	p =	0.021	chi2( 1) = 6.91 Prob > chi2 = 0.0086
	noS	0.79	( 0.55 - 1.15 )	p =	0.221	
CL/P	S	2.21	( 1.14 - 4.26 )	p =	0.018	chi2( 1) = 7.07 Prob > chi2 = 0.0078
	noS	0.76	( 0.49 - 1.18 )	p =	0.220	
CL	S	2.38	( 0.84 - 6.73 )	p =	0.102	chi2( 1) = 2.29 Prob > chi2 = 0.1302
	noS	0.94	( 0.51 - 1.75 )	p =	0.854	
CLP	S	2.10	( 0.89 - 4.92 )	p =	0.089	chi2( 1) = 5.32 Prob > chi2 = 0.0210
	noS	0.60	( 0.31 - 1.14 )	p =	0.121	
CPO	S	1.33	( 0.30 - 5.99 )	p =	0.711	chi2( 1) = 0.17 Prob > chi2 = 0.6792
	noS	0.94	( 0.48 - 1.83 )	p =	0.857	

Tabella XLII: Rischi relativi stratificati per tipo di schisi ed esposizione al fumo di sigaretta

Da questa successiva stratificazione è possibile osservare che per i polimorfismi dei geni SPRY2 e GREM1 c'è un'associazione del rischio relativo in particolare con il fenotipo di labioschisi con palatoschisi, ma questa rimane ancora da indagare in quanto sembra essere presente in entrambi i casi, di esposizione o meno al fumo di sigaretta.

Per il polimorfismo rs987525 sembra invece più chiara un'associazione del rischio relativo nei casi di esposizione al fumo. Per tutti e tre questi polimorfismi però non esiste una differenza significativa tra il rischio attribuibile agli esposti e quello dei non esposti.

Per quanto riguarda invece il polimorfismo del gene NOG si ha un importante risultato, che mostra un'associazione tra il genotipo omozigote CC, che è l'allele di rischio per tale polimorfismo, e il fenotipo di labioschisi con schisi del palato nei probandi esposti al fumo, un rischio che inoltre è statisticamente diverso da quello attribuibile ai non esposti, sui quali la componente genetica sembra non avere effetto, il  $\chi^2=10.83$  con un valore di significatività p-value=0.0010. Questo risultato è molto importante perché colloca il gene NOG in un pathway eziologico di rischio, con interazione con il fumo di sigaretta.

Il risultato per il polimorfismo del gene IRF6 è simile a quello evidenziato per il gene NOG. Si ha un'associazione tra il genotipo omozigote AA, che è l'allele di rischio per tale polimorfismo, e il fenotipo di labioschisi con o senza schisi del palato nei probandi esposti al fumo, un rischio che inoltre è statisticamente diverso da quello attribuibile ai non esposti, sui quali la componente genetica sembra non avere effetto, il  $\chi^2=7.07$  con un valore di significatività p-value=0.0078, inoltre sembra che il rischio sia poi attribuibile per la maggior parte al fenotipo di labioschisi con un  $\chi^2=5.32$  ed un valore di significatività p-value=0.0210.

Alla luce di questi risultati si è deciso di procedere ad ulteriori stratificazioni. Abbandonando l'analisi del fenotipo di palatoschisi isolata, in quanto non ha mostrato evidenze significative di nessun tipo in associazione con gli SNPs studiati, sono stati calcolati i rischi relativi stratificati per

tipo di schisi, esposizione o meno, al fumo di sigaretta per i probandi di genere femminile (Tabelle XLIII).

rs227731 A>C – NOG – 17q22								
OFC	F/S	3.57	(	2.13	-	5.99	) p = 0.000	chi2( 1) = 15.06 Prob > chi2 = 0.0001
	F/noS	1.11	(	0.82	-	1.51	) p = 0.492	
CL/P	F/S	3.39	(	1.91	-	6.01	) p = 0.000	chi2( 1) = 11.60 Prob > chi2 = 0.0007
	F/noS	1.09	(	0.78	-	1.52	) p = 0.629	
CL	F/S	3.18	(	1.17	-	8.61	) p = 0.023	chi2( 1) = 4.42 Prob > chi2 = 0.0356
	F/noS	0.95	(	0.54	-	1.67	) p = 0.855	
CLP	F/S	3.08	(	1.54	-	6.16	) p = 0.002	chi2( 1) = 5.69 Prob > chi2 = 0.0171
	F/noS	1.16	(	0.76	-	1.77	) p = 0.485	

rs987525 C>A – 8q24.21								
OFC	F/S	1.59	(	1.03	-	2.43	) p = 0.035	chi2( 1) = 4.41 Prob > chi2 = 0.0357
	F/noS	2.74	(	2.03	-	3.70	) p = 0.000	
CL/P	F/S	1.30	(	0.84	-	1.99	) p = 0.236	chi2( 1) = 3.41 Prob > chi2 = 0.0648
	F/noS	2.11	(	1.56	-	2.85	) p = 0.000	
CL	F/S	2.27	(	1.04	-	4.94	) p = 0.039	chi2( 1) = 0.21 Prob > chi2 = 0.6462
	F/noS	1.83	(	1.12	-	3.01	) p = 0.016	
CLP	F/S	1.01	(	0.60	-	1.70	) p = 0.972	chi2( 1) = 6.41 Prob > chi2 = 0.0113
	F/noS	2.29	(	1.57	-	3.34	) p = 0.000	

rs642961 G>A – IRF6 – 1p32								
OFC	F/S	1.67	(	0.78	-	3.58	) p = 0.187	chi2( 1) = 5.38 Prob > chi2 = 0.0204
	F/noS	0.58	(	0.36	-	0.94	) p = 0.027	
CL/P	F/S	1.84	(	0.81	-	4.17	) p = 0.143	chi2( 1) = 5.01 Prob > chi2 = 0.0252
	F/noS	0.61	(	0.35	-	1.04	) p = 0.070	
CL	F/S	3.35	(	0.95	-	11.85	) p = 0.060	chi2( 1) = 1.84 Prob > chi2 = 0.1751
	F/noS	1.23	(	0.59	-	2.56	) p = 0.576	
CLP	F/S	1.91	(	0.63	-	5.82	) p = 0.253	chi2( 1) = 3.00 Prob > chi2 = 0.0835
	F/noS	0.57	(	0.25	-	1.28	) p = 0.176	

Tabella XLIII: Rischi relativi stratificati per tipo di schisi, esposizione o meno al fumo di sigaretta per i probandi di genere femminile

Per quanto riguarda il polimorfismo rs987525 vediamo come il genotipo omozigote AA conferisca un rischio aumentato di 2 volte in associazione al fenotipo di labioschisi con schisi del palato, se il probando è femmina e non è esposto al fumo. Il calcolo del Chi<sup>2</sup> ci dice che questo rischio relativo è statisticamente significativo e diverso da quello che avrebbe lo stesso probando se però fosse esposto al fumo,  $\chi^2=6.41$  con un livello di significatività p-value=0.0113. Ciò non significa che il fumo sia un fattore protettivo, ma che, probabilmente, nel caso il probando sia esposto al fumo di

#### 4. Risultati

sigaretta, questo fattore di rischio genetico non è più così rilevante, poiché il fumo probabilmente lo è di più e non interagisce con questo determinato fattore.

Per quanto riguarda il polimorfismo rs642961 è possibile notare come il genotipo omozigote AA conferisca un effetto protettivo in associazione al fenotipo di labioschisi con o senza schisi del palato, se il probando è femmina e non è esposto al fumo. Lo stesso genotipo risulterebbe invece di rischio se il probando è femmina ed è esposto al fumo, questo dato conferma, come già precedentemente osservato, che detto polimorfismo è associato significativamente al fumo; in assenza di esposizione il genotipo invece non rappresenta più un fattore di rischio importante poiché viene a mancare l'interazione, in aggiunta sembra che questo meccanismo sia valido per i probandi di sesso femminile e non maschile.

Infine il risultato più di rilievo riguarda il polimorfismo rs227731 del gene NOG dove il genotipo omozigote CC conferisce un rischio aumentato di 3 volte per tutti i fenotipi di schisi, se il probando è femmina ed è esposto al fumo. Il calcolo del  $\chi^2$  indica che questo rischio relativo è statisticamente significativo e diverso da quello che avrebbe lo stesso probando se fosse esposto al fumo,  $\chi^2=11.60$  con un livello di significatività  $p\text{-value}=0.0007$  per le labioschisi con o senza schisi del palato; significatività che si divide nei due gruppi labioschisi e labioschisi con schisi del palato, rispettivamente con  $\chi^2=4.42$  ed un livello di significatività  $p\text{-value}=0.03$  e  $\chi^2=5.69$  ed un livello di significatività  $p\text{-value}=0.02$ . Questo suggerisce una forte interazione tra NOG, esposizione al fumo ed sesso del probando.

## 4.5 Analisi di interazioni epistatiche e gene-ambiente

L'analisi d'interazione gene-gene (GGI) e gene-ambiente (GEI) è stata condotta utilizzando un apposito software, MDR, ideato per studiare le interazioni complesse in cui il numero di fattori studiati e la grandezza della casistica aumentano esponenzialmente il numero di interazioni indagabili possibili da rendere impossibile ad un operatore lo studio di tutte per ricavare il modello più verosimile di interazione. L'analisi d'interazione è stata condotta secondo due diversi approcci: il primo razionale, cioè sulla base delle osservazioni già ottenute dall'analisi TDT e log-lineare dei RR; il secondo irrazionale senza cioè un'ipotesi a priori per individuare quelle interazioni che non erano visibili all'operatore in altro modo, a causa appunto della complessità del dataset.

Nonostante l'MDR sia stato ideato per un utilizzo secondo un approccio irrazionale, in questo caso specifico si è voluto applicare MDR anche in modo razionale per valutare la possibile riconferma dei risultati già osservati. Durante le precedenti analisi è emerso chiaramente che i polimorfismi studiati mostrano evidenze di associazione solamente con i fenotipi di Labio/Palatoschisi e mai con quello di Palatoschisi isolata. Inoltre è stato evidenziato che per molti dei polimorfismi studiati l'esposizione al fumo di sigaretta risulta associato ad un aumento del rischio relativo. Per questo nell'approccio razionale l'analisi di interazione si è concentrata da subito sui probandi con il fenotipo di schisi di Labio/Palatoschisi nei soli probandi esposti al fumo di sigaretta.

Lo schema d'interazione riporta il modello più verosimile calcolato per i 7 SNPs studiati ed il fattore ambientale di esposizione al fumo di sigaretta nei casi di Labio/Palatoschisi.

Un output grafico di interazione ottenibile è un dendrogramma che mette in comunicazione i vari fattori studiati, dove si ha contemporaneamente un'informazione di tipo qualitativo e quantitativo delle interazioni risultate dall'analisi (Figura 4.5.1).

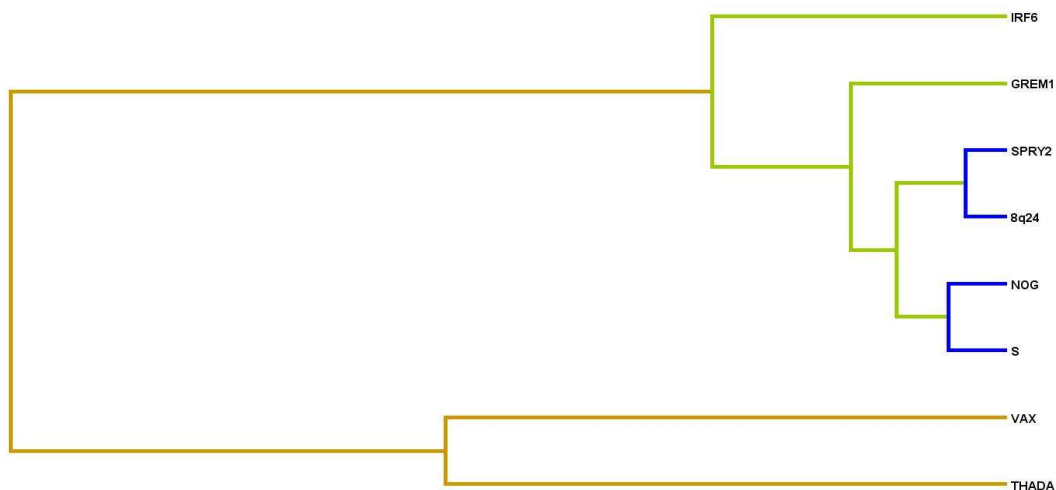


Figura 4.5.1: Dendrogramma di output MDR, schema di interazione tra i 7 SNPs studiati per i probandi con Labio/Palatoschisi esposti al fumo di sigaretta durante la gestazione. La lunghezza dei rami è funzione della forza e del grado d'interazione, mentre l'informazione qualitativa del tipo d'interazione è data dai colori; il codice colore è il seguente: rosso=sinergia, blu=ridondanza, verde=additività e marrone=vie separate d'azione, che si potrebbe tradurre con un'assenza di interazione.

#### 4. Risultati

Come risultato importante da questa prima analisi di interazione si nota come il polimorfismo del gene *NOG* sia il più fortemente associato al fumo di sigaretta (S), confermando quanto già precedentemente dimostrato dall'analisi log-lineare dei rischi relativi (Figura 4.5.1).

Al fine di individuare eventuali interazioni epistatiche tra geni è eseguita una analisi MDR considerando la casistica di Labio/Palatoschisi. Il dendrogramma risultante è riportato di seguito (Figura 4.5.2).

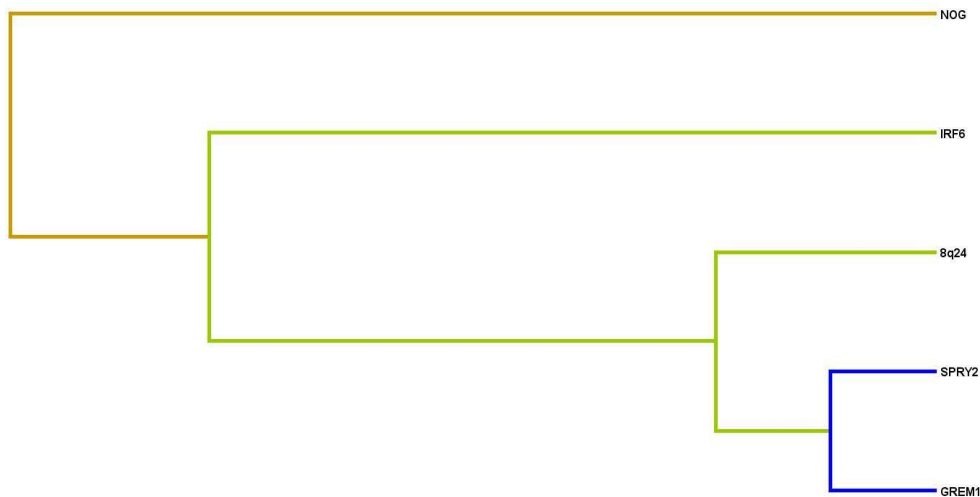


Figura 4.5.2: Dendrogramma di interazione tra i 5 SNPs studiati nella casistica di Labio/Palatoschisi.

L'analisi MDR colloca *NOG* in un contesto separato, apparentemente senza interazioni con gli altri geni studiati. Inoltre evidenzia una forte interazione tra la variante in *SPRY2* e quella in *GREM1*. Eliminando dal sistema l'effetto determinato dalla variante di *NOG*, l'interazione *SPRY2*/*GREM1* risulta più accentuata (Figura 4.5.3).

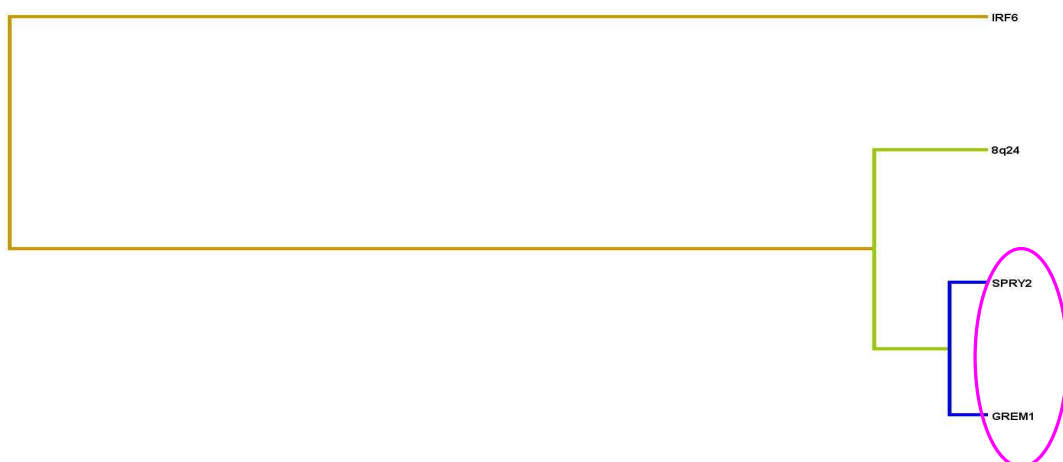


Figura 4.5.3: Dendrogramma di interazione tra i 4 SNPs studiati nella casistica di Labio/Palatoschisi.

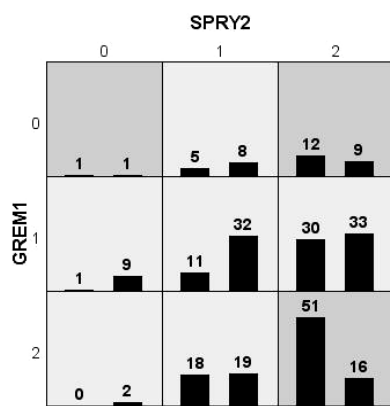


Figura 4.5.4: Matrice di interazione tra i polimorfismi dei geni SPRY2 e GREM1 nei probandi con Labio/Palatoschisi.

Studiando la matrice di interazione tra SPRY2 e GREM1 (Figura 4.5.4), si osserva come la combinazione genotipica ad alto rischio per le schisi sia data dalla contemporanea presenza del genotipo omozigote per l'allele di rischio ad entrambe i loci. Calcolando il test esatto di Fisher si ottiene un valore di significatività  $p\text{-value}=0.0000009$ . La casistica va ora stratificata tra esposizione e non al fumo. L'interazione tra i polimorfismi dei geni SPRY2 e GREM1 rimane significativa all'interno della casistica di probandi non esposti al fumo di sigaretta; studiando quindi tale matrice di interazione (Figura 4.5.5) è possibile notare come la combinazione genotipica ad alto rischio per le schisi sia data dalla contemporanea presenza del genotipo omozigote per l'allele di rischio ad entrambe i loci. Calcolando il test esatto di Fisher si ottiene un

valore di significatività  $p\text{-value}=0.000006$ . Questo risultato rappresenta una prima vera interazione gene-gene. I due geni, SPRY2 e GREM1 per i quali sono stati studiati due polimorfismi interagiscono per dare, in condizioni di genotipo omozigote per l'allele di rischio per entrambi i polimorfismi, Labio/Palatoschisi non sindromiche. Inoltre ciò che è rilevante è che questa interazione si mantiene significativa nel sottogruppo di probandi che non sono stati esposti al fumo di sigaretta durante la gravidanza, questo mette in luce il fatto che l'interazione tra questi due geni è indipendente dai pathway di biochimica cellulare che vengono innescati con il fumo di tabacco e

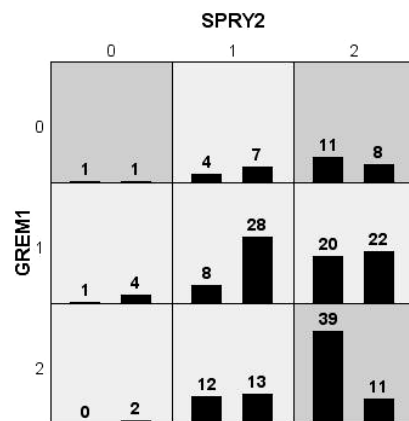


Figura 4.5.5: Matrice di interazione tra i polimorfismi dei geni SPRY2 e GREM1 nei probandi con Labio/Palatoschisi non esposti al fumo di sigaretta.

pone l'attenzione sul rischio che anche madri con uno stile di vita sano possono incontrare solo sulla base di una combinazione genotipica ad alto rischio. Questa interazione, in presenza invece di un'esposizione al fumo di sigaretta, perde di significatività, i dati quindi non sono mostrati, anche se il gruppo di probandi con questa condizione genotipica di rischio per i due polimorfismi e che sono stati esposti al fumo di sigaretta sono numericamente troppo pochi per generare significatività statistiche, anche se non si può escludere con certezza che anche in esposizione al fumo questa interazione rimanga. Ciò che è certo è che in presenza del fattore ambientale di rischio fumo si attivano altre interazioni, in particolare con il gene NOG. L'interazione tra il fumo e il polimorfismo studiato per il gene NOG rappresenta un primo

risultato importante di interazione gene-environment a cui fa seguito l'interazione ridondante tra il polimorfismo del gene SPRY2 e del locus genico 8q24.21, come descritto in precedenza.





## 5. Discussione

---

## 5.1 Ricerca dei maggiori loci associati a Labio/Palatoschisi

Le schisi orofacciali non sindromiche sono il difetto malformativo congenito più comune, seconde solo al talipes equinovarus, piede equino. Pazienti con schisi orofacciali affrontano serie difficoltà nella deglutizione e quindi nell'alimentazione fin dalle primissime ore di vita. Le problematiche, coinvolgono successivamente lo sviluppo della funzione linguistica del bambino, che non è in grado di realizzare appieno la fase della lallazione, ciò comporta ripercussioni nella comunicazione verbale a livello fonetico, in certi casi fino anche all'età adulta. Inoltre, da non sottovalutare, sono le problematiche di tipo estetico che riguardano soprattutto i fenotipi clinici più rilevanti. L'incidenza delle schisi orofacciali non sindromiche è globalmente di 1/700 nati vivi (Stanier and Moore, 2004). La Labio/Palatoschisi (CL/P) è un difetto congenito epidemiologicamente ed eziologicamente distinta dalla palatoschisi isolata (CPO). In accordo con questa distinzione anche nel nostro studio si nota come nessuno dei polimorfismi identificati associati alle Labio/Palatoschisi dall'analisi genome-wide risulti essere associato anche con il fenotipo di schisi isolata del palato. Ulteriore conferma risiede nel fatto che anche nell'analisi statistica la palatoschisi isolata non mostra nessuna associazione con un aumento di rischio relativo in rapporto ai genotipi dei probandi affetti. L'incidenza della CL/P varia significativamente in base alla popolazione di appartenenza ed allo stato socio-economico con un'incidenza di 1/1000 nati nei discendenti Europei, 1/500 nati nei discendenti Asiatici e nei nativi Americani e di circa 1/2400-2500 nati nei discendenti Africani (Kirschner and LaRossa, 2000). L'incidenza della palatoschisi non presenta la stessa eterogeneità etnica ed è comunemente calcolata a 1/1500-2000 nati vivi (Stanier and Moore, 2004; Kirschner and LaRossa, 2000; Nguyen and Sullivan, 1993). Le sotto-popolazioni da noi campionate sono tutte parte della popolazione dei discendenti Europei, all'interno di una così vasta popolazione l'incidenza di questa tipologia di schisi rimane omogenea. Il 60% - 80% dei pazienti con CL/P sono maschi, ma è stata riconosciuta una predominanza femminile nei bambini affetti da CPO (Strong and Buckmiller, 2001; Stanier and Moor, 2004; Kirschner and LaRossa, 2000; Nguyen and Sullivan, 1993). La maggior parte dei casi di schisi orofacciali, OFC, circa il 70% è considerata non sindromica, NS-OFC e si presenta come un carattere complesso, multifattoriale dove quindi è presente una componente genetica, una componente ambientale e fattori stocastici (Murray, 2002; Jugessur and Murray, 2005).

Ampi tentativi, per rivelare le basi genetiche dell'eziologia delle NSCL/P, sono stati intrapresi utilizzando diversi approcci (Jugessur and Murray, 2005) e come risultato sono stati identificati più di 30 potenziali loci e geni candidati nel genoma umano, ma la variante eziologica non è stata identificata. Dei 30 candidati i principali e più studiati sono: MTHFR, IRF6, TGFA, MSX1, TGFB3, TGFB1 e RARA.

## 5.2 Ruolo di FAF1 nell'eziologia delle Palatoschisi

La sindrome di Pierre Robin (o sequenza di Pierre Robin) è caratterizzata da una triade di anomalie della morfologia oro-facciale: retrognazia, glossoptosi e schisi della parte mediale posteriore del palato molle.

Nello studio, in corso di pubblicazione nella rivista "*The American Journal of Human Genetics*", è stato caratterizzato il ruolo di FAF1 (fas associated factor 1) nello sviluppo orofacciale.

Dopo avere individuato un'aploinsufficienza di FAF1, che provoca CPO in una famiglia affetta da sindrome di Pierre Robin, è stata verificata una significativa diminuzione dell'espressione di FAF1, causata da una traslocazione (46,XY,t(1;2)(p34;q33)); inoltre studi di associazione condotti in 7597 individui mostrano una significativa associazione con CPO avendo un RR di 1.47.

Essendo il ruolo di FAF1, nello sviluppo orofacciale, ancora poco conosciuto, sono stati condotti studi di espressione negli embioni di zebrafish (Figura 5.2.1), dimostrando che FAF1 è indispensabile nello sviluppo degli archi faringei e nella differenziazione delle creste neurali cefaliche (CNC) in cartilagine, inoltre aggiungendo mRNA di *faf1*, in knockdown *faf1* di zebrafish, il fenotipo viene ripristinato.

Tale studio ha, perciò, permesso di concludere che FAF1 è la chiave di sviluppo orofacciale, giocando un ruolo fondamentale nell'eziopatogenesi delle schisi del solo palato.

Per quanto concerne lo studio di associazione condotto su 2530 triadi provenienti da diverse aree geografiche, in particolare da: Belgio, studio Eurocran/Italleft, Germania, Texas, Iowa e Filippine è stato analizzato separatamente, per replicare l'associazione del gene in questione (Tabella XLV).

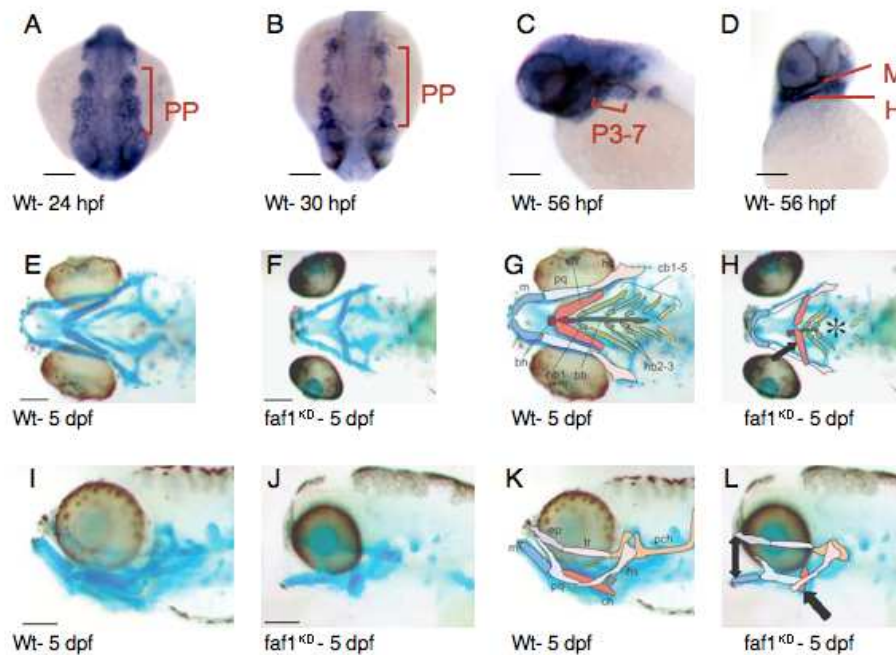


Figura 5.2.1: visione dorsale (A e B) e laterale (C e D) a diversi stadi di sviluppo di zebrafish (controllo) in cui è possibile individuare l'espressione di FAF1. Scale bars: 100  $\mu$ m. Colorazione con Alcian blue (E-L) per evidenziare la cartilagine faringea in larve wild-type (E, G, I, K) e *faf1*<sup>KD</sup> (F, H, J, L). Scale bars: 200  $\mu$ m (Ghassibe-Sabbagh et al., 2011).

## 6. Bibliografia

Population Origin (in Collaboration with)	Genotyped SNPs (Major/Minor allele)	Cleft Type	Number of Individuals (T = 7597)	Number of Affected Individuals	Associated SNP (Associated Allele)	Familial History	TDT p Value rs1149795	TDT p Value rs3827730	Relative risk of CPO Conferred by TT Genotype of rs3827730; p value
Eurocran and Italcleft: IT, NL, UK, HU, SI, ET, SK, and BU (M. Rubini)	rs1149795 (T/C), rs3827730 (C/T), rs17382596 (T/G)	CPO	843	281	rs3827730 (T)	S	0.67	<b>0.007</b>	<b>1.38 (1.02-1.87); p = 0.036</b>
NL		CPO	165	55	none	S	N/A	0.42	1.02 (0.51-2.05); p = 0.955
IT		CPO	183	61	rs3827730 (T)	S	N/A	<b>0.02</b>	<b>2.04 (1.06-3.96); p = 0.034</b>
UK		CPO	201	67	none	S	N/A	0.43	1.44 (0.77-2.70); p = 0.252
Eurocran Western Europe (NL + IT + UK)		CPO	549	183	rs3827730 (T)	S	N/A	<b>0.03</b>	<b>1.43 (0.98-2.08); p = 0.064</b>
Eurocran Eastern Europe (HU, SI, ET, SK, BU)		CPO	294	98	none	S	N/A	0.09	1.38 (0.82-2.30); p = 0.224
Belgium + Germany + Eurocran and Italcleft	rs3827730 (C/T)	CPO	1410	506	rs3827730 (T)	S+N/A	N/A	<b>0.0007</b>	<b>1.51 (1.18-1.93); p = 0.001</b>
Belgium + Germany + Eurocran and Italcleft + Iowa	rs3827730 (C/T)	CPO	1656	596	rs3827730 (T)	F+S	N/A	<b>0.0003</b>	<b>1.47 (1.17-1.86); p = 0.001</b>

TDT was done with the RBAT program for all populations except the European-descent cohort from Texas (APL). Notations are as follows: mixed, all cleft types together (CPO + CL + CLP); CPO, cleft palate only; CL, cleft lip; CLP, cleft lip and palate; CL/P, cleft lip with or without cleft palate; F, familial; S, sporadic; N/A, not available; NI, not informative; T, total; IT, Italy; NL, The Netherlands; UK, The United Kingdom; HU Hungary; SI Slovenia; ET Estonia; SK, Slovakia; and BU, Bulgaria. Note that in the CPO cohort from Belgium, 38 patients had isolated PRS (CPO + retrognathia), all others had CPO.

Tabella XLV: valori di TDT e RR relativi allo SNP rs3827730 nelle diverse casistiche (Ghassibe-Sabbagh et al., 2011).

E' stato quindi condotto lo studio di associazione nella casistica Eurocran/Italcleft, considerando il polimorfismo, rs3827730, a singolo nucleotide T>C, localizzato in posizione 50710436, nella regione intronica 18, in cui T rappresenta sempre l'allele ancestrale, che si presenta con una frequenza molto eterogenea nella popolazione mondiale; presenta ad esempio una frequenza del 60% negli Europei, del 25% circa negli Asiatici e del 90% negli Africani e nei Nord-Americani.

Tale polimorfismo presenta una frequenza dell'allele ancestrale nella casistica Eurocran del 65%, di cui il 45% circa in omozigosi e il 42% in eterozigosi. I valori qui riportati rappresentano una media delle frequenze madre, padre e figlio, che risulta possibile in quanto la distribuzione è pressoché omogenea.

Nell'analisi generale del TDT è stata riscontrata una trasmissione asimmetrica nel polimorfismo rs3827730, con una prevalenza di non trasmissione dell'allele C, con valori di  $\chi^2=7,41$  e una significatività, p-value, di 0,006 (tabella 22). Questo dato dimostra quindi una trasmissione preferenziale dell'allele T, ancestrale, ma che da analisi successive si è dimostrato di rischio. Ripetendo l'analisi, per il medesimo polimorfismo, stratificando per genere del figlio affetto, la trasmissione si è verificata asimmetrica nel genere maschile, a favore della trasmissione dell'allele T, con un valore di TDT di 6,38, con una significatività, p-value=0,012.

Anche la stratificazione per assunzione o meno di acido folico in gravidanza ha mostrato significatività per il polimorfismo rs3827730, per cui la trasmissione dell'allele T è favorita dall'assunzione di acido folico, nel genere maschile.

Il polimorfismo rs3827730 presenta risultati significativi anche nell'analisi TDT stratificata per esposizione al fumo di sigaretta in gravidanza, con una maggiore trasmissione dell'allele T, per mancata esposizione, nel genere maschile. Nel genere femminile, invece, si ha una prevalenza di non trasmissione nel caso in cui la madre sia stata esposta al fumo.

Il calcolo dei rischi relativi è stato svolto mediante un'analisi log-lineare, approccio basato sul calcolo della massima verosimiglianza. L'analisi log-lineare fornisce valori di rischio relativo (RR)

associati a specifici genotipi portati dal figlio affetto o dalla madre. Permette pertanto di valutare estesamente il possibile ruolo del genotipo materno nel condizionare l'ambiente intrauterino e determinare un rischio alterato di sviluppare patologia nell'embrione.

In particolare è emerso un livello di protezione nel modello dominante (TC), se presente come genotipo del figlio, con un RR di 0,70 e un p-value di 0,033; questo significa che il genotipo di rischio è TT (modello recessivo), in quanto i rischi sono relativi all'allele C, allele derivato.

Il rischio calcolato si scatena prevalentemente sui figli maschi, sempre nel genotipo TT, con un rischio aumentato di 2 volte e una significatività, p-value, di 0,005.

I risultati più significativi sono emersi, però, nella stratificazione per esposizione al fumo di sigaretta, infatti il polimorfismo mostra rischi relativi aumentati, nel modello dominante e recessivo per genotipo della madre esposta al fumo in gravidanza, con valori di rischi relativo aumentato rispettivamente di 4,60 volte ( $p=0,001$ ) e di 3,44 volte ( $p=0,003$ ).

Infine, l'analisi log-lineare, applicata sulla casistica dicotomizzata per esposizione ad un particolare fattore ambientale, consente di valutare i RR in dipendenza di fattori di rischio ambientale, e di evidenziare pertanto eventuali interazioni gene-ambiente (GEI).

L'indagine GEI è stata condotta in riferimento al fatto che la madre abbia o non abbia seguito una supplementazione con folati o multivitaminici durante il secondo-terzo mese di gravidanza, periodo gestazionale critico per la chiusura del palato e in riferimento all'esposizione da parte della madre al fumo di sigaretta.

La stratificazione basata sull'assunzione di acido folico in gravidanza, non ha mostrato particolari evidenze, solo una tendenza all'aumento del rischio per il modello recessivo nella madre, in caso di assunzione di acido folico; il rischio risulta aumentato di 1,80 volte con una significatività p-value di 0,049, nel caso in cui il genere del figlio affetto sia femminile.

Risultati più significativi sono invece emersi nella stratificazione basata sull'esposizione al fumo di sigaretta in gravidanza, evidenziando un rischio aumentato di 3,85 volte per genotipo TT del figlio, con una significatività p-value di 0,011, nel caso in cui il genere sia femminile.

## 5.3 Individuata in IRF6 la prima variante di suscettibilità per Labioschisi

Nel presente studio la ricerca di varianti comuni associate a rischio di OFC viene pianificata con un approccio di gene candidato, scelto applicando l'ipotesi che gli stessi geni che causano le forme sindromiche di OFC possono associarsi anche alle forme isolate. Secondo questa ipotesi, mentre mutazioni ad alta penetranza in geni coinvolti nello sviluppo del labbro e del palato determinerebbero OFC ereditarie, varianti geniche comuni (polimorfismi) negli stessi geni agirebbero come fattori a bassa penetranza e sarebbero responsabili della componente genetica delle forme di OFC non-sindromiche.

La scelta del gene candidato è caduta su IRF6, che è associato alla sindrome di Van der Woude (WVS), una patologia monogenica per la quale la manifestazione clinica più rilevante è lo sviluppo di schisi orofacciali (OFC) miste: nelle famiglie WVS si presentano sia labioschisi, con o senza palatoschisi (CL/P), che palatoschisi (CPO), ed il fenotipo clinico cosegrega con mutazioni rare nel gene IRF6. I portatori di mutazioni in IRF6 sono caratterizzati anche dalla presenza di fossette o fistole al labbro inferiore, che si manifestano con una penetranza dell' 85%. Il rimanete 15% presentano OFC senza fossette o fistole labiali e risultano quindi clinicamente indistinguibili dalle più comuni forme di schisi non sindromiche.

L'ipotesi che il gene IRF6 possa essere coinvolto anche nelle forme isolate di OFC ha recentemente trovato riscontro in alcuni studi che riportano associazione tra la variante missenso p.V274I ed il rischio di CL/P in popolazioni Amerindie o Asiatiche (Rahimov et al., 2008).

IRF6 fa parte di una famiglia di fattori di regolazione dell'interferone IRFs composta da 9 diversi fattori. Il gene IRF6, (fattore 6 di regolazione dell'interferone) è stato mappato nel braccio lungo del cromosoma 1 a livello della regione 1q32-q41, precisamente localizzato nel segmento da 208,027,884 bp a 208,046,101 bp del cromosoma 1, ha una dimensione di circa 18,000 bp ed è formato da 10 esoni. Gli esoni 1, 2, 9 e 10 presenti nei trascritti di IRF6, nella maggior parte dei casi non vengono tradotti. La proteina tradotta dal gene IRF6 contiene, comunemente agli altri membri della famiglia, un dominio di legame per il DNA tradotto dagli esoni 3 e 4 e un dominio di legame proteico, detto SMIR, tradotto dagli esoni 7 e 8. Il sito di legame del DNA include un motivo di pentatriptofano.

L'espressione di IRF6 è presente in un ampio spettro di tessuti normali dell'area cranio-facciale e degli arti in formazione durante lo sviluppo embrionale nel modello murino. Durante lo sviluppo cranio-facciale, Irf6 è espresso a livello epiteliale nel bordo mediale dei processi palatini in fusione (Kondo et al., 2002). Attualmente, il ruolo di IRF6 nelle schisi orofacciali non sindromiche non è ancora stato chiarito e nonostante i numerosi studi sui polimorfismi del gene molte sono ancora le divergenze sul loro coinvolgimento.

Una variante missenso di IRF6, c. c.820G>A, determina la sostituzione del residuo di valina (V) in posizione 274 in una isoleucina (I) (p.V274I). Questa variante genica corrisponde ad un polimorfismo mononucleotidico (SNP) di IRF6 (rs2235371) che è stato riportato essere

significativamente associato con NS-CL/P in popolazioni Asiatiche e Amerindie (Rahimov et al., 2008).

L'allele che associa con aumentato rischio per CL/P corrisponde al nucleotide G, che è altamente conservato attraverso le specie e la cui frequenza è estremamente elevata in popolazioni Europee ed Africane (>97%).

Queste evidenze portano a considerare rs2235371 essere, con ogni probabilità, solo un surrogato della vera variante eziologia, la quale si ritiene debba essere localizzata all'interno di un blocco linkage-disequilibrium di circa 140Kb che comprende l'intero gene IRF6 (Figura 5.3.1).

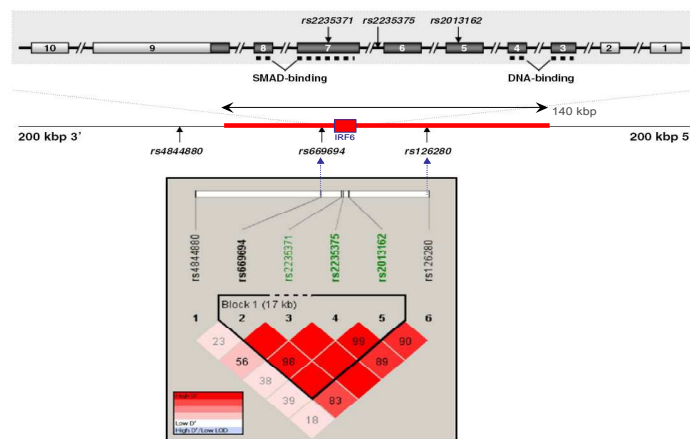


Figura 5.3.1 La figura illustra il gene di interesse IRF6, partendo da una visualizzazione dettagliata degli esoni del gene, ingrandendo poi a livello della regione genica 1q32-q41, ed ingrandendo ancora per identificare nella regione in linkage disequilibrium di 140 Kbp alcune delle varianti più comuni conosciute (Rahimov et al., 2008).

Per individuare la variante di IRF6 associata a NS-CL/P la prima ipotesi formulata è stata di ricercare lo SNP all'interno delle sequenze codificanti del gene. Presso l'Università dello stato di Iowa la sequenza di IRF6, è stata analizzata in 160 casi di NS-OFC, ma lo studio non ha condotto all'isolamento di alcuna mutazione causale.

Basandosi sulle suddette osservazioni, si è ipotizzato che la variante eziologica doveva trovarsi in forte linkage disequilibrium con l'allele che traduce per V (allele G) e che risiedesse in un elemento di regolazione di IRF6 all'interno del blocco in linkage disequilibrium. Un allineamento di sequenze ortologhe del gene IRF6 provenienti da 17 diverse specie di vertebrati ha portato ad individuare 407 MCS (multi-species conserved sequences). Dalle suddette sequenze, ne sono state selezionate 41 non codificanti (in introni ai lati delle estremità 5' e 3' del gene IRF6), contenute all'interno del blocco di 140Kb in forte linkage disequilibrium; che potrebbe contenere lo SNP, causale per NSCL/P.

Le sequenze sono state studiate in 184 casi provenienti dallo stato di Iowa e dalle Filippine trovando diverse varianti (SNPs), di cui 6 nuove e 12 già precedentemente identificate. Secondo



## 6. Bibliografia

un approccio population-based sono stati sequenziati un numero uguale di casi e controlli per stabilire se le frequenze delle varianti fossero significative. Delle 18 varianti soltanto tre mostravano una distribuzione significativamente differente da casi a controlli. Tutte e tre queste varianti si trovano localizzate in un segmento MCS di 50bp chiamato 9.7, e sono: -14474A>G , -14523G>A e rs642961G>A.

Gli alleli ancestrali, comuni, dei due SNPs -14474A>G e -14523G>A, sono sovra-rappresentati nei casi rispetto ai controlli provenienti dalla popolazione dello stato di Iowa ( $\chi^2=6.12$ ,  $df=1$ ,  $p=0.01$ ) e sono in completo linkage disequilibrium ( $r^2=1$ ) tra loro e con l'allele V della variante p.V274I. Lo SNP rimanente rs642961, si trova tra i due SNP descritti sopra, e mostra una significativa differenza nella distribuzione delle frequenze alleliche ( $\chi^2=4.8$ ,  $df=1$ ,  $p<0.02$ ) e genotipiche ( $\chi^2=6.1$ ,  $df=2$ ,  $p<0.04$ ) tra casi e controlli provenienti dallo stato di Iowa. In contrasto con -14474A>G e -14523G>A, l'allele associato è quello derivato A, mentre l'ancestrale G è altamente conservato all'interno di 12 vertebrati. Lo studio, si è poi successivamente concentrato, su questo polimorfismo, ed è stato portato avanti parallelamente sulla casistica EUROCRAN e sulla casistica dell'università di Iowa.

Da un'analisi dei siti di legame del prodotto di IRF6, è risultato che l'allele di rischio, A potrebbe alterare il sito di legame per AP-2 $\alpha$ , un fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo cranio facciale, questo rende rs642961 un buon candidato per essere la variante eziologica.

Per determinare se rs642961 è associato con le NSCL/P abbiamo calcolato il family-based test TDT nella casistica EUROCRAN. Si è riscontrata una sovra-trasmissione dell'allele A di rischio statisticamente significativa da madre a figlio all'interno della popolazione Olandese. In particolare nei casi di labioschisi con o senza palatoschisi con un livello di significatività  $p\text{-value}=0.002$ ; nei casi di labioschisi isolata  $p\text{-value}=0.010$  e nei casi di labioschisi con o senza palatoschisi, unilaterale  $p\text{-value}=0.026$  e bilaterale  $p\text{-value}=0.034$ .

In accordo con i nostri risultati anche l'università di Iowa ha trovato una sovra-trasmissione da madre a figlio, statisticamente significativa dell'allele A ai probandi in campioni Norvegesi  $p\text{-value}=0.008$ , Danesi  $p\text{-value}=0.004$  e Filippini  $p\text{-value}=0.001$ .

L'analisi degli aplotipi mostra che rs642961 può combinare l'allele per la Valina in due differenti aplotipi V-G e V-A, mentre non si è osservato l'aplotipo I-A (0% nella popolazione Norvegese e 0.2% nella popolazione Filippina), l'allele per l'isoleucina era sempre trasmesso con l'allele G in tutte e tre le popolazioni analizzate. L'aplotipo V-A mostra una forte evidenza di sovra-trasmissione ( $p\text{-value}=3 \times 10^{-9}$ ), mentre l'aplotipo V-G ( $p\text{-value}=0.01$ ) e l'aplotipo I-G ( $p\text{-value}=4 \times 10^{-6}$ ) sono sotto-trasmessi all'interno di tutte e tre le popolazioni. Questo dimostra una forte associazione dell'aplotipo V-A con le schisi orofacciali non sindromiche. Per determinare l'incidenza nella popolazione dell'allele di rischio, rs642961 è stato genotipizzato in due coorti di casi-controlli provenienti da: Danimarca con 107 casi e 495 controlli e Norvegia con 406 casi e 750 controlli. L'allele A è più comune in tutti i casi rispetto ai controlli in entrambi i gruppi. Stratificando gli individui affetti secondo il tipo di schisi la frequenza dell'allele di rischio è risultata significativamente più alta nei casi con labioschisi isolata rispetto ai controlli con un odds ratio di

1.99 (95% CI 1.54-2.57,  $p\text{-value}=3\times 10^{-7}$ ) comparato con gli altri tipi di schisi. La frazione di casi di NSCLO attribuibili all'allele A di rs642961 è del 18% in queste due popolazioni combinate. Inoltre l'allele di rischio mostra un'associazione non significativa con labioschisi con palatoschisi (CLP) (OR=1.23, 95% CI 0.97-1.57,  $p\text{-value}=0.08$ ), e non mostra associazioni con la palatoschisi isolata (CPO) ( $p\text{-value}=0.1$ ). Questo è confermato anche dai dati del nostro studio dove CLP e CPO hanno un  $p\text{-value}$  rispettivamente di 0.2 e 0.5 che non risultano quindi significativi, nemmeno stratificando per sesso, popolazione o valutando l'interazione con fattori ambientali quali fumo di sigaretta e supplementazione in gravidanza con folati; a sottolineare la diversa eziologia delle schisi. Precedentemente numerosi studi combinavano CLO e CLP in un unico gruppo ad eziologia comune. Recentemente evidenze epidemiologiche suggeriscono che CLO può ritenersi separato e in questo studio c'è una chiara separazione del rischio per CLO e CLP basato sui diversi genotipi. Nessuno dei genotipi legati ai polimorfismi studiati mostra un'associazione con un aumento del rischio di palatoschisi isolata, mentre associano in modo significativo con le labioschisi con o senza palatoschisi.

L'analisi dei risultati è stata condotta applicando due diversi approcci tra loro integrativi: il Transmission Disequilibrium Test (TDT) e l'analisi log-lineare.

Il TDT consente di evidenziare distorsioni di segregazione parentale e di poter ipotizzare che queste siano riconducibili ad un ruolo nell'eziologia da parte della variante oggetto d'indagine. Il test, benché sia quello prevalentemente adottato negli studi basati su triadi genitori-figli affetti, ha dei limiti oggettivi: prende informazione solo dai casi con genitore eterozigote, non discerne in modo assoluto il ruolo di un genitore rispetto all'altro, e fornisce solo indicazione di associazione tra condizione e polimorfismo, senza stabilire quale genotipo specifico si associ ad aumentato rischio di sviluppare la patologia.

Dalla'analisi dei dati con questo primo test è risultato che la popolazione Olandese mostra evidenze significative di associazione tra l'allele A derivato del polimorfismo rs642961 che si trova in un blocco in LD con V (allele G) del polimorfismo V274I. In particolare queste evidenze riguardano la labioschisi con o senza palatoschisi, la labioschisi isolata e la labioschisi unilaterale e bilaterale con o senza palatoschisi con valori di significatività rispettivamente di:  $p\text{-value}=0.002$ ;  $p\text{-value}=0.010$ ;  $p\text{-value}=0.026$ ;  $p\text{-value}=0.034$ . Da una successiva stratificazione, è stato poi possibile evidenziare come l'over-trasmissione dell'allele di rischio avvenga, da madre a figlio maschio, sempre nei casi riguardanti i fenotipi di schisi suddetti, con dei valori di significatività rispettivamente di:  $p\text{-value}=0.002$ ;  $p\text{-value}=0.0027$ ;  $p\text{-value}=0.029$ .

L'analisi log-lineare supera ampiamente i limiti oggettivi del TDT. Questo approccio, basato sul calcolo della massima verosimiglianza, utilizza tutte le 15 possibili triadi, traendo informazioni anche dai genitori omozigoti, e considerando anche le triadi con ambedue i genitori eterozigoti. L'analisi log-lineare fornisce valori di rischio relativo (RR) associati a specifici genotipi portati dal figlio affetto o dalla madre. Permette pertanto di valutare estesamente il possibile ruolo del genotipo materno nel condizionare l'ambiente intrauterino e determinare un rischio alterato di sviluppare patologia nell'embrione.

## 6. Bibliografia

Nella popolazione Olandese, probandi con labioschisi isolata mostrano: quando eterozigoti un rischio aumentato di circa 2 volte (RR 1.98; 95% C.I. 1.18-3.34) con un livello di significatività  $p$ -value=0.010 e quando omozigoti di circa 3 volte (RR 2.93; 95% C.I. 1.15-7.43) con un livello di significatività  $p$ -value=0.024.

In particolare figli maschi con labioschisi con o senza palatoschisi mostrano un rischio aumentato di circa 2 volte (RR 2.18; 95% C.I. 1.42-3.35) con un livello di significatività  $p$ -value=0.000. Figli maschi con labioschisi isolata mostrano un rischio aumentato di circa 2 volte (RR 2.17; 95% C.I. 1.12-4.21) con un livello di significatività  $p$ -value=0.022. Figli maschi con labio-palatoschisi isolata mostrano un rischio aumentato di circa 2 volte (RR 2.20; 95% C.I. 1.26-3.85) con un livello di significatività  $p$ -value=0.006.

## 5.4 Primo studio Genome-wide nelle Labio/Palatoschisi: identificati i principali loci di suscettibilità

L'identificazione dei fattori di rischio può procedere anche secondo un approccio genome-wide, che non prevede nessuna ipotesi a priori per le candidature, ma mira a trovare i migliori fattori di rischio genetico associati alla patologia in esame in tutto il genoma. Infatti, è stata condotta per la prima volta, in questo ambito di ricerca, un'analisi genome-wide (GWAS), per individuare nell'intero genoma umano, i loci di maggiore associazione con il fenotipo clinico di Labio/Palatoschisi Non Sindromiche (NS-CL/P). L'analisi è stata realizzata grazie alla tecnologia Illumina, secondo un modello caso-controllo. Il campione analizzato proviene interamente dal nord Europa.

Com'è possibile notare dal Manhattan Plot (Figura 4.1.1) sono vari i loci di associazione con il fenotipo clinico studiato, ma la migliore associazione è presente a livello del cromosoma 8 al locus genico 8q24.21, una regione mai predetta prima in associazione con le Labio/Palatoschisi.

Per ciascun cromosoma, sono stati studiati un certo numero di SNPs, con lo scopo di fornire una copertura quanto più possibile completa dell'intera regione cromosomica. La sensibilità di copertura, e quindi il numero di SNPs studiati, dipendono dalle potenzialità del singolo studio e viene solitamente identificata in base agli aggiornamenti del progetto HapMap che aumenta continuamente il numero di Tag-SNPs disponibili. Nello studio di Birnbaum e in quello di Grant nel 2009 il numero totale di SNPs studiati con tecnologia Illumina Infinium II, è HumanHap550, questo chip contiene 561466 SNPs. Il picco di associazione identifica una regione di circa 640 kb nella quale il marker con associazione maggiore è risultato essere lo SNP rs987525 A>C, con un valore di significatività  $p$ -value di  $3.41 \times 10^{-10}$ .

Per definire meglio la regione di forte associazione di 640 kb sono stati studiati al suo interno 125 SNPs, secondo un modello caso controllo, ma in un campione esteso rispetto al precedente; confermando lo SNP rs987525 A>C, con un valore di significatività  $p$ -value di  $3.34 \times 10^{-24}$ .

Questo nuovo polimorfismo identificato, rs987525, è uno SNP biallelico, con allele ancestrale A ed allele variante C, la frequenza dei due alleli nelle diverse popolazioni è molto variabile, infatti la

popolazione Africana mostra una prevalenza dell'allele ancestrale, quella Amerinda dell'allele variante e quella Europea mostra delle frequenze più eterogenee. Il polimorfismo rs987525 cade in una regione di non conservazione, l'allele A ancestrale è l'unico presente nelle specie e solo nell'uomo compare il variante C. La regione di forte associazione di 640 kb, in cui è localizzato rs987525 è una regione cosiddetta di deserto genico, per questo non è stato possibile ascrivere il polimorfismo ad un gene conosciuto, come, invece, è stato fatto per gli altri polimorfismi studiati. I primi geni che si trovano nell'intorno del polimorfismo rs987525 sono, PVT1 a 900 kb upstream e GSDMC a 800 kb downstream, distanze troppo elevate per poter considerare lo SNPs come funzionale in uno dei due geni.

Per confermare il risultato di forte associazione ottenuto, in un campione indipendente, abbiamo quindi replicato la genotipizzazione per rs987525 secondo un modello a triadi, in 866 famiglie provenienti dall'Europa centrale. L'associazione tra l'allele ancestrale A e le Labio/palatoschisi è stata effettivamente riconfermata. In conclusione questo studio ha applicato con successo per la prima volta l'analisi genome-wide allo studio delle Labio/Palatoschisi non sindromiche portando all'identificazione di un nuovo locus di associazione, mai predetto prima sul cromosoma 8q24.21, dove è localizzato lo SNP rs987525 (Birnbaum et al., 2009 e Grant et al., 2009).

Successivamente abbiamo voluto meglio caratterizzare quei loci di associazione ottenuti con l'analisi genome wide che avevano alti valori di significatività (p-value), ma minore rispetto al locus genico 8q24.21.

E' stato quindi condotto uno studio di replicazione dei risultati di associazione dei loci identificati dall'analisi genome-wide, in cui sono stati inclusi altri loci, che dalla letteratura sono considerati buoni candidati per essere implicati nell'eziologia delle NSCL/P per un totale di 64 SNPs. Questi markers sono stati genotipizzati con tecnologia SEQUENOM sia nel campione Centro-Europeo che nella casistica EUROCRAN, composta da 866 triadi. Da questa analisi, 5 loci genici tutti predetti dell'analisi genome wide sono stati riconfermati associati.

Il primo è rs227731, al locus 17q22, nelle vicinanze si trova il gene NOG che traduce per un antagonista dei fattori di crescita della famiglia TGF $\alpha$ , che sono stati dimostrati essere coinvolti nella palatogenesi dei mammiferi e si ritengono associati alle schisi nell'uomo.

Il secondo è rs7078160 al locus 10q25.3, dove, nella regione telomerica, vi è il gene VAX1, che è coinvolto nello sviluppo craniofacciale nel modello murino; mutazioni in questo gene possono provocare schisi del palato.

Il terzo è rs1258763 al locus 15q14, dove è presente il gene GREM1, che traduce per un altro antagonista della famiglia dei fattori di crescita TGF $\beta$ , nonché di BMP4.

Il quarto è rs9574565 al locus 13q31.1, dove il gene più vicino è SPRY2, che è coinvolto nello sviluppo del palato nel modello murino, secondo un modello dose dipendente; difetti craniofacciali derivano, infatti, da un over-espressione della proteina prodotta da questo gene sempre nel modello murino.

Il quinto ed ultimo è rs7590268 al locus 2p21 in cui è localizzato uno SNP, che cade nell'introne 31 del gene THADA, che si pensa essere coinvolto nel pathway apoptotico come recettore di morte.

## 6. Bibliografia

In conclusione sono stati riconfermati associati a palatoschisi non sindromiche 5 nuovi loci, secondi ad 8q24.21, di cui uno con evidenze più significative degli altri, NOG, che si può ritenere un promettente gene candidato (Mangold et al., 2009).

Le labioschisi non sindromiche sono un difetto congenito complesso, per questo motivo il primo passo nella comprensione della loro eziologia consiste nell'individuare i migliori geni candidati ad esse associati. Noi abbiamo intrapreso entrambi gli approcci di analisi genome-wide e del gene candidato, per avere un quadro quanto più completo possibile di quelli che sono i possibili loci di associazione. E' verosimile che più varianti concorrano insieme alla determinazione dello stesso fenotipo, è necessario quindi esplorare e risolvere le interazioni delle varianti dei geni e dei fattori di rischio ambientali.

Lo studio, si è poi successivamente concentrato, sui cinque nuovi polimorfismi di interesse sulla casistica EUROCRAN composta da triadi di genitori biologici e figli affetti da NSOFC. In aggiunta a questi polimorfismi, sono stati studiati il locus di associazione 8q24.21 risultato dall'analisi genome-wide e il polimorfismo rs642961 del gene IRF6 per cui esistono evidenze significative di un ruolo nell'eziologia delle schisi ampiamente documentato in letteratura (Rahimov et al., 2008).

Dall'analisi TDT, si è riscontrata una sovra-trasmissione dell'allele di rischio, cioè dell'allele trovato in associazione con il fenotipo di schisi per cinque dei sette loci studiati, in particolare i due polimorfismi dei geni THADA e VAX non hanno mostrato evidenze statisticamente significative di uno sbilanciamento di trasmissione allelica.

In particolare, i polimorfismi dei geni NOG, SPRY2, GREM1 e del locus genico 8q24.21 hanno mostrato forti evidenze di over-trasmissione dell'allele di rischio in associazione, in particolare, al fenotipo di Labioschisi con Palatoschisi, e tutti tranne il locus 8q24.21 hanno mostrato dei rischi relativi aumentati in associazione a tale fenotipo per il genotipo omozigote per l'allele di rischio per il genotipo del probando, descrivendo un modello d'azione recessivo. In particolare il gene NOG con genotipo CC ha un RR=2.08 con un livello di significatività p-value=0.001 (C.I. 95% 1.33-3.26); il gene SPRY2 con genotipo CC ha un RR=2.19 con un livello di significatività p-value=0.013 (C.I. 95% 1.18-4.06) e il gene GREM1 con genotipo AA ha un RR=2.06 con un livello di significatività p-value=0.011 (C.I. 95% 1.18-3.59). Il locus 8q24.21 ha mostrato un modello d'azione del polimorfismo dominante, in presenza dell'allele A, quindi si ha un RR=1.72 con un livello di significatività p-value=0.000 (C.I. 95% 1.34-2.21). Il polimorfismo del gene IRF6 invece, come dalla letteratura, ha mostrato evidenze di associazione di rischio relativi aumentato con il fenotipo di labioschisi, secondo un modello dominante, con un RR=2.38 con un livello di significatività p-value=0.009 (C.I. 95% 1.24-4.56). Precedentemente numerosi studi combinavano CLO e CLP in un unico gruppo ad eziologia comune. Recentemente evidenze epidemiologiche suggeriscono che CLO può ritenersi separato e in questo studio c'è una chiara separazione del rischio per CLO e CLP basato sui diversi genotipi. Nessuno dei genotipi legati ai polimorfismi studiati mostra un'associazione con un aumento del rischio di palatoschisi isolata, mentre associano in modo significativo con le labioschisi con o senza palatoschisi.

Inoltre dall'analisi GEI log-lineare, il polimorfismo del gene NOG ha dato il più importante risultato, una prima forte evidenza di interazione gene-ambiente, tra il polimorfismo rs227731 e il fumo di sigaretta da parte della madre in gravidanza. Vi è infatti una forte associazione tra il genotipo omozigote CC, dove C è l'allele di rischio per il polimorfismo rs227731 del gene NOG, associato al fenotipo di Labio/Palatoschisi nei probandi esposti al fumo.

<b>CL/P</b>	<b>S</b>	<b>2.97</b>	(	1.91	-	4.63	)	p =	0.000	<b>chi<sup>2</sup>( 1) = 13.00</b> <b>Prob &gt; chi<sup>2</sup> = 0.0003</b>
	<b>noS</b>	<b>1.16</b>	(	0.88	-	1.52	)	p =	0.299	

Il rischio di schisi negli esposti al fumo è di 3 volte superiore a quello attribuibile ai non esposti, che non supera in modo significativo il valore soglia 1 che indica l'assenza di rischio. Il rischio negli esposti è di conseguenza statisticamente significativo e diverso da quello nei non esposti, sui quali la componente genetica sembra non avere effetto, il  $\chi^2=13.00$  con un valore di significatività p-value=0.0003. Il risultato si mantiene particolarmente significativo nel fenotipo di Labioschisi con Palatoschisi.

<b>CLP</b>	<b>S</b>	<b>3.29</b>	(	1.93	-	5.62	)	p =	0.000	<b>chi<sup>2</sup>( 1) = 10.83</b> <b>Prob &gt; chi<sup>2</sup> = 0.0010</b>
	<b>noS</b>	<b>1.15</b>	(	0.81	-	1.63	)	p =	0.443	

Il rischio di schisi negli esposti al fumo si mantiene di 3 volte superiore a quello dei non esposti ed è statisticamente significativo e diverso da quello attribuibile ai non esposti, sui quali la componente genetica sembra non avere effetto, il  $\chi^2=10.83$  con un valore di significatività p-value=0.0010.

L'importanza di questo risultato sta nel fatto che per la prima volta si ha un'interazione forte tra un gene ed un fattore ambientale, questo colloca il gene NOG in un pathway come con il fumo di sigaretta che insieme formano una componente eziologica di rischio.

## 5.5 Identificata la prima interazione epistatica alla base dell'eziologia delle Labio/Palatoschisi

Per indagare l'epistasi tra vari fattori viene impiegato il metodo statistico MDR, Multifactor dimensionality reduction. Nel nostro studio si è voluto applicare MDR in modo razionale per valutare la possibile riconferma dei risultati già osservati. Durante le precedenti analisi è emerso chiaramente che i polimorfismi studiati mostrano evidenze di associazione solamente con i fenotipi di Labio/Palatoschisi e mai con quello di Palatoschisi isolata, eccetto per il gene FAF1. Inoltre è stato evidenziato che per molti dei polimorfismi studiati l'esposizione al fumo di sigaretta, risulta associato ad un aumento del rischio relativo. Per questo, nell'approccio razionale l'analisi d'interazione si è concentrata da subito sui probandi con Labio/Palatoschisi.

Come risultato importante da questa prima analisi d'interazione si nota come il polimorfismo del gene NOG sia il più fortemente associato al fumo di sigaretta, come già precedentemente dimostrato dall'analisi log-lineare dei rischi relativi.

Il gene NOG codifica per un antagonista di fattori di crescita della famiglia TGF $\beta$ , e questa evidenza si colloca in accordo con quanto recentemente pubblicato da Guo et al. (2010), che documentano una associazione tra TGFB3 e il fumo durante la gravidanza.

Nella casistica con Labio/Palatoschisi l'analisi MDR mette in osserva una straordinaria interazione tra i polimorfismi di SPRY2 e di GREM1, evidente soprattutto quando viene eliminato l'effetto del gene NOG.

	controls	cases	Odds Ratio	C.I. 95%		p-value
CEU	100	1	63.75	8.62	471.45	0.000000000000032
ECRN	80	51				

La combinazione genotipica ad alto rischio per le schisi è data dalla contemporanea presenza del genotipo omozigote per l'allele di rischio ad entrambe i loci.

**GREM1 rs1258763 G>A**

		GG	GA	AA
<b>SPRY2 rs9574565 T&gt;C</b>	TT	GG TT	GA TT	AA TT
	TC	GG TC	GA TC	AA TC
	CC	GG CC	GA CC	AA CC

Calcolando il test esatto di Fisher si ottiene un valore di significatività p-value=0.0000009.

Infine, per attribuire un valore di rischio al genotipo doppio omozigote per gli alleli di rischio per entrambi i polimorfismi dei geni SPRY2 e GREM1 ed una significatività a questa condizione si è calcolato l'odds ratio dal confronto tra il numero medio di casi, con detta combinazione genotipica nella popolazione Europea di riferimento, che rappresentano i controlli, in quanto non sono affetti da schisi, e il numero di casi con la medesima combinazione nella casistica campionata dal nostro studio.

Il risultato è un odds ratio di 63.75 con un livello di significatività estremamente elevato (vedi tabella sottostante) che conferisce un ruolo fondamentale a questa combinazione di rischio genotipica nell'eziologia delle Labio/Palatoschisi.



## 5.6 Conclusioni

Il presente studio ha portato ad ulteriori conoscenze su uno dei maggiori geni candidati delle palatoschisi non sindromiche, una condizione malformativa congenita per la quale le componenti eziologiche sono essenzialmente sconosciute. È stato trovato nell'introne 18 del gene FAF1 uno SNP funzionale, rs3827730, infatti, quando è presente l'allele ancestrale (T), nel genotipo del figlio, aumenta il rischio di sviluppo di palatoschisi non sindromica.

La palatoschisi isolata CPO ha un'eziologia diversa rispetto alle varie forme fenotipiche di labioschisi con o senza palatoschisi CL/P, quindi, mediante diversi approcci, sono stati individuati i loci di maggiore suscettibilità anche per quest'ultimo tipo di schisi.

Iniziando con l'approccio del gene candidato, è stato trovato nella regione del gene IRF6 un enhancer contenente lo SNP funzionale rs642961, in cui l'allele A di rischio è in grado di interrompere il sito di legame per il fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$

L'identificazione dei fattori di rischio può procedere anche secondo un approccio genome-wide, che non prevede nessuna ipotesi a priori per le candidature, ma mira a trovare i migliori fattori di rischio genetico associati alla patologia in esame, in tutto il genoma. Per la prima volta è stata condotta, in questo ambito di ricerca, un'analisi genome-wide (GWAS), che ha portato alla luce diversi loci di associazione con il fenotipo clinico di Labio/Palatoschisi Non Sindromiche (NS-CL/P). La migliore associazione è presente a livello del cromosoma 8 al locus genico 8q24.21 e altri come il locus 17q22, il locus 10q25.3, il locus 15q14, il locus 13q31.1 e il locus 2p21, riconfermata anche l'associazione del polimorfismo rs642961 del gene IRF6.

Nelle vicinanze del rs227731 (locus 17q22) si trova il gene NOG, che traduce per un antagonista dei fattori di crescita della famiglia TGF $\beta$ , coinvolti nella palatogenesi dei mammiferi e si ritengono associati alle schisi nell'uomo. Nella regione telomerica al locus 10q25.3 (rs7078160) vi è il gene VAX1, che è coinvolto nello sviluppo craniofacciale nel modello murino; mutazioni in questo gene possono provocare schisi del palato. Il gene GREM1 invece è presente nei pressi dell'rs1258763 al locus 15q14, e traduce per un altro antagonista della famiglia dei fattori di crescita TGF $\beta$ , nonché di BMP4. Il gene più vicino all'rs9574565, al locus 13q31.1, è SPRY2 coinvolto nello sviluppo del palato nel modello murino, secondo un modello dose dipendente; difetti craniofacciali derivano, infatti, da un'over-espressione della proteina prodotta da questo gene sempre nel modello murino. Infine l'rs7590268, al locus 2p21, che cade nell'introne 31 del gene THADA, che si pensa essere coinvolto nel pathway apoptotico come recettore di morte.

In conclusione sono stati riconfermati associati a palatoschisi non sindromiche 5 nuovi loci, secondi ad 8q24.21, di cui uno con evidenze più significative degli altri, NOG, che si può ritenere un promettente gene candidato (Mangold et al., 2009).

Data la natura multifattoriale di tale patologia si è ritenuto opportuno indagare anche eventuali interazioni epistatiche e gene ambiente. In particolare il polimorfismo del gene NOG è risultato fortemente associato al fumo di sigaretta in caso di Labio/Palatoschisi, confermando che

l'interazione tra il TGFB3-pathway ed il fumo in gravidanza costituisce una importante componente eziologica delle Labio/Palatoschisi.

Infine è stata identificata la prima interazione gene-gene associata alle Labio/Palatoschisi: varianti comuni in SPRY2 e GREM1 interagiscono in modo moltiplicativo e la loro relazione epistatica costituisce un fattore di rischio per Labio/Palatoschisi estremamente rilevante.

I risultati di questa ricerca pongono le basi per la completa identificazione del network di interazioni alla base dell'eziologia delle Labio/Palatoschisi, fornendo importanti informazioni che potranno avere applicazione in sede di consulenza genetica e di miglioramento delle strategie di prevenzione primaria.

## 6. Bibliografia

---

## 6. Bibliografia

---

## 6. Bibliografia

Adams MM, Mulinare J, Dooley K. Risk factors for conotruncal cardiac defects in Atlanta. *J Am Coll Cardiol.* 1989 Aug;14(2):432-42. PubMed PMID: 2787814.

Adham IM, Khulan J, Held T, Schmidt B, Meyer BI, Meinhardt A, Engel W. Fas-associated factor (FAF1) is required for the early cleavage-stages of mouse embryo. *Mol Hum Reprod.* 2008 Apr;14(4):207-13. Epub 2008 Feb 26. PubMed PMID: 18303090.

Andrews J, McGarry JM. A community study of smoking in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1972 Dec;79(12):1057-73. PubMed PMID: 4646562.

Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet.* 1989 Sep;45(3):348-53. PubMed PMID: 2570526; PubMed Central PMCID: PMC1683414.

Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, Daack-Hirsch S, Romitti PA, Murray JC. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet A.* 2006 Dec 1;140(23):2562-70. PubMed PMID: 17089422; PubMed Central PMCID: PMC1885468.

Bartolozzi G., Guglielmelli M.; *Pediatria. Principi e pratica clinica.* ELSEVIER MASSON Terza edizione

Bille C, Winther JF, Bautz A, Murray JC, Olsen J, Christensen K. Cancer risk in persons with oral cleft--a population-based study of 8,093 cases. *Am J Epidemiol.* 2005 Jun 1;161(11):1047-55. PubMed PMID: 15901625; PubMed Central PMCID: PMC2839121.

Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, Baluardo C, Ferrian M, Almeida de Assis N, Alblas MA, Barth S, Freudenberg J, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Braumann B, Bergé SJ, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Pötzsch S, Steegers-Theunissen RP, Pötzsch B, Moebus S, Horsthemke B, Kramer FJ, Wienker TF, Mossey PA, Propping P, Cichon S, Hoffmann P, Knapp M, Nöthen MM, Mangold E. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009 Apr;41(4):473-7. Epub 2009 Mar 8. PubMed PMID: 19270707.

Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000 May 1;151(9):862-77. Review. PubMed PMID: 10791559.

Boyles AL, DeRoo LA, Lie RT, Taylor JA, Jugessur A, Murray JC, Wilcox AJ. Maternal alcohol consumption, alcohol metabolism genes, and the risk of oral clefts: a population-based case-control study in Norway, 1996-2001. *Am J Epidemiol.* 2010 Oct 15;172(8):924-31. Epub 2010 Sep 1. PubMed PMID: 20810466; PubMed Central PMCID: PMC2984244.

Brosch S, Baur M, Blin N, Reinert S, Pfister M. A novel IRF6 nonsense mutation (Y67X) in a German family with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med.* 2007 Jul;20(1):85-9. PubMed PMID: 17549393.

Castilla EE, Lopez-Camelo JS, Campaña H. Altitude as a risk factor for congenital anomalies. *Am J Med Genet.* 1999 Sep 3;86(1):9-14. PubMed PMID: 10440822

Chen ML, Chang CH, Yu CH, Cheng YC, Chang FM. Prenatal diagnosis of cleft palate by three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2001 Aug;27(8):1017-23. PubMed PMID: 11527587.

Cho YM, Ritchie MD, Moore JH, Park JY, Lee KU, Shin HD, Lee HK, Park KS. Multifactor-dimensionality reduction shows a two-locus interaction associated with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2004 Mar;47(3):549-54. Epub 2004 Jan 17. PubMed PMID: 14730379.

Cobourne MT. The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod.* 2004 Feb;26(1):7-16. Review. PubMed PMID: 14994877.

## 6. Bibliografia

Cocozza S. e Vaccaro O. Interazione geni-ambiente in relazione al rischio cardiovascolare. Grandangolo in Diabetologia vol 6: Geni, stile di vita e rischio cardiovascolare. 2005: 7-15

Cohen MM Jr. Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. *Am J Med Genet.* 2002 Dec 30;115(4):245-68. Review. PubMed PMID: 12503119.

Czeizel AE, Rockenbauer M. Population-based case-control study of teratogenic potential of corticosteroids. *Teratology.* 1997 Nov;56(5):335-40. PubMed PMID: 9451758.

Ding H, Wu X, Boström H, Kim I, Wong N, Tsoi B, O'Rourke M, Koh GY, Soriano P, Betsholtz C, Hart TC, Marazita ML, Field LL, Tam PP, Nagy A. A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR-alpha signaling. *Nat Genet.* 2004 Oct;36(10):1111-6. Epub 2004 Sep 7. PubMed PMID: 15361870.

Dravet C, Julian C, Legras C, Magaouda A, Guerrini R, Genton P, Soulayrol S, Giraud N, Mesdjian E, Trentin G, et al. Epilepsy, antiepileptic drugs, and malformations in children of women with epilepsy: a French prospective cohort study. *Neurology.* 1992 Apr;42(4 Suppl 5):75-82. PubMed PMID: 1574181.

Drieschner N, Kerschling S, Soller JT, Rippe V, Belge G, Bullerdiek J, Nimzyk R. A domain of the thyroid adenoma associated gene (THADA) conserved in vertebrates becomes destroyed by chromosomal rearrangements observed in thyroid adenomas. *Gene.* 2007 Nov 15;403(1-2):110-7. Epub 2007 Aug 7. PubMed PMID: 17889454.

Du XY, Tang W, Tian WD, Li XY, Liu L, Zheng XH. [Identification of three novel mutations of IRF6 in Chinese families with Van der Woude syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2006 Feb;23(1):82-3. Chinese. PubMed PMID: 16456794.

Dudas M, Li WY, Kim J, Yang A, Kaartinen V. Palatal fusion - where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect. *Acta Histochem.* 2007;109(1):1-14. Epub 2006 Sep 7. Review. PubMed PMID: 16962647.

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struewing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R; SEARCH collaborators, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajrang S, Gaborieau V, Odefrey F, Shen CY, Wu PE, Wang HC, Eccles D, Evans DG, Peto J, Fletcher O, Johnson N, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Chenevix-Trench G, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Garcia-Closas M, Brinton L, Chanock S, Lissowska J, Peplonska B, Nevanlinna H, Fagerholm R, Eerola H, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Hunter DJ, Hankinson SE, Cox DG, Hall P, Wedren S, Liu J, Low YL, Bogdanova N, Schürmann P, Dörk T, Tollenaar RA, Jacobi CE, Devilee P, Klijn JG, Sigurdson AJ, Doody MM, Alexander BH, Zhang J, Cox A, Brock IW, MacPherson G, Reed MW, Couch FJ, Goode EL, Olson JE, Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Uitterlinden A, Rivadeneira F, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Hopper JL, McCredie M, Southey M, Giles GG, Schroen C, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko YD, Spurdle AB, Beesley J, Chen X; kConFab; AOCs Management Group, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Hartikainen J, Day NE, Cox DR, Ponder BA. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature.* 2007 Jun 28;447(7148):1087-93. PubMed PMID: 17529967; PubMed Central PMCID: PMC2714974.

Eberhart JK, He X, Swartz ME, Yan YL, Song H, Boling TC, Kunerth AK, Walker MB, Kimmel CB, Postlethwait JH. MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis. *Nat Genet.* 2008 Mar;40(3):290-8. Epub 2008 Feb 10. PubMed PMID: 18264099; PubMed Central PMCID: PMC2747601.

Elsahy NI. The modified striped Y--a systematic classification for cleft lip and palate. *Cleft Palate J.* 1973 Jul;10:247-50. PubMed PMID: 4513914.

- Finnel RH, Bielec B, Nau H,(1997). Anticonvulsivant drugs: mechanism and pathogenesis of teratogenicity. In: Kavlok RJ, Daston GP, eds Drug toxicity of birth defects: mechanistic understanding of human development toxicants. Handbook of experimental pharmacology 124 II, 121-59.
- Fraser FC, Sajoo A. Teratogenic potential of corticosteroids in humans. *Teratology*. 1995 Jan;51(1):45-6. Review. PubMed PMID: 7597656.
- Frebourg T, Oliveira C, Hochain P, Karam R, Manouvrier S, Graziadio C, Vekemans M, Hartmann A, Baert-Desurmont S, Alexandre C, Lejeune Dumoulin S, Marroni C, Martin C, Castedo S, Lovett M, Winston J, Machado JC, Attié T, Jabs EW, Cai J, Pellerin P, Triboulet JP, Scotte M, Le Pessot F, Hedouin A, Carneiro F, Blayau M, Seruca R. Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Med Genet*. 2006 Feb;43(2):138-42. Epub 2005 Apr 14. PubMed PMID: 15831593; PubMed Central PMCID: PMC2564630.
- Friedman HI, Sayetta RB, Coston GN, Hussey JR. Symbolic representation of cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 1991 Jul;28(3):252-9; discussion 259-60. Review. PubMed PMID: 1911812.
- Furlan S. *Chirurgia plastica ricostruttiva ed estetica. Trattato di tecnica chirurgica*. 2003. Vol. XVII/1. Piccin.
- Gaspar DA, Matioli SR, de Cássia Pavanello R, Araújo BC, Alonso N, Wyszynski D, Passos-Bueno MR. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Hum Genet*. 2004 Jul;12(7):521-6. PubMed PMID: 15054400.
- Gaspar DA, Matioli SR, de Cássia Pavanello R, Araújo BC, Alonso N, Wyszynski D, Passos-Bueno MR. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Hum Genet*. 2004 Jul;12(7):521-6. PubMed PMID: 15054400.
- Ghassibe-Sabbagh M, Desmyter L, Langenberg T, Claes F, Boute O, Bayet B, Pellerin P, Hermans K, Backx L, Mansilla MA, Imoehl S, Nowak S, Ludwig KU, Baluardo C, Ferrian M, Mossey PA, Noethen M, Dewerchin M, François G, Revencu N, Vanwijck R, Hecht J, Mangold E, Murray J, Rubini M, Vermeesch JR, Poirel HA, Carmeliet P, Vikkula M. FAF1, a Gene that Is Disrupted in Cleft Palate and Has Conserved Function in Zebrafish. *Am J Hum Genet*. 2011 Feb 2. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21295280.
- Ghassibé M, Revencu N, Bayet B, Gillerot Y, Vanwijck R, Verellen-Dumoulin C, Vikkula M. Six families with van der Woude and/or popliteal pterygium syndrome: all with a mutation in the IRF6 gene. *J Med Genet*. 2004 Feb;41(2):e15. PubMed PMID: 14757865; PubMed Central PMCID: PMC1735675.
- Goodnough LH, Brugmann SA, Hu D, Helms JA. Stage-dependent craniofacial defects resulting from Sprouty2 overexpression. *Dev Dyn*. 2007 Jul;236(7):1918-28. PubMed PMID: 17576140.
- Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE, Bradfield JP, Glessner JT, Thomas KA, Garris M, Frackelton EC, Otieno FG, Chiavacci RM, Nah HD, Kirschner RE, Hakonarson H. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr*. 2009 Dec;155(6):909-13. Epub 2009 Aug 4. PubMed PMID: 19656524.
- Guo Z, Huang C, Ding K, Lin J, Gong B. Transforming growth factor beta-3 and environmental factors and cleft lip with/without cleft palate. *DNA Cell Biol*. 2010 Jul;29(7):375-80. PubMed PMID: 20408761.



## 6. Bibliografia

Hallonet M, Hollemann T, Pieler T, Gruss P. Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev.* 1999 Dec 1;13(23):3106-14. PubMed PMID: 10601036; PubMed Central PMCID: PMC317183.

He F, Xiong W, Wang Y, Matsui M, Yu X, Chai Y, Klingensmith J, Chen Y. Modulation of BMP signaling by Noggin is required for the maintenance of palatal epithelial integrity during palatogenesis. *Dev Biol.* 2010 Nov 1;347(1):109-21. Epub 2010 Aug 19. PubMed PMID: 20727875; PubMed Central PMCID: PMC3010875.

Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med.* 2000 Nov 30;343(22):1608-14. PubMed PMID: 11096168.

Honein MA, Rasmussen SA, Reefhuis J, Romitti PA, Lammer EJ, Sun L, Correa A. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology.* 2007 Mar;18(2):226-33. PubMed PMID: 17202867.

Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, Wacholder S, Wang Z, Welch R, Hutchinson A, Wang J, Yu K, Chatterjee N, Orr N, Willett WC, Colditz GA, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Hayes RB, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF Jr, Hoover RN, Thomas G, Chanock SJ. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7):870-4. Epub 2007 May 27. PubMed PMID: 17529973.

Item CB, Turhani D, Thurnher D, Yerit K, Sinko K, Wittwer G, Adeyemo WL, Frei K, Erginel-Unaltuna N, Watzinger F, Ewers R. Van Der Woude syndrome: variable penetrance of a novel mutation (p.Arg 84Gly) of the IRF6 gene in a Turkish family. *Int J Mol Med.* 2005 Feb;15(2):247-51. PubMed PMID: 15647839.

Jacobsson C, Granström G. Effects of vitamin B6 on beta-aminopropionitrile-induced palatal cleft formation in the rat. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997 Mar;34(2):95-100. PubMed PMID: 9138515.

Jang JH, Shin KH, Park JG. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3541-3. PubMed PMID: 11325814.

Jezevski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2003 Jun;40(6):399-407. PubMed PMID: 12807959; PubMed Central PMCID: PMC1735501.

Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008 Oct;37(5):1041-58. Epub 2008 Jun 26. Review. PubMed PMID: 18583393.

Johnson DD, Pretorius DH, Budorick NE, Jones MC, Lou KV, James GM, Nelson TR. Fetal lip and primary palate: three-dimensional versus two-dimensional US. *Radiology.* 2000 Oct;217(1):236-9. PubMed PMID: 11012450

Johnston MC, Millicovsky G. Normal and abnormal development of the lip and palate. *Clin Plast Surg.* 1985 Oct;12(4):521-32. PubMed PMID: 4064473.

Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 2009 Oct;15(7):437-53. Epub 2009 Jul 2. Review. PubMed PMID: 19583827.

- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm F. Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol.* 2003 Apr;24(3):230-9. PubMed PMID: 12652527.
- Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Jun;15(3):270-8. Review. PubMed PMID: 15917202; PubMed Central PMCID: PMC2442458.
- Källén K. Maternal smoking and orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997 Jan;34(1):11-6. PubMed PMID: 9003906.
- Kayano S, Kure S, Suzuki Y, Kanno K, Aoki Y, Kondo S, Schutte BC, Murray JC, Yamada A, Matsubara Y. Novel IRF6 mutations in Japanese patients with Van der Woude syndrome: two missense mutations (R45Q and P396S) and a 17-kb deletion. *J Hum Genet.* 2003;48(12):622-8. Epub 2003 Nov 15. PubMed PMID: 14618417.
- Kernahan DA. The striped Y--a symbolic classification for cleft lip and palate. *Plast Reconstr Surg.* 1971 May;47(5):469-70. PubMed PMID: 5574216.
- Kim Y, Park JY, Lee TJ, Yoo HW. Identification of two novel mutations of IRF6 in Korean families affected with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med.* 2003 Oct;12(4):465-8. PubMed PMID: 12964020.
- Kirschner RE, LaRossa D. Cleft lip and palate. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000 Dec;33(6):1191-215, v-vi. Review. PubMed PMID: 11449783.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Lammer EJ, Aylsworth AS, Ardinger HH, Lidral AC, Pober BR, Moreno L, Arcos-Burgos M, Valencia C, Houdayer C, Bahuau M, Moretti-Ferreira D, Richieri-Costa A, Dixon MJ, Murray JC. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.* 2002 Oct;32(2):285-9. Epub 2002 Sep 3. PubMed PMID: 12219090.
- Krapels IP, van Rooij IA, Ocké MC, van Cleef BA, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP. Maternal dietary B vitamin intake, other than folate, and the association with orofacial cleft in the offspring. *Eur J Nutr.* 2004 Feb;43(1):7-14. Epub 2004 Jan 6. PubMed PMID: 14991264.
- Kullander S, Källén B, Sandahl B. Exposure to drugs and other possibly harmful factors during the first trimester of pregnancy. Comparison of two prospective studies performed in Sweden 10 years apart. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1976;55(5):395-405. PubMed PMID: 11632.
- Lambie DG, Johnson RH. Drugs and folate metabolism. *Drugs.* 1985 Aug;30(2):145-55. Review. PubMed PMID: 3896745.
- Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet.* 2004 May;74(5):1043-50. Epub 2004 Mar 23. PubMed PMID: 15042511; PubMed Central PMCID: PMC1181967.
- Laumon B, Martin JL, Collet P, Bertucat I, Verney MP, Robert E. Exposure to organic solvents during pregnancy and oral clefts: a case-control study. *Reprod Toxicol.* 1996 Jan-Feb;10(1):15-9. Erratum in: *Reprod Toxicol* 1996 May-Jun;10(3):vi. PubMed PMID: 8998380.
- Lee A, Deutinger J, Bernaschek G. Three dimensional ultrasound: abnormalities of the fetal face in surface and volume rendering mode. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995 Apr;102(4):302-6. PubMed PMID: 7612513.

## 6. Bibliografia

Lee W, Kirk JS, Shaheen KW, Romero R, Hodges AN, Comstock CH. Fetal cleft lip and palate detection by three-dimensional ultrasonography. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000 Sep;16(4):314-20. PubMed PMID: 11169306.

Lemoine P, Lemoine P. [Outcome of children of alcoholic mothers (study of 105 cases followed to adult age) and various prophylactic findings]. *Ann Pediatr (Paris).* 1992 Apr;39(4):226-35. French. PubMed PMID: 1616236.

Leoyklang P, Siriwan P, Shotelersuk V. A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip. *J Med Genet.* 2006 Jun;43(6):e28. PubMed PMID: 16740912; PubMed Central PMCID: PMC2564545.

Lidral AC, Moreno LM. Progress toward discerning the genetics of cleft lip. *Curr Opin Pediatr.* 2005 Dec;17(6):731-9. Review. PubMed PMID: 16282779; PubMed Central PMCID: PMC2752353.

Little J, Cardy A, Arslan MT, Gilmour M, Mossey PA; United Kingdom-based case-control study. Smoking and orofacial clefts: a United Kingdom-based case-control study. *Cleft Palate Craniofac J.* 2004 Jul;41(4):381-6. PubMed PMID: 15222794.

Liu W, Sun X, Braut A, Mishina Y, Behringer RR, Mina M, Martin JF. Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. *Development.* 2005 Mar;132(6):1453-61. Epub 2005 Feb 16. PubMed PMID: 15716346.

Lorente C, Cordier S, Goujard J, Aymé S, Bianchi F, Calzolari E, De Walle HE, Knill-Jones R. Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Am J Public Health.* 2000 Mar;90(3):415-9. PubMed PMID: 10705862; PubMed Central PMCID: PMC1446183.

Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S, Reutter H, de Assis NA, Chawa TA, Mattheisen M, Steffens M, Barth S, Kluck N, Paul A, Becker J, Lauster C, Schmidt G, Braumann B, Scheer M, Reich RH, Hemprich A, Pötzsch S, Blaumeiser B, Moebus S, Krawczak M, Schreiber S, Meitinger T, Wichmann HE, Steegers-Theunissen RP, Kramer FJ, Cichon S, Propping P, Wienker TF, Knapp M, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Nöthen MM. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet.* 2010 Jan;42(1):24-6. Epub 2009 Dec 20. PubMed PMID: 20023658.

Mansilla MA, Cooper ME, Goldstein T, Castilla EE, Lopez Camelo JS, Marazita ML, Murray JC. Contributions of PTCH gene variants to isolated cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006 Jan;43(1):21-9. PubMed PMID: 16405370; PubMed Central PMCID: PMC2151847.

Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Govil M, Daack-Hirsch S, Riley B, Jugessur A, Felix T, Morene L, Mansilla MA, Vieira AR, Doheny K, Pugh E, Valencia-Ramirez C, Arcos-Burgos M. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009;68(3):151-70. Epub 2009 Jun 11. PubMed PMID: 19521098; PubMed Central PMCID: PMC2709160.

Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T, Maher BS, Daack-Hirsch S, Schultz R, Mansilla MA, Field LL, Liu YE, Prescott N, Malcolm S, Winter R, Ray A, Moreno L, Valencia C, Neiswanger K, Wyszynski DF, Bailey-Wilson JE, Albacha-Hejazi H, Beaty TH, McIntosh I, Hetmanski JB, Tunçbilek G, Edwards M, Harkin L, Scott R, Roddick LG. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet.* 2004 Aug;75(2):161-73. Epub 2004 Jun 4. PubMed PMID: 15185170; PubMed Central PMCID: PMC1216052.

Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T, Maher BS, Daack-Hirsch S, Schultz R, Mansilla MA, Field LL, Liu YE, Prescott N, Malcolm S, Winter R, Ray A, Moreno L, Valencia C, Neiswanger K, Wyszynski DF, Bailey-Wilson JE, Albacha-Hejazi H, Beaty

- TH, McIntosh I, Hetmanski JB, Tunçbilek G, Edwards M, Harkin L, Scott R, Roddick LG. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet.* 2004 Aug;75(2):161-73. Epub 2004 Jun 4. PubMed PMID: 15185170; PubMed Central PMCID: PMC1216052.
- Marçano AC, Doudney K, Braybrook C, Squires R, Patton MA, Lees MM, Richieri-Costa A, Lidral AC, Murray JC, Moore GE, Stanier P. TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. *J Med Genet.* 2004 Jan;41(1):68-74. PubMed PMID: 14729838; PubMed Central PMCID: PMC1757272.
- Marcusson A, Akerlind I, Paulin G. Quality of life in adults with repaired complete cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2001 Jul;38(4):379-85. PMID: 11420018
- Medical Research Council Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet.* 1991 Jul 20;338(8760):131-7. PubMed PMID: 1677062.
- Menezes R, Marazita ML, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Bardi K, Brandon C, Letra A, Martin RA, Vieira AR. AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc.* 2009 Jan;140(1):80-4. PubMed PMID: 19119171; PubMed Central PMCID: PMC2945901.
- Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res.* 2009 Jan;88(1):22-33. Review. PubMed PMID: 19131313.
- Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, Lee YJ, Mayne PD, Weir DG, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet.* 1999 Sep 3;86(1):71-4. PubMed PMID: 10440833.
- Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, Lee YJ, Mayne PD, Weir DG, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet.* 1999 Sep 3;86(1):71-4. PubMed PMID: 10440833.
- Mittermayer C, Lee A. Three-dimensional ultrasonographic imaging of cleft lip: the winners are the parents. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003 Jun;21(6):628-9. PubMed PMID: 12808689.
- Montenegro MA, Palomino H, Palomino HM. The influence of earthquake-induced stress on human facial clefting and its simulation in mice. *Arch Oral Biol.* 1995 Jan;40(1):33-7. PubMed PMID: 7748110.
- Moore JH, Barney N, Holden T. MDR Software Overview Guide Release 1.0.0 Computational Genetics Laboratory HB 7937 One Medical Center Dr. Dartmouth Medical School Lebanon, NH 03756 [www.epistasis.org](http://www.epistasis.org)
- Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden T, Barney N, White BC. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theor Biol.* 2006 Jul 21;241(2):252-61. Epub 2006 Feb 2. PubMed PMID: 16457852.
- Moore JH, Williams SM. New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension. *Ann Med.* 2002;34(2):88-95. Review. PubMed PMID: 12108579.
- Moore K L. *The Developing Human*, 3rd Ed. Saunders, Philadelphia. 1982.
- Moore, K. L. and T. V. N. Persaud. 1998. *The Developing Human*, 6th Ed. Saunders, Philadelphia.
- Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, Cooper ME, Busch TD, Machida J, Johnson MK, Brauer D, Krahn K, Daack-Hirsch S, L'heureux J, Valencia-Ramirez C, Rivera D, López AM, Moreno MA, Hing A, Lammer EJ, Jones M, Christensen K, Lie RT, Jugessur A, Wilcox AJ, Chines P, Pugh E, Doheny K, Arcos-Burgos M, Marazita ML, Murray JC, Lidral AC. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet.* 2009 Dec

## 6. Bibliografia

15;18(24):4879-96. Epub 2009 Sep 24. PubMed PMID: 19779022; PubMed Central PMCID: PMC2778374.

Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009 Nov 21;374(9703):1773-85. Epub 2009 Sep 9. Review. PubMed PMID: 19747722.

Motsinger AA, Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. *Hum Genomics*. 2006 Mar;2(5):318-28. Review. PubMed PMID: 16595076.

Motsinger AA, Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. *Hum Genomics*. 2006 Mar;2(5):318-28. Review. PubMed PMID: 16595076.

Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*. 2002 Apr;61(4):248-56. Review. PubMed PMID: 12030886.

Nawshad A, LaGamba D, Hay ED. Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch Oral Biol*. 2004 Sep;49(9):675-89. Review. PubMed PMID: 15275855.

Nguyen PN, Sullivan PK. Issues and controversies in the management of cleft palate. *Clin Plast Surg*. 1993 Oct;20(4):671-82. Review. PubMed PMID: 8275632.

Nishi M, Miyake H, Takeda T, Hatae Y. Congenital malformations and childhood cancer. *Med Pediatr Oncol*. 2000 Apr;34(4):250-4. PubMed PMID: 10742060.

Nuckolls GH, Shum L, Slavkin HC. Progress toward understanding craniofacial malformations. *Cleft Palate Craniofac J*. 1999 Jan;36(1):12-26. Review. PubMed PMID: 10067756.

Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ, Rozen R, Oakley GP Jr, Adams MJ Jr. 5,10 Methylene tetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet*. 1996 Jun 28;63(4):610-4. PubMed PMID: 8826441.

Peer LA, Strean LP. Stress as an etiologic factor in the development of cleft palate. *Plast Reconstr Surg* (1946). 1956 Jul;18(1):1-8. PubMed PMID: 13359134.

Pleet H, Graham JM Jr, Smith DW. Central nervous system and facial defects associated with maternal hyperthermia at four to 14 weeks' gestation. *Pediatrics*. 1981 Jun;67(6):785-9. PubMed PMID: 7232042.

Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet*. 2008 Nov;40(11):1341-7. Epub 2008 Oct 5. PubMed PMID: 18836445; PubMed Central PMCID: PMC2691688.

Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet*. 2008 Nov;40(11):1341-7. Epub 2008 Oct 5. PubMed PMID:18836445; PubMed Central PMCID: PMC2691688.

Riley BM, Murray JC. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases. *Am J Med Genet A*. 2007 Dec 15;143A(24):3228-34. PubMed PMID: 17963255; PubMed Central PMCID: PMC2680818.

- Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet.* 2001 Jul;69(1):138-47. Epub 2001 Jun 11. PubMed PMID: 11404819; PubMed Central PMCID: PMC1226028.
- Robertson NRE. *Ortopedia dentomascellare e ortodonzia nella labiopalatoschisi.* Milano: Scienza e Tecnica Dentistica, 1984.
- Rodríguez-Pinilla E, Martínez-Frías ML. Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: a case-control study. *Teratology.* 1998 Jul;58(1):2-5. PubMed PMID: 9699238.
- Rossell-Perry P. New diagram for cleft lip and palate description: the clock diagram. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009 May;46(3):305-13. Epub 2008 Oct 29. PubMed PMID: 19642757.
- Rowland JM, Hendrickx AG. Teratogenicity of triamcinolone acetonide in rats. *Teratology.* 1983 Feb;27(1):13-8. PubMed PMID: 6845214.
- Sadler TW. *Head and neck. Langman's medical embryology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006:257-284.
- Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, Gitel S, Dardik R, Rosenberg N, Berliner S, Inbal A, Many A, Lubetsky A, Varon D, Martinowitz U, Seligsohn U. Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Mar;19(3):511-8. PubMed PMID: 10073951.
- Saxén I. Cleft lip and palate in Finland: parental histories, course of pregnancy and selected environmental factors. *Int J Epidemiol.* 1974 Sep;3(3):263-70. PubMed PMID: 4412458.
- Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet.* 1996 Mar;58(3):551-61. PubMed PMID: 8644715; PubMed Central PMCID: PMC1914570.
- Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjaerven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E, Lie RT. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ.* 2008 Feb 23;336(7641):432-4. Epub 2008 Feb 4. PubMed PMID: 18250102; PubMed Central PMCID: PMC2249683.
- Sonvilla G, Allerstorfer S, Stättner S, Karner J, Klimpfinger M, Fischer H, Grasl-Kraupp B, Holzmann K, Berger W, Wrba F, Marian B, Grusch M. FGF18 in colorectal tumour cells: autocrine and paracrine effects. *Carcinogenesis.* 2008 Jan;29(1):15-24. Epub 2007 Sep 22. PubMed PMID: 17890768.
- Sözen MA, Suzuki K, Tolarova MM, Bustos T, Fernández Iglesias JE, Spritz RA. Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Nat Genet.* 2001 Oct;29(2):141-2. PubMed PMID: 11559849. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 1993 Mar;52(3):506-16. PubMed PMID: 8447318; PubMed Central PMCID: PMC1682161.
- Snustad DP, Simmons MJ. *Principi di genetic.* Quarta edizione 2010, EdiSES.
- Srichomthong C, Siriwan P, Shotelersuk V. Significant association between IRF6 820G->A and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. *J Med Genet.* 2005 Jul;42(7):e46. PubMed PMID: 15994871; PubMed Central PMCID: PMC1736106.

## 6. Bibliografia

Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet.* 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R73-81. Epub 2004 Jan 13. Review. PubMed PMID: 14722155.

Strong EB, Buckmiller LM. Management of the cleft palate. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2001 Feb;9(1):15-25, vii. Review. PubMed PMID: 11465002.

Sulik KK, Cook CS, Webster WS. Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death. *Development.* 1988;103 Suppl:213-31. Review. PubMed PMID: 3074910.

Suzuki K, Hu D, Bustos T, Zlotogora J, Richieri-Costa A, Helms JA, Spritz RA. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat Genet.* 2000 Aug;25(4):427-30. PubMed PMID: 10932188.

Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Gruss P, Strachan T. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature.* 1992 Feb 13;355(6361):635-6. PubMed PMID: 1347148.

Trokovic N, Trokovic R, Mai P, Partanen J. Fgfr1 regulates patterning of the pharyngeal region. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):141-53. PubMed PMID: 12514106; PubMed Central PMCID: PMC195961.

Tsai MY, Loria CM, Cao J, Kim Y, Siscovick DS, Schreiner PJ, Hanson NQ. Polygenic association with total homocysteine in the post-folic acid fortification era: the CARDIA study. *Mol Genet Metab.* 2009 Sep-ct;98(1-2):181-6. Epub 2009 Jun 6. PubMed PMID: 19577940.

Van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):342-3. Erratum in: *Nat Genet* 2000 May;25(1):125. PubMed PMID: 10742093.

Vasan N. Management of children with clefts of the lip or palate: an overview. *N Z Dent J.* 1999 Mar;95(419):14-20. Review. PubMed PMID: 10208080.

Wade MJ. Epistasis, complex traits, and mapping genes. *Genetica.* 2001;112-113:59-69. PubMed PMID: 11838787.

Welsh IC, Hagge-Greenberg A, O'Brien TP. A dosage-dependent role for Spry2 in growth and patterning during palate development. *Mech Dev.* 2007 Sep-Oct;124(9-10):746-61. Epub 2007 Jul 10. PubMed PMID: 17693063; PubMed Central PMCID: PMC2043129.

Werler MM, Lammer EJ, Rosenberg L, Mitchell AA. Maternal alcohol use in relation to selected birth defects. *Am J Epidemiol.* 1991 Oct 1;134(7):691-8. PubMed PMID: 1951274.

Wilcox AJ, Weinberg CR, Lie RT. Distinguishing the effects of maternal and offspring genes through studies of "case-parent triads". *Am J Epidemiol.* 1998 Nov1;148(9):893-901. PubMed PMID: 9801020.

Windham GC, Bjerkedal T, Langmark F. A population-based study of cancer incidence in twins and in children with congenital malformations or low birth weight, Norway, 1967-1980. *Am J Epidemiol.* 1985 Jan;121(1):49-56. PubMed PMID: 3155484.

Wong FK, Hagg U. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J.* 2004 Oct;10(5):331-6. Review. PubMed PMID: 15479962.

Wong FK, Hagg U. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J.* 2004 Oct;10(5):331-6. Review. PubMed PMID: 15479962.

Wyszynski DF, Beaty TH. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology.* 1996 May;53(5):309-17. Review. PubMed PMID: 8879089.

Yoneda T, Pratt RM. Vitamin B6 reduces cortisone-induced cleft palate in the mouse. *Teratology*. 1982 Dec;26(3):255-8. PubMed PMID: 7163974.

Zhu JL, Basso O, Hasle H, Winther JF, Olsen JH, Olsen J. Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark. *Br J Cancer*. 2002 Aug 27;87(5):524-8. PubMed PMID: 12189550; PubMed Central PMCID: PMC2376161.

Zucchero TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):769-80. PubMed PMID: 15317890.

Siti WEB:

Multiple Congenital Anomaly, MCA

[http://www.nlm.nih.gov/archive/20061212/mesh/jablonski/mesh/jablonski/syndrome\\_db.html](http://www.nlm.nih.gov/archive/20061212/mesh/jablonski/mesh/jablonski/syndrome_db.html)

NCBI OMIM, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

<http://www.bionalogy.com/>