

POLIMORFISMUL LA NIVELUL UNUI SINGUR NUCLEOTID rs10850110 ÎN GENA *Myo1H* ȘI RISCUL DE MALOCLUZII LA O POPULAȚIE DIN ROMÂNIA

MIRCEA GHERGIE¹, DANA FEȘȚILĂ², BEATRICE KELEMEN³, IULIA LUPAN⁴

^{1,2}Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, ^{3,4}Centrul de Biologie Moleculară, Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano Științe, Universitatea „Babeș-Bolyai” din Cluj-Napoca

**Cuvinte
anomalii
marker
Matrilin 1**

cheie:
dentare,
genetic,

Rezumat: Introducere. Se presupune că gena pentru Matrilin-1 este implicată în formarea rețelei de filamente din matricea extracelulară a cartilajului, implicit și în formarea cartilajului condilului mandibular, foarte important în numeroase malocluzii. Obiective. Scopul acestui studiu a fost asocierea markerului genetic *Myo1H* (rs10850110) cu malocluziile. Metode. Lotul experimental a fost alcătuit din 47 de pacienți. Grupul de control a cuprins 11 indivizi. Au fost efectuate măsurători cefalometrice. Genotiparea a fost realizată prin secvențializare. Rezultate. Diferențe semnificative au fost observate între diferite clase de malocluzii și lotul martor. Distribuția genotipurilor în populație a respectat echilibrul Hardy-Weinberg. Concluzii. Rezultatele noastre susțin ipoteza că gena *Myo1H* are un rol important în dezvoltarea caracteristicilor fenotipice specifice malocluziilor de Clasă I, II și în special III.

Keywords:
dental
anomalies,
marker, Matrilin 1

Abstract: Background. The Matrilin-1 gene is thought to be involved in the formation of the filamentous network of the cartilage's extracellular matrix and implicitly in the formation of the mandibular condyle cartilage, very important in different malocclusions. Objectives. The purpose of this study was the association of the marker *Myo1H* (rs10850110) with malocclusions. Methods. The sample comprises 47 patients with different malocclusions. The control group included 11 individuals. Cephalometric measurements were performed. The genotyping was done by sequencing. Results. Significant differences concerning allele and genotype distribution were observed between different malocclusions and the control group. The genotypes were distributed in the population according to Hardy-Weinberg equilibrium. Conclusions. Our findings are in agreement with other studies that emphasize the importance of the *Myo1H* gene in the determination of Class I, II and especially Class III phenotypes.

INTRODUCERE

Malocluziile dentare ar putea fi rezultatul unei disproporții dintre mărimea și numărul dinților și mărimea maxilarelor, care pot produce înghesuire sau spațiere, sau dintre mărimea și forma maxilei sau a mandibulei. Modificări în morfologia țesuturilor moi sau ale musculaturii periorale ar putea, de asemenea, să fie responsabile de apariția unor ocluzii anormale.

Conform clasificării lui Angle (1) se diferențiază trei clase de malocluzii, cu subdiviziuni în funcție de prezența și a altor anomalii. Pacienții de Clasa I prezintă înghesuire (cel mai frecvent) sau spațiere în regiunea anterioară a arcului dentar.

Anomaliile de Clasa II cuprind numeroase combinații dintre componentele scheletice (prognatism maxilar protruzie II/1 – sau retrognatism mandibular II/2) și dentoalveolare (protruzie alveolodentară maxilară sau retruzie alveolodentară mandibulară).

Anomaliile de Clasa I și II sunt relativ răspândite în populația umană, ceea ce înseamnă că numeroși tineri au probleme ortodontice.(2-4)

Malocluziile de Clasa III pot fi rezultatul retrognației maxilarului superior (chiar o micrognație maxilară, anomalie cunoscută ca prognatism mandibular fals), prognatism mandibular adevărat, retroalveolodonție maxilară și proalveolodonție mandibulară, sau combinația acestora.

Prevalența prognatismului variază cu vârsta (5,6), cu grupul etnic (7,8) și sexul, fiind mai frecventă la femei decât la bărbați.(9,10) La populațiile din Asia, cum ar fi la coreeni, chinezi sau japonezi incidența prognatismului mandibular este mai ridicată comparativ cu cele din Europa.(10-12) Etiologia prognatismului mandibular s-a atribuit unor mecanisme diferite de moștenire genetică, influențate și de diverși factori de mediu. Unele studii presupun un mecanism de moștenire dominant autosomal (10,13,14), în general poligenic, dar s-au semnalat și cazuri de moștenire monogenică.(8)

Noi am constatat, moștenirea unor anomalii la rude de gradul I: mamă-fiu sau mamă-fiică, mamă-soră-copii (date nepublicate).

SCOP

Scopul lucrării a fost de a identifica gene care ar fi implicate în reglarea dezvoltării maxilei sau mandibulei în diferite anomalii dentare, folosind Polimorfisme la Nivelul unui Singur Nucleotid (SNPs) ca markeri genetici. În acest sens, am caracterizat un fragment din gena *Matrilin-1* (proteina matricei cartilajului), o proteină ne-colagenă, secretată de condrocite care se exprimă dominant în cartilaj. Se presupune că această proteină ar fi implicată în formarea rețelei de filamente din matricea extracelulară a cartilajului (15), implicit și în formarea cartilajului condilului mandibular, foarte important în numeroase malocluzii.(16)

¹Autor corespondent: Iulia Lupan, Str. Treboniu Laurean, Nr. 42, Cluj Napoca, România, E:mail: iulia.lupan@ubbcluj.ro, Tel: +40264 454554
Articol intrat în redacție în 03.04.2013 și acceptat spre publicare în 01.10.2013
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Decembrie 2013;2(4):122-125

ASPECTE CLINICE

După cunoștințele noastre, până în prezent, nu s-au realizat studii similare asupra populației din România.

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

Lotul clinic cuprinde 47 de pacienți cu diferite tipuri de malocluzii: 10 pacienți – Clasa I cu vârsta medie de 18,3 ani (7 femei și 3 bărbați); 19 pacienți – Clasa II/1 cu vârsta medie de 18,3 ani (8 femei și 11 bărbați), 3 pacienți – Clasa II/2, cu vârsta medie de 17,3 ani (toate femei) și 15 pacienți – Clasa III cu vârsta medie de 21,1 ani (8 femei și 7 bărbați). Lotul control a inclus 11 indivizi (9 femei și 2 bărbați), cu o vârstă medie de 31 ani.

Am efectuat măsurători cefalometrice în plan sagital, măsurând unghiurile SNA, SNB, ANB (după Steiner), unghiul planului A-B (după Downs) și distanța AOB0 (după Wits).

Unghiul SNA indică poziția în sens sagital a maxilarului superior față de baza craniului. Valoarea medie este de $82^\circ \pm 2^\circ$, valori mai scăzute de 82° indică retrognație maxilară, unghiuri mai mari de 82° - prognatism maxilar.

Valoarea unghiului SNB arată dacă mandibula este poziționată anterior sau posterior față de baza craniului. Valoarea medie este de $82^\circ \pm 2^\circ$. Valori mai scăzute de 80° indică retrognație mandibulară, valori mai ridicate – prognatism mandibular.

Unghiul ANB oferă indicații privind poziția maxilarului superior față de mandibulă, raportat la baza craniului. Valorile normale variază între 0° și 2° . Unghiul ANB mai mare de 2° indică o tendință spre Clasa II, un unghi mai mic de 0° sugerează tendința spre Clasa III.

Unghiul planului A-B măsoară relația dintre maxilare față de linia facială (N-Pog). Valoarea medie este de -4.6° . Valori negative (sub -9°) sugerează un aspect facial de Clasa II, în timp ce valori pozitive indică un aspect facial de Clasa III.

Distanța AOB0 (Wits) este o măsurătoare liniară utilizată pentru a stabili dacă există o dizarmonie antero-posterioară între maxilare. Se măsoară diferența liniară între proiecția punctelor A și B față de planul ocular. După Wits, relația medie dintre maxilare este de 0-2 mm. Valori mai reduse indică o anomalie de Clasa III, valori mai mari indică o discrepanță scheletică de Clasa II.

Pentru analiza genetică, s-a extras ADN genomic din celulele mucoasei bucale, folosind kitul Animal and Fungi DNA Preparation Kit (Jena BioScience).

Un fragment de genă (803 pb) conținând SNP rs10850110 (locus 12q24.11) s-a amplificat cu ajutorul reacției în lanț a polimerazei (Polymerase Chain Reaction) folosind amorsele:

H1For 5'-AATTCGTCTGCTCCGCATC-3' și

H1Rev 5'-ATTTCCATCCAATGGTGCAG-3'.

Amestecul PCR (50 μ l) a conținut 0,5 μ M fiecare amorsă, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM din fiecare dNTP, 200 ng de ADN genomic și 1,75 U din Go Taq Flexi ADN polimerază (Promega). Condițiile de amplificare standard au fost de 95°C timp de 4 min, 35 cicluri: 94°C - 30 sec, 56°C - 30 sec și 72°C - 1 min, extensia finală 10 min la 72°C. Produsul PCR a fost purificat din gel de agaroză utilizând Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Secvențializarea produșilor PCR s-a realizat cu ajutorul metodei de terminare a catenei utilizând amorsa H1.

REZULTATE

Măsurătorile cefalometrice sunt prezentate în tabelul nr. 1. Din cei 58 de pacienți analizați, 18,96% au avut ocluzie normală, 17,24% - malocluzie de Clasa I, 37,93% de Clasa II și 25,86% de Clasa III. Malocluziile de Clasa II au predominat în studiul nostru dar, din cauza numărului redus de probe, nu

putem conclure că această Clasă este predominantă în populația din România.

Prognatismul mandibular este heterogen din punct de vedere clinic, putând rezulta nu numai dintr-un prognatism mandibular adevărat, ci și dintr-o retrognație a maxilarului superior sau o combinație a acestora.

Tabelul nr. 1. Măsurători cefalometrice și genotipurile pentru rs10850110

Clasa	Pacient	Vârsta (ani)	Sex	SNA (°)	SNB (°)	ANB (°)	AOB0 (mm)	Plan - AB (°)	SNP H1 10850110
I	1	18	M	80	78	2	-1	-3	AG
	2	17	F	82	79	3	2	-9	GG
	3	13	M	83	79	4	2	-7	AA
	4	30	F	81	76	5	1	-9	AG
	5	16	F	80	77	3	1,5	-6	GG
	6	25	F	83	80	3	1	-4	AG
	7	15	M	82	79	3	1	-2	GG
	8	20	F	83	81	2	1,5	-5	GG
	9	17	F	81	80	1	1	-3	AG
	10	12	F	79	75,2	4,6	0	-8	GG
II/1	11	18	M	71	68	3	2,5	-3	GG
	12	23	F	-	-	5	3	-9	GG
	13	14	M	74	70	4	2,5	-10	GG
	14	25	M	82	78	4	4	-10	GG
	15	19	F	86	80	6	3	-7	AG
	16	14	M	82	77	5	3	-9	GG
	17	13	F	85	79,5	5,5	3	-10	GG
	18	12	M	82	78	4	4	-11	AG
	19	12	F	83	77	6	4	-9	GG
	20	14	M	84	78	6	3	-7	AG
II/2	21	14	M	82	79	3	3	-5	AG
	22	12	M	83,2	78,7	4,5	3	-9	GG
	23	33	F	84	76	8	4	-12	GG
	24	12	M	82	77	5	4	-10	GG
	25	12	M	83	79	4	3	-8	AG
	26	14	M	79	73	6	6	-11	AG
	27	23	F	86	72	14	12	-23	GG
	28	38	F	85	79	6	3	-12	GG
	29	27	F	74	69	5	6	-13	AG
	30	19	F	79	74	5	7	-8	GG
III/2	31	17	F	79	73	6	6	-10	GG
	32	16	F	81	77	4	5	-10	GG
III	33	20	M	79	77	2	-4	2	GG
	34	24	M	78	82	-4	-2	6	GG
	35	20	F	73	74	-1	-3	0	GG
	36	16	F	76	77	-1	-13	0	GG

ASPECTE CLINICE

	37	21	M	84	90	-6	-10	7	AG
	38	15	M	81	85	-4	-2	0	AG
	39	21	M	82	90	-8	-13	12	-
	40	42	M	82	84	-2	-2,5	-2	AA
	41	18	F	77	76	1	-9	0	GG
	42	12	F	76	78	-2	-2	0	AA
	43	7	M	78	84	-6	-4	1	GG
	44	29	F	76	89	-13	-14	13	AG
	45	35	F	80	88	-8	-9	8	GG
	46	24	F	80	82	-2	-2	2	GG
	47	13	F	81	82	-1	-5	2	GG
control	48	25	F	80	77,5	2,5	1	-5,6	GG
	49	28	F	81	80	1	0	-4	GG
	50	39	M	82	80	2	0	-4,5	GG
	51	31	F	81	79	2	1	-4,6	GG
	52	35	F	80,5	80	0,5	0	-3	GG
	53	24	F	83	80,5	2,5	1	-6	GG
	54	24	F	82,5	80	2,5	2	-5	GG
	55	36	F	82	81	1	1,5	-4,5	GG
	56	32	M	83	81,5	1,5	0	-3	GG
	57	30	F	80	79	1	1	-4	GG
	58	37	F	82	81	1	0	-4	GG

S-au analizat statistic distribuția alelelor și genotipurilor la indivizii cu malocluzii de Clasa I, II și III și la lotul control folosind testul Chi-pătrat (tabelul nr. 2). S-au constatat diferențe semnificative ($p < 0.05$) privind frecvența alelelor la pacienții de Clasa I, II și III față de lotul control. În ceea ce privește genotipurile, am constatat diferențe semnificative doar între pacienții de Clasa I, II și cei din lotul control. Distribuția genotipurilor în populație a respectat echilibrul Hardy-Weinberg ($p = 0.3475$).

Tabelul nr. 2. Distribuția genotipurilor și distribuția alelelor pentru SNP rs10850110

	Genotipuri			Alele	
	GG	AG	AA	G	A
Clasa I	5	4	1	14	6
	$p=0.0270^*$			$p=0.0055^{**}$	
Clasa II	15	7	0	37	7
	$p=0.0350^*$			$p=0.0478^*$	
Clasa III	9	3	2	21	7
	$p=0.0858$			$p=0.0114^*$	
Clasa I, II, III	29	14	3	72	20
	$p=0.0552$			$p=0.0160^*$	
Control	11	0	0	22	0

DISCUȚII

Deși secvențele genelor sunt foarte asemănătoare în populația umană, genoamele pot să difere odată la aproximativ 1,200 de baze, având alte baze decât în mod normal. Aceste

diferențe genetice, cunoscute sub numele de SNP, pot servi ca markeri genetici care asociază gene cu diferite maladii. Proiectul Internațional HapMap (haplotype map) încearcă să identifice cât mai multe SNP din cele aproximativ 10 milioane care se estimează că s-ar afla în genomul uman (snp.cshl.org/hapmappopulations.html.en). Dintre aceste SNP am ales marker-ul *Myo1H* (rs10850110) locusul 12q24.11 răspunzător de sinteza Matrilin 1, o importantă proteină implicată în reglarea dezvoltării maxilarelor. Pentru rs10850110, alela ancestrală este G, alela A fiind mutantă.

În ciuda numărului redus de pacienți analizați, cercetările noastre concordă cu alte studii care subliniază importanța genei pentru Matrilin-1 în determinismul fenotipurilor de Clasă I, II și în special III (16, 17). La locusul 12q24.11, Tassopoulou-Fishell *et al.* (17) au evidențiat într-un interval de 397,305 pb alte 4 gene care flanchează *Myo1H*. Chiar dacă *Myo1H* este cea mai importantă genă în prognatismul mandibular, nu se poate exclude posibilitatea ca și alte gene să fie implicate.

CONCLUZII

Cercetările noastre susțin părerea că gena *Myo1H* are un rol important în dezvoltarea complexului craniofacial. Implicit și musculatura trebuie să aibă un rol mai important în acest proces, decât s-a presupus până în prezent.

Cunoașterea diferitelor gene implicate în producerea anomaliilor dentare, precum și a mecanismului lor de acțiune ar fi deosebit de utilă ortodonților în stabilirea celor mai eficiente strategii de diagnosticare, prevenție și terapie.

REFERINȚE

- Angle EH. Classification of malocclusion. Dent Cosmos. 1899;41(18):248-264,350-357.
- Bishara SE. Class II malocclusions: diagnostic and clinical considerations with and without treatment. Seminars in Orthod 2006;12 (1):11-24.
- Gelgör IE, Karaman AI, Ercan E. Prevalence of malocclusion among adolescents in central Anatolia. Eur J Dent 2007;1(3):125-131.
- Sridharan K, Udupa V, Srinivas H, Kumar S, Sandbhor S. Prevalence of Class II malocclusion in Tumkur population. J Dental Sciences and Research 2011;2 (2):1-5.
- Saleh FK. Prevalence of malocclusion in a sample of Lebanese schoolchildren: an epidemiological study. East Mediterr Health J 1999;5(2):337-343.
- Thilander B, Pena L, Infante C, Parada SS, de Mayorga C. Prevalence of malocclusion and orthodontic treatment need in children and adolescents in Bogota, Colombia. An epidemiological study related to different stages of dental development. Eur J Orthod 2001;23 (2):153-167.
- Ngan P, Hu AM, Fields HW. Treatment of Class III problems begins with differential diagnosis of anterior crossbites. Pediatr Dent 1997;19(6):386-390.
- Xue F, Wong RK, Rabie AB. Genes, genetics, and class III malocclusion. Orthod. Craniofac. Res. 2010; 13 (2):69-74.
- Baccetti T, Reyes BC, McNamara JA Jr. Gender differences in Class III malocclusion. Angle Orthod 2005;75 (4):510-520.
- Cruz RM, Krieger H, Ferreira R, Hartsfield JK Jr, Oliveira S. Major gene and multifactorial inheritance of mandibular prognathism. Am J Med Genet A 2008;146A(1):71-77.
- Ko JM, Suh JJ, Hong J, Paeng JJ, Baek SH, Kim JH. Segregation analysis of mandibular prognathism in Korean orthognathic surgery patients and their families. Angle Orthod; 2013 (in press).

12. Tang EL. The prevalence of malocclusion amongst Hong Kong male dental students. *Br J Orthod* 1994; 21(1):57-63.
13. El-Gheriani AA, Maher BS, El-Gheriani AS, Sciote JJ, Abu-Shahba FA, Al-Azemi R, et al. Segregation analysis of mandibular prognathism in Libya. *J Dent Res* 2003;82(7):523-527.
14. Frazier-Bowers S, Rincon-Rodriguez R, Zhou J, Alexander K, Lange E. Evidence of linkage in a Hispanic cohort with a Class III dentofacial phenotype. *J Dent Res* 2009;88(1):56-60.
15. Deák F, Wagener R, Kiss I, Paulsson M. The Matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* 1999;18(1):55-64.
16. Jang JY, Park EK, Ryoo HM, Shin HI, Kim TH, Jang JS, et al. Polymorphisms in the Matrilin-1 gene and risk of mandibular prognathism in Koreans. *J Dent Res* 2010;89(11):1203-1207.
17. Tassopoulou-Fishell M, Deeley K, Harvey EM, Sciote J, Vieira AR. Genetic variation in Myosin 1H contributes to mandibular prognathism. *Am J Orthod Dentofacial Orthoped* 2012;141(1):51-59.
18. snp.cshl.org/hapmap/populations.html.en.