REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Analiza unor polimorfisme genetice pentru diagnosticul ortodontic precoce al anomaliilor scheletice

Doctorand **Adina Maria Şufană (Topârcean)**

Conducător de doctorat Prof. dr. **Radu Septimiu Câmpian**

UMF
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE
IULIU HAŢIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

Cuvinte cheie: malocluzii dentare, polimorfisme genetice, matrilina, colagen, anomalii scheletice, fibrilina, măsurători cefalometrice

INTRODUCERE

Apariţia în ultimul timp a numeroase studii genetice în jurnalele de ortodonție atestă rolul important al geneticii în dezvoltarea craniofacială și în tratamentul malocluziilor ortodontice. Întelegerea conceptelor de genetică și epigenetică susține ideea că relația dintre ereditate și mediu este de fapt o dualitate și, aceste procese aparent opuse și contradictorii, sunt ambele complementare și indispensabile, ca și contributori la instalarea fenotipurilor observabile la nivel macro sau micro.

Progresul făcut în ortodonție în ultimul timp a fost identificarea genelor asociate cu deformitățile craniofaciale, a factorilor de creștere și de transcripție care controlează creșterea țesuturilor craniofaciale.

Scopul prezentului studiu îl reprezintă identificarea nivelului la care genele MATN1,COL1a1 și FBN3 sunt corelate cu riscul de dezvoltare al malocluziei dentare în populațiaRomâniei, respectiv cu tipul de malocluzie, utilizând drept marker genetici mutații punctiforme(SNPs) care au fost asociate cu un risc crescut de dezvoltare al acestei patologii.

Cu o întelegere exactă a semnificației "genelor cheie" implicate în creșterea craniofacială și în răspunsul la tratament, cât și prin identificarea variațiilor genice a fiecărui pacient, este posibil să se adapteze tratamentul ortodontic pentru a obține rezultate optime pentru fiecare pacient.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Este cunoscut în medicină faptul că dezvoltarea, progresia și rezultatele tratamentului variază mult între pacienţi. Susceptibilitatea și variabilitatea se pot datora variațiilor genice minore denumite *mutații punctiforme* sau *polimorfisme mononucleotidice* [*Single Nucleotid Polymorfisms (SNPs)*] – puncte genomice de acumulare a unui număr de alele diferite la nivelul aceluiași locus, la nivel populațional și principala cauză a variabilității intraspecifice a genomurilor. În genomul uman există 2 milioane de astfel de mutații punctiforme. Cunoașterea acestor variații genice, precum și a fenotipurilor pe care le influențează, ar putea permite clinicianului selectarea celor mai eficiente planuri de tratament pentru fiecare pacient în parte. În cazul progresului disciplinelor ortodontice în era medicinii personalizate, un mare avans îl poate considera identificarea genelor responsabile pentru dismorfiile craniofaciale, a factorilor de creștere și de transcriere care controlează morfogeneza și creșterea țesuturilor craniofaciale, a genelor implicate în producerea deformităților etajului mijlociu al feței cât și a genelor care influențează creșterea cartilajului condilian, în mod natural și în timpul tratamentului.

Progresul făcut în ortodonție în ultimul timp a fost caracterizarea unui număr din ce în ce mai mare de loci genomici asociați cu deformitățile craniofaciale și a conexiunii dintre genele, factorii de creștere și de transcripție care controlează dezvoltarea și creșterea țesuturilor craniofaciale. Odată cu înțelegerea "genelor cheie" implicate în dezvoltarea și creșterea craniofacială, precum și relația dintre diversitatea acestora și răspunsul la tratament, prefigurează posibilitatea de adaptare a tratamentului ortodontic pentru a obține rezultate optime pentru fiecare pacient[1].

Viitoarele cercetări care încearcă să determine relația dintre genotip și fenotip în ortodonție, precum și cele care încearcă să clarifice componenta genetică și moleculară a etiologiei afecțiunilor în această sferă de studiu, pentru a fi utile și aplicabile trebuie să introducă în proiectarea lor experimentală componenta de tratament ortodontic și rezultatele acestuia în conexiune cu fenotipul și genotipul pacientului, amănunțit caracterizate. Practica ortodontică nu este pregătită astăzi pentru testarea genetică individuală a pacienților, dar progresul înțelegerii substratului genetic este mai mare pe măsură ce cantitatea de date și tehnologia avansează.

Pentru populația din România, acest domeniu a fost puțin explorat. Creșterea numărului de date specifice acestei populații în vederea identificării unor genotipuri "locale" ce predispun la afecțiuni ortodontice, pentru instituirea unui protocol de diagnostic ortodontic "operat genetic" și pentru realizarea unor planuri de tratament precise constituie pașii de urmat pentru viitoare cercetări.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

În această lucrare ne-am propus trei studii distincte în care să evaluăm o potențială asociere între polimorfismele genetice *rs1065755*, *rs2249492* și *rs7351083* și malocluziile dentare din clasele II și III, într-un lot experimental care a reunit pacienți de diferite vârste și sexe, prezentați la tratament ortodontic în perioada 2016-2019 în trei cabinete stomatologice din Cluj-Napoca (jud. Cluj), Șebeș (jud. Alba) și Zalău (jud. Sălaj), și provenind, în majoritate, din populația generală a României (Transilvania).

Ipoteza de lucru a fost că polimorfismele mononucleotidice *rs1065755*, *rs2249492* și *rs7351083* sunt asociate semnificativ cu prevalența malocluziilor dentare de clasă II și/sau III în populația din Transilvania. Această potențială asociere poate revela o parte dintre factorii genetici care contribuie la etiologia și dezvoltarea acestor tipuri specifice de malocluzii dentare în populația autohtonă.

Pacienţii luaţi în studiu au provenit atât din Clinica de Ortodoţie şi Ortopedie dentofacială, din cadrul Universitaţii de Medicină şi Farmacie "Iuliu Haţieganu" Cluj Napoca, cât şi din Clinici de stomatologie din oraşele Cluj-Napoca, Alba-Iulia, Sebeş şi Zalău.

Lotul martor a fost constituit din pacienţi eugnaţi, fără anomalii scheletice, fără tratament ortodontic în antecedente. Criteriile de includere a pacienților în lotul martor au fost: relațiile ocluzale de clasa I, proporții faciale balansate, fără asimetrii, fără discrepanțe între poziția de relație centrică și cea de intercuspidare maximă și fără simptomatologie articulară.

Organizarea pacienților din lotul experimental a fost realizată pe anomalii scheletice de clasa II si III. Includerea s-a făcut pe baza criteriilor clinice.

În baza avizului favorabil al Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, s-au recoltat probe biologice, sursa de ADN genomic (ADN nuclear și ADN mitocondrial) fiind celulele epiteliale bucale. Acestea au fost recoltate fiecărui pacient cu ajutorul *swab*-urilor bucale de unică folosință Isohelix SK-1S (DNA Sampling and Purification) (Cell Projects Ltd., Malta)[2] (Fig. 12).

Pentru izolarea ADN total din probele recoltate cu ajutorul swab-urilor bucale a fost folosit kit-ul Animal and Fungi DNA Preparation Solution Kit (Jena Bioscience, Germania).

Primul studiu are ca scop generarea de date care să dovedească sau să infirme ipoteza că polimorfismul polinucleotidic *rs7351083* al genei *FBN3*, ce codifică un membru al familiei proteice a fibrilinelor, este corelat cu riscul de dezvoltare a malocluziilor la populația din Transilvania, a cărei variabilitate fenotipică este caracterizată cu ajutorul a patru măsurători cefalometrice diferite.

Lotul total format din loturile experimentale pentru malocluziile clasa II și clasa III și lotul martor a reunit 57 de pacienți, împărțiți în trei categorii fenotipice: 18 diagnosticați cu malocluzii de clasa II scheletică, 22 cu malocluzii scheletice de clasa III și restul de 17 participanți la studiu aparținând grupului de control.

Cefalogramele au fost analizate folosind software-ul OnyxCeph și evaluate cu ajutorul analizelor Steiner, evaluarea „Wits" a dizarmoniei maxilarului, analiza Bjorn-Jarabak și analiza McNamara

În ansamblu, acest studiu oferă perspective preliminare asupra bazei genetice a malocluziei scheletice pentru clasele II și III la populația din Transilvania. Rezultatele noastre relevă relația dintre un marker genetic, *rs7351083*, din gena *FBN3* și defectele ortodontice la loturi de pacienți din România. Rezultatele scot la iveală o relație între markerul genetic selectat și tulburarea dentofacială investigată, dezvăluind o asociere pozitivă între alela de referință (A) și clasa II și alela alternativă (G) asociată cu clasa III.

Al doilea studiu și-a propus identificarea unei corelații între polimorfismul polinucleotidic *rs1065755* al genei *MATN1*, ce codifică matrilina-1, cu riscul de dezvoltare a malocluziilor la populația românească.

Eșantionul experimental cuprinde un total de 78 de pacienți. Pacienții au fost clasificați în grupe de studiu (clasa scheletică II și III) și grup de control pe baza morfologiei cefalometrice.

Rezultatele obținute în acest studiu arată că deși nu există o asociere între frecvențele alelice și niciuna din clasele de defecte ocluzale selectate pentru acest studiu, se observă o asociere pozitivă între genotipul homozigot TT și lotul de pacienți clasa II, și o corelație negativă dintre frecvența genotipică pentru același genotip și lotul martor. Descoperirile noastre subliniază rolul potențial al polimorfismelor *MATN1*, în special *rs1065755*, ca marker genetic pentru prognatismul mandibular.

Scopul **celui de-al treilea studiu** stabilirea unei asocieri între polimorfismul polinucleotidic *rs2249492* al genei *COL1A1*, ce codifică un membru al familiei colagenilor, cu riscul de dezvoltare a malocluziilor la populația românească.

Pentru a obține date preliminare privind asocierea dintre alela *rs2249492* și cazurile de pacienți cu malocluzii de clasa II și III în populația românească, lotul experimental cuprinde un total de 12 indivizi pentru care amplificarea segmentului țintă a avut succes, din 78 probe colectate. Dintre aceștia, 9 sunt încadrați în clasa de malocluzie II și 3 în clasa III,

Dimensiunea scăzută a lotului experimental în cadrul acestui studiu, datorată deficienței de amplificare a fragmentului țintă în toate probele studiate, nu ne permite să tragem concluzii aplicabile populației generale, însă este remarcabilă absența homozigoților cu alela de referință în loturile experimentale, iar prezența alelei mutante G într-un genotip pare să fie asociată cu malocluziile de clasa II.

Subliniem că prin această lucrare a fost efectuat un prim screening al acestui locus în populația din România (Transilvania), ceea ce poate constitui un punct de start pentru cercetări ulterioare cu loturi experimentale și martor mai mari.

CONCLUZII GENERALE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

Prezenta lucrare prezintă o explorare unică și originală a mai multor polimorfisme mononucleotidice (SNP) asociate cu malocluzii în literatura de specialitate, într-o populație care a fost subreprezentată în cercetările genetice efectuate până în prezent. Pentru fiecare dintre polimorfismele studiate, acestea sunt primele date publicate pentru populația din România.

Studiile din cadrul tezei de doctorat au pus accent pe analiza a trei polimorfisme mononucleotidice noi pentru populația din România (Transilvania), aducând astfel o contribuție semnificativă la înțelegerea substratului genetic al defectelor de ocluzie. Polimorfismele caracterizate în cadrul cercetării, sunt potențial interesante și importante pentru cunoașterea fundamentală și în final pentru practica clinică în domeniul ortodonției, contribuind la noi descoperiri despre cauzele genetice ale defectelor de ocluzie.

Deși aceste descoperiri sunt încă în stadiul inițial de investigație și nu sunt încă implementate în practica clinică ortodontică, ele reprezintă un pas esențial în dezvoltarea cunoștințelor noastre asupra factorilor genetici implicați în apariția malocluziilor. Prin analiza și interpretarea acestor polimorfisme, cercetările din teza de doctorat aduc o perspectivă inovatoare asupra conexiunilor genetice subiacente aspectelor ortodontice.

Cercetările viitoare ar trebui să vizeze verificarea și extinderea acestor constatări prin studierea unor populații mai mari și mai diversificate, astfel încât să se confirme asocierile observate și să se evalueze aplicabilitatea lor clinică. De asemenea, sunt necesare studii longitudinale pentru a urmări indivizii în timp, în vederea înțelegerii mai bune a interacțiunii dinamice dintre factorii genetici și cei de mediu în dezvoltarea craniofacială.

Integrarea constatărilor genetice în practica clinică necesită linii directoare bazate pe dovezi solide. Prin urmare, sunt necesare eforturi colaborative între geneticieni, ortodonți și cercetători pentru a traduce descoperirile genetice în instrumente de diagnostic precise și strategii terapeutice eficiente pentru tratarea malocluziilor și a anomaliilor craniofaciale asociate, un stadiu la care încă nu am ajuns.

În concluzie, studiul nostru subliniază rolul semnificativ al factorilor genetici în etiologia malocluziilor scheletice și evidențiază importanța luării în considerare a diversității genetice specifice populației în cercetările ortodontice. Constatările noastre contribuie la extinderea cunoștințelor menite să îmbunătățească diagnosticarea, tratamentul și prevenirea malocluzilor prin medicina personalizată.

PHD THESIS SUMMARRY

Analysis of genetic polymorphisms for early orthodontic diagnosis of skeletal anomalies

PhD student **Adina Maria Șufană (Topârcean)**

PhD supervisor Prof. dr. **Radu Septimiu Câmpian**

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE IULIU HAŢIEGANU CLUJ-NAPOCA

CONTENT

Keywords: dental malocclusions, genetic polymorphisms, matrilin, collagen, skeletal abnormalities, fibrillin, cephalometric measurements

INTRODUCTION

The recent publication of numerous genetic studies in orthodontic journals attests to the important role of genetics in craniofacial development and in the treatment of orthodontic malocclusions. The understanding of the concepts of genetics and epigenetics supports the idea that the relationship between heredity and environment is actually a duality, and these apparently opposite and contradictory processes are both complementary and indispensable, as contributors to the expression of phenotypes observable at the macro or micro level.

The newly progress made in orthodontics has been the identification of genes associated with craniofacial deformities, growth and transcription factors that control the growth of craniofacial tissues.

The purpose of the present study is to identify the level at which the genes MATN1, COL1a1 and FBN3 are correlated with the risk of developing dental malocclusion in the Romanian population, respectively with the type of malocclusion, using single nucleotide polymorphisms(SNPs) that have been associated with an increased risk of developing this pathology.

With an accurate understanding of the significance of the "key genes" involved in craniofacial growth and response to treatment, as well as identifying each patient's genetic variations, it is possible to tailor orthodontic treatment to achieve optimal outcomes for each patient.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

It is known in medicine that the development, progression and results of treatment vary greatly between patients. Susceptibility and variability may be due to minor gene variations called *point mutations* or *single nucleotide polymorphisms* (*SNPs)* – genomic points of accumulation of a number of different alleles at the same locus, at the population level and the main cause of intraspecific variability of genomes. In the human genome there are 2 million such mutations. Identifying these gene variations, as well as the phenotypes they influence, could allow the clinician to select the most effective treatment plans for each individual patient. In the era of personalized medicine, a great advancement can be considered the identification of the genes responsible for craniofacial dysmorphia, the growth and transcription factors that control the morphogenesis and growth of craniofacial tissues, the genes involved in the producing middle face deformities, as well as the genes that influence the growth of condylar cartilage, naturally and during treatment.

The progress made in orthodontics in recent times has been the characterization of an increasing number of genomic loci associated with craniofacial deformities and the connection between genes, growth and transcription factors that control the development and growth of craniofacial tissues. Understanding the "key genes" involved in craniofacial development and growth, as well as the relationship between their diversity and response to treatment, it foreshadows the possibility of adapting orthodontic treatment to achieve optimal results for each patient.

Future research that seeks to determine the relationship between genotype and phenotype in orthodontics, as well as those that seeks to clarify the genetic and molecular component of the etiology of diseases, in order to be useful and applicable , must introduce into their experimental design the component of orthodontic treatment and its results in connection with the phenotype and genotype of the patient. Orthodontic practice is not ready today for individual genetic testing of patients, but the progress in understanding the genetic substrate is greater as the amount of data and technology advances·

For the Romanian population, this field has been little explored. Future research should be drawn for increasing the number of data specific to this population in order to identify "local" genotypes that predispose to orthodontic diseases, to establish a "genetically operated" orthodontic diagnosis protocol and to develop precise treatment plans.

PERSONAL CONTRIBUTION

This paper consists of three distinct studies in which to evaluate a potential association between the genetic polymorphisms *rs1065755*, *rs2249492* and *rs7351083* and dental malocclusions of classes II and III, in an experimental batch that brought together patients of different ages and sexes, presented for orthodontic treatment in the period 2016-2019 in three dental offices in Cluj-Napoca Cluj-Napoca, (Cluj county), Sebeș (Alba county) and Zalău (Sălaj, county), coming from Transylvania population.

The working hypothesis was that the mononucleotide polymorphisms *rs1065755*, *rs2249492* and *rs7351083* are significantly associated with the prevalence of class II and/or III dental malocclusions in the Transylvanian population. This potential association may reveal some of the genetic factors that contribute to the etiology and development of these specific types of dental malocclusions in the native population.

The patients in the study came from both the Orthopedics and Dentofacial Orthopedics Clinic, within the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Haţieganu" Cluj Napoca and from the Dental Clinics in the cities of Cluj-Napoca, Alba-Iulia, Sebeş and Zalău.

The control group consisted of eugnathic patients, without skeletal abnormalities, without orthodontic treatment in the past. The criteria for inclusion of patients in the control group were: class I occlusal relationships, balanced facial proportions, no asymmetries, no discrepancies between the centric relationship position and the maximum intercuspidation position and no joint symptomatology.

The organization of patients in the experimental group was performed on class II and III skeletal anomalies. Inclusion was based on clinical criteria.

Based on the favorable approval of the Ethics Commission of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca, biological samples were collected, the source of genomic DNA (nuclear DNA and mitochondrial DNA) being oral epithelial cells. These were collected from each patient using *the disposable oral swabs* Isohelix SK-1S (DNA Sampling and Purification) (Cell Projects Ltd., Malta)[3] (Fig. 12).

For the isolation of total DNA from the samples collected with the help of oral swabs, the Animal and Fungi DNA Preparation Solution Kit (Jena Bioscience, Germany) was used.

The first study aims to generate data to prove or disprove the hypothesis that the polynucleotide polymorphism *rs7351083* of the *FBN3* gene, encoding a member of the fibrillin protein family, is correlated with the risk of developing malocclusions in the Transylvanian population, whose phenotypic variability is characterized by four different cephalometric measurements.

The total group consisting of the experimental groups for class II and class III malocclusions and the control group brought together 57 patients, divided into three phenotypic categories: 18 diagnosed with skeletal class II malocclusions, 22 with class III skeletal malocclusions and the remaining 17 study participants belonging to the control group.

The cephalograms were analyzed using the OnyxCeph software and evaluated using Steiner analysis, "Wits" assessment of jaw disharmony, Bjorn-Jarabak analysis and McNamara analysis

Overall, this study provides preliminary insights into the genetic basis of skeletal malocclusion for classes II and III in the Transylvanian population. Our results reveal the relationship between a genetic marker, *rs7351083*, from the *FBN3 gene* and orthodontic defects in batches of patients in Romania. The results reveal a relationship between the selected genetic marker and the investigated dentofacial disorder, revealing a positive association between the reference allele (A) and class II and the alternative allele (G) associated with class III.

The second study aimed to identify a correlation between the polynucleotide polymorphism *rs1065755* of the *MATN1 gene*, encoding matrilin-1, with the risk of developing malocclusions in the Romanian population.

The experimental sample comprises a total of 78 patients. Patients were classified into study groups (skeletal class II and III) and control group based on cephalometric morphology.

The results obtained in this study show that although there is no association between allele frequencies and any of the classes of occlusal defects selected for this study, a positive association is observed between the homozygous TT genotype and the class II patient group, and a negative correlation between the genotypic frequency for the same genotype and the control group. Our findings highlight the potential role of *MATN1* polymorphisms, specifically *rs1065755*, as a genetic marker for mandibular prognathism.

The aim **of the third study was to** establish an association between the polynucleotide polymorphism *rs2249492* of the *COL1A1 gene*, which encodes a member of the collagen family, with the risk of developing malocclusions in the Romanian population.

In order to obtain preliminary data on the association between the *rs2249492 allele* and the cases of patients with class II and III malocclusions in the Romanian population, the experimental batch includes a total of 12 individuals for whom the amplification of the target segment was successful, out of 78 samples collected. Of these, 9 are classified in malocclusion class II and 3 in class III.

The small size of the experimental batch in this study, due to the deficiency of amplification of the target fragment in all the samples studied, does not allow us to draw conclusions applicable to the general population, but the absence of homozygotes with the reference allele in the experimental batches is remarkable, and the presence of the mutant G allele in a genotype seems to be associated with class II malocclusions.

We emphasize that through this work a first screening of this locus was carried out in the population of Romania (Transylvania), which can be a starting point for further research with larger experimental and control batches.

GENERAL CONCLUSIONS AND ORIGINALITY OF THE THESIS

The present paper presents a unique and original exploration of several mononucleotide polymorphisms (SNPs) associated with malocclusions in the literature, in a population that has been underrepresented in genetic research conducted to date. For each of the polymorphisms studied, these are the first data published for the Romanian population.

The studies within the doctoral thesis focused on the analysis of three new mononucleotide polymorphisms for the population in Romania (Transylvania), thus making a significant contribution to the understanding of the genetic substrate of occlusion defects. The polymorphisms characterized in the research are potentially interesting and important for fundamental knowledge and ultimately for clinical practice in the field of orthodontics, contributing to new discoveries about the genetic causes of occlusion defects.

Although these findings are still in the initial investigation stage and are not yet implemented in orthodontic clinical practice, they represent an essential step in developing our knowledge of the genetic factors involved in the occurrence of malocclusions. By analyzing and interpreting these polymorphisms, the research in the doctoral thesis brings an innovative perspective on the genetic connections underlying orthodontic aspects.

Future research should aim to verify and expand on these findings by studying larger and more diverse populations so as to confirm the observed associations and assess their clinical applicability. Longitudinal studies are also needed to follow individuals over time in order to better understand the dynamic interaction between genetic and environmental factors in craniofacial development.

Integrating genetic findings into clinical practice requires guidelines based on solid evidence. Therefore, collaborative efforts are needed between geneticists, orthodontists and researchers to translate genetic discoveries into accurate diagnostic tools and effective therapeutic strategies for treating malocclusions and associated craniofacial anomalies, a stage we have not yet reached.

In conclusion, our study emphasizes the significant role of genetic factors in the etiology of skeletal malocclusions and highlights the importance of considering population-specific genetic diversity in orthodontic research. Our findings contribute to expanding knowledge aimed at improving the diagnosis, treatment and prevention of malocclusions through personalized medicine.