

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**SCIENZE MEDICHE E DEI SERVIZI  
PROGETTO N° 2: ODONTOIATRIA PER DISABILI**

Ciclo XXV

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/F1**

**Settore Scientifico disciplinare: MED/28**

**VALUAZIONE DELLO SPOSTAMENTO TRIDIMENSIONALE  
DEGLI IMPIANTI IN GIOVANI PAZIENTI AFFETTI DA EDs  
RIABILITATI CON OVERDENTURE IMPLANTO-SUPPORTATE**

**Presentata da: FILIPPO BATTELLI**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Nicola Rizzo**

**Relatore**

**Prof.ssa Gabriela Piana**

**Esame finale anno 2013**



*...ai miei genitori  
e a tutti coloro che riempiono la mia vita ...*

*“La fotografia è la mia benzina, è quello che mi dà l’energia e la forza di muovermi e vivere ogni giorno”.*

Gianni Berengo Gardin

# SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	7
CAP. I - ECTODERMAL DYSPLASIA SYNDROMES.....	10
CLASSIFICAZIONI.....	10
Classificazione di Freire-Maia e Pinheiro.....	10
Classificazione di Priolo e Laganà .....	11
Classificazione di Lamartine .....	14
ASPETTI CLINICI .....	16
Manifestazioni di interesse dermatologico .....	16
Manifestazioni di interesse oculistico .....	19
Manifestazioni di interesse otorinolaringoiatrico e stomatologico .....	20
Manifestazioni d'interesse odontoiatrico .....	21
Altre manifestazioni .....	25
PATOGENESI .....	26
Il pathway EDA di attivazione NF- $\kappa$ B .....	26
Fattori di trascrizione .....	35
Proteine per l'adesione e comunicazione tra cellule .....	38
MODELLI SPERIMENTALI ANIMALI .....	42
DIAGNOSI GENETICA .....	51
Il sequenziamento genetico .....	54
454 genome sequencer .....	56
Illumina/solexa .....	57
ABISOLiD.....	59
Polonator G.007 .....	61
Helicos HeliScope .....	61
DIAGNOSI PRENATALE.....	63
Ecografia.....	63

DNA fetale circolante .....	64
DIAGNOSI CLINICA .....	67
TERAPIE SPERIMENTALI .....	69
Terapia con proteina ricombinante .....	69
Terapia rigenerativa con cellule staminali .....	73
TERAPIA MULTIDISCIPLINARE .....	83
Terapia dermatologica .....	83
Terapia otorinolaringoiatrica .....	85
Terapia oculistica .....	86
CAP II – TERAPIA ODONTOIATRICA .....	88
TERAPIA CON PROTESI FISSA .....	92
TERAPIA CON PROTESI RIMOVIBILE .....	93
TERAPIA ORTODONTICA .....	97
RIABILITAZIONE IMPLANTARE.....	98
Accrescimento mandibolare .....	100
Accrescimento del mascellare .....	101
Età per inserimento implantare.....	102
Problematiche legate all’inserimento implantare precoce .....	104
Raccomandazioni .....	106
CAP III – MATERIALI E METODI .....	107
PROTOCOLLO DI RICERCA (2008).....	107
RISULTATI .....	<b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>
DISCUSSIONE.....	<b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>
SINTESI ATTIVITÀ DI RICERCA.....	122
Italiano .....	122
Inglese .....	123

# INTRODUZIONE

Le Displasie Ectodermiche (*Ectodermal Dysplasias syndrome - EDs*) rappresentano un vasto ed eterogeneo gruppo di sindromi polimalformative caratterizzate da ipoplasia, aplasia o distrofia dei derivati ectodermici (Priolo M., 2009) (Montanari M., 2012). È correntemente in uso la definizione di Displasia Ectodermica come una qualsiasi condizione sindromica in cui coesistano aspetti patologici di due o più derivati ectodermici; in tal senso si rilevano difetti di capelli, unghie, denti e ghiandole sudoripare, ma anche di cute, peli, ghiandole sebacee, epiteli altamente specializzati quali la retina e parti dell'orecchio interno (Baskan Z., 2006). Condizioni displasiche dei derivati mesodermici e, più raramente, endodermici possono altresì coesistere (Itin PH., 2004).

Fù il medico tedesco Danz a descrivere per la prima volta, nel 1793, due bambini affetti da atrichia ed anodonzia congenite e nel 1848 anche l'inglese Thurnam riportò due casi simili. Darwin, più tardi, descrisse nel libro *"The Variations of Animals and Plants under Domestication"* dieci uomini, membri della stessa famiglia nella regione indiana del Sind, con le caratteristiche proprie della Displasia Ectodermica Ipoidrotica. Il ricercatore osservò la presenza di soli quattro incisivi di ridotte dimensioni ed otto molari nei mascellari di questi individui, la scarsa peluria e la precoce calvizie. Inoltre notò come: *"nessuna figlia fu colpita da questa affezione sebbene le figlie non ne fossero colpite, esse trasmettevano questa tendenza ai loro figli; e non si conosce esempio di trasmissione di figlio in figlio"*.

Il termine Displasia Ectodermica venne per la prima volta utilizzato da Weech nel 1929. Egli ne specificò tre aspetti essenziali: la maggior parte dei disturbi colpiscono i tessuti di origine ectodermica, suddetti vengono bloccati nei loro processi di sviluppo ed infine l'importante ruolo causale dell'ereditarietà. Nel delineare questi criteri diagnostici Weech fece riferimento alla forma Ipoidrotica legata al cromosoma X. Non mancò tuttavia di notare alcuni casi in cui i sintomi della malattia comparivano in individui di sesso femminile od erano soggetti ad una trasmissione non legata al sesso, riconoscendo la grande eterogeneità di manifestazioni.

Nel 1971 erano conosciute solo otto forme di Displasia Ectodermica (Freire-Maia N., 1984). Attualmente la terminologia EDs sottende ad un gruppo di più di 200 quadri

sindromici clinicamente distinti. Tra questi solo per un 30% si è individuata la mutazione genetica responsabile (64 geni e tre regioni cromosomiche) (Visinoni AF., 2009). La trasmissione ereditaria si manifesta secondo tutte le possibili modalità Mendeliane: autosomica dominante e recessiva ed X-linked dominante e recessiva. Tra queste rare sindromi la più comune è la Displasia Ectodermica Ipoidrotica (Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia, H.E.D.), particolarmente nella sua forma X-linked, manifestante una penetranza completa nel sesso maschile. Secondo le statistiche riportate dall’A.N.D.E. (Associazione Nazionale Displasia Ectodermica) e dall’americana N.F.E.D. (National Foundation for Ectodermal Dysplasia) la HED., conosciuta anche come Christ-Siemens-Touraine, ha un’incidenza di 1 su 100.000 nati vivi e rappresenta il 70% circa di tutte le E.D.s (Motil KJ., 2005). L’incidenza aumenta a 7 su 10.000 nati vivi considerando l’intero spettro di sindromi a livello internazionale (N.F.E.D.).

Si tratta pertanto di malattie rare con una vasta gamma di sintomi e manifestazioni che richiede di conseguenza un trattamento medico interdisciplinare che coinvolge diversi specialisti.

Si rilevano infatti spesso nelle EDs agenesie e malformazioni nella dentatura primaria e secondaria, di variabile gravità e con un variabile grado di compromissione dei fisiologici pattern di crescita craniofacciale, in parte condizionati dall’eruzione e permuta dentaria. Per questo motivo i pazienti affetti da tali sindromi impegnano l’odontoiatra in trattamenti che coinvolgono ogni branca di questa disciplina. Unendo condizioni sfavorevoli e generalmente riscontrate in soggetti di età più avanzata (atrofie dei processi alveolari, diminuzione della dimensione verticale del volto, iposalivazione ecc.) con la necessità di una riabilitazione orale che abbia successo nel tempo essi rappresentano una sfida in cui la vittoria risulterà esser un significativo miglioramento della qualità di vita.

Scopo del nostro lavoro è fornire una revisione delle attuali conoscenze eziopatogenetiche delle EDs e della loro classificazione, nonché di illustrare le attuali possibilità diagnostiche e terapeutiche ad oggi in uso. Offriremo una panoramica sulle potenzialità della sperimentazione animale nell’individuare nuove strade terapeutiche, tratteremo in sintesi le terapie delle differenti manifestazioni. Lo studio si concentrerà sulla riabilitazione orale con protesi mobili implanto-supportate, riportandone l’esperienza clinica maturata negli anni presso il Servizio di Assistenza Odontoiatrica per

Disabili del DIBINEM e analizzando lo spostamento tridimensionale tramite tracciati cefalometrici a cinque anni degli impianti a supporto delle overdenture.

# CAP. I - ECTODERMAL DYSPLASIA SYNDROMES

## CLASSIFICAZIONI

*È da tempo avvertita l'esigenza di una classificazione per le Displasie Ectodermiche. Un sistema di classificazione chiaro e intuitivo porrebbe il clinico nella condizione di una diagnosi certa, una volta individuati i tratti clinici ed i riscontri genetico-molecolari patognomonici per le singole sindromi.*

*Diversi i tentativi di classificazione proposti fino ad oggi, la loro evoluzione è gioco forza legata a quella delle nuove acquisizioni nel campo delle indagini genetiche e molecolari. Il progresso nelle conoscenze eziologiche di alcune EDs ha influenzato l'approccio classificatorio, passando da una maggiore rilevanza dei segni clinici ad una centralità dei meccanismi genetici che sottendono alla malattia, o perlomeno ad un tentativo di associarli a caratteristici tratti fenotipici. Passeremo in rassegna i principali sistemi di classificazione proposti dal 1994 ad oggi.*

### **Classificazione di Freire-Maia e Pinheiro**

La prima classificazione clinica di riferimento per le EDs fu redatta da Freire-Maia e Pinheiro nel 1994. Attraverso una vasta revisione dei casi gli autori giunsero alla distinzione delle Displasie Ectodermiche basata sulle manifestazioni fenotipiche di più frequente riscontro. Queste sono la tricodisplasia, difetti dentali, oncodisplasia e disidrosi. Furono numerate da uno a quattro. Caratteristiche fenotipiche riguardanti difetti ectodermici di altra natura vennero raggruppati in un'unica entità, numerata con cinque. Furono poi individuati due gruppi principali, A e B. Al gruppo A fanno capo tutte le EDs che presentano interessamento di almeno due delle prime quattro caratteristiche numerate. Nel gruppo A si individuano dunque undici sottogruppi in base alle diverse associazioni possibili: 1-2; 1-3; 1-4; 2-3; 2-4; 3-4; 1-2-3; 1-2-4; 1-3-4; 2-3-4; 1-2-3-4. Il gruppo B comprende patologie che coinvolgono una struttura di base (numerazione da uno a quattro) ed un difetto in altri derivati ectodermici (cinque). Comprende quindi quattro sottogruppi: 1-5; 2-5; 3-5; 4-5. L'eziologia è considerata con distinzione di trasmissione autosomica dominante o recessiva, di X-linked dominante o recessiva o sconosciuta.

Questa classificazione clinica focalizzata sulla diagnosi è utile per l'insegnamento (Salinas CF., 2009). Inoltre mette in luce dei pattern di sintomi che potrebbero essere di stimolo alla ricerca di meccanismi eziologici e funzionali comuni (Salinas CF., 2009). Essa non prende tuttavia molto in considerazione la variabilità di espressione che si osserva nelle EDs ed in generale in tutti i disordini ad eredità Mendeliana. Può esservi sovrapposizione di sintomi tra quelle che sono considerate entità distinte, o viceversa espressioni fenotipiche eterogenee in situazioni con patogenesi in comune. Talvolta i segni clinici non sono facilmente misurabili e quantificabili, possono non avere netta demarcazione o essere interamente mancanti.

### **Classificazione di Priolo e Laganà**

La classificazione inizialmente proposta da questi autori nel 2001 non abbandona la considerazione delle manifestazioni cliniche, tuttavia esse perdono il loro ruolo chiave nel determinare la sindrome. Con questo sistema l'osservazione particolareggiata del fenotipo non rappresenta il discriminatore classificatorio in quanto vi è solo una associazione di caratteri fenotipici ricorrenti per sindromi con meccanismi patogenetici simili. Questa classificazione clinico-funzionale (Tab. I - II) suddivide le EDs in due gruppi. Nel gruppo 1 si collocano i disordini in cui si riconosce un difetto delle interazioni epitelio-mesenchima. Tutti i geni coinvolti in questo gruppo regolano l'espressione di proteine coinvolte nella comunicazione tra ectoderma e mesoderma ed eventualmente il controllo della differenziazione e sopravvivenza cellulare. Due sono i principali pattern funzionali di queste interazioni ad oggi identificati e studiati. Il primo coinvolge il pathway di segnalazioni Ectodisplasia-Edar-Edaradd (Koppinen p., 2001). Il secondo coinvolge alcuni regolatori della trascrizione o dell'espressione di geni, come ad esempio P63, DLX3, MSX1, EVC2 ed EVC (Priolo M., 2001). Clinicamente il gruppo 1 presenta un maggior coinvolgimento dei derivati ectodermici e talvolta alterazioni scheletriche (Priolo M., 2009). Il gruppo 2 contiene invece le sindromi dovute ad alterazione di proteine funzionali o strutturali. Queste proteine sono localizzate nelle giunzioni aderenti, gap junction, o nella membrana apicolaterale e dunque essenziali per la strutturazione cellulare, la comunicazione intercellulare, il mantenimento della omeostasi tissutale, il controllo di crescita, sviluppo e risposta sincronizzata delle cellule di un tessuto agli stimoli esterni (Richard, 2001). Clinicamente si assiste ad anomalie

dermatologiche come il cheratoderma palmoplantare o al coinvolgimento di epiteli altamente differenziati ( distrofia retinica, sordità). Nel gruppo 1 dunque si ha un fenotipo di ipo-aplasia nei derivati ectodermici con un loro fallace sviluppo e differenziamento dovuto ad una mancanza dei corretti e reciproci stimoli induttivi tra ectoderma e mesoderma nell'embriogenesi. Nel gruppo 2 i segnali induttivi sopracitati sono conservati, così come il differenziamento dei derivati ectodermici, ma si osserva un loro fenotipo patologico perché sono alterati l'omeostasi tissutale o il controllo di crescita. I derivati ectodermici si formano e differenziano in maniera fisiologica ma divengono displastici per alterazioni delle interazioni intercellulari o per una intrinseca disorganizzazione della compartimentazione del citoscheletro. Alla luce di queste considerazioni sono stati distinti o raggruppati alcuni quadri precedentemente classificati solo sulla base di una osservazione clinica. Ad esempio la HED autosomica, prima distinta in dominante o recessiva, è ora suddivisa in quattro entità per mutazioni autosomiche o recessive al gene EDAR ed autosomiche o recessive al gene EDARADD. Esempio contrario, EEC, EEC-like, AEC, ADULT, Sindrome Limb-mammary e Rapp-Hodgkin, identificate nelle precedenti classificazioni come specifiche identità, sono ora raggruppate sotto lo spettro definito "*disordini p63-related*".

I vantaggi di un approccio classificatorio molecolare risiedono nella sua obiettività e nella focalizzazione sulla patogenesi. Tuttavia le interazioni tra genotipo e fenotipo per le EDs rimangono scarsamente comprese. La mancanza di una mutazione non esclude poi una diagnosi di ED, data l'incompleta conoscenza dell'intero spettro di mutazioni causali di queste sindromi. L'analisi dei singoli pazienti a livello molecolare non è generalmente l'approccio iniziale con cui si raggiunge una diagnosi, piuttosto suggerita al medico dalle manifestazioni cliniche.

TABLE 1. List of the Identified EDs Genes Divided into Two Groups [Pritzke and Leganek, 2009].

Gene symbol	OMIM entry	Locus	Protein	Disease	Inheritance	Localization	Function
Group 1							
ED 1	300451	Xq12-q13	Ectodysplasin (EDA)	Anhidrotic ectodermal dysplasia	XLR	Soluble molecule	Triggering ligand molecule
ED 4A	609095	3q13	EDAR	Anhidrotic ectodermal dysplasia	AR	Cellular membrane	Transmembrane receptor of EDA
ED 4A/ED	609503	14q12-q13	EDAR-anchored death domain	Anhidrotic ectodermal dysplasia	AR	Cytoplasm	Intracellular molecule: adaptor of EDAR death domain
ED 4A/ED	300249	14q20	EDAR-anchored essential modulator	Anhidrotic ectodermal dysplasia	XLR	Cytoplasm	EDAR cytoplasmic inhibitor
ED 4	156000	14q13	EDAR	Anhidrotic ectodermal dysplasia-immune deficiency	XLR		
ED 3	601073	3q27	p63	Anhidrotic ectodermal dysplasia-immunodeficiency	XLR		
				Anhidrotic ectodermal dysplasia-immunodeficiency	AR	Cytoplasm	Ki-67 cytoplasmic inhibitor
				Immunodeficiency	AR	Nucleus	Transcription factor
				Edwards/pachydermia	AR		
				dysplastic achil's palate syndrome	AR		
				Andy lobophares-ectodermal	AR		
				dysplastic achil's palate syndrome	AR		
				Auto-dermatitis-ungual-lactimal-tooth syndrome	AR		
				Limbaramery syndrome	AR		
				Rapp-Hodgkin syndrome	AR		
				Ticho-dento-osseous syndrome	AR		
				Widup disease	AR		
				Ellis van Creveld syndrome	AR		
				Werner acrodermal dysplasia	AR		
				Ellis-van Creveld syndrome	AR		
Group 2							
ED 6	604418	13q12	Connexin 30	Conduction syndrome	AR	Cellular membrane	Connexin protein, intercellular junction
ED 12	603644	11q23q24	Nectin 1	Orbit hypoplasia ectodermal dysplasia	AR	Cellular membrane	Tight junction cellular membrane stability
ED 13	601975	1q12	Plakophilin 1	Ectodermal dysplasia-achil's	AR	Cellular membrane	Desmosomal plaque
ED 14	114021	16q22.1	Cadherin 3	fragile syndrome	AR	Cellular membrane	major accessory protein
ED 15A	605200	3q15	Wnt10A	Ectodermal dysplasia, ectrodactyly, and mental dysplasia	AR	Soluble molecule	Adhesion molecule, cell-cell binding function
				Odontogenectodermal dysplasia	AR		β-catenin-mediated specific intracellular signaling

TABLE II. Schematic Representation of Groups 1 and 2 Main Differences

	Group 1	Group 2
Functional defect	Epithelial-mesenchymal interaction	Cell-cell adhesion and communication
Target	Nucleus	Highly differentiated membrane domains
Mechanism involved	Differentiation, cell survival, apoptosis regulation	Tissue homeostasis, growth control, development, stability of cell membrane and cytoskeleton compartment
Clinical key signs	"Pure" EDs, No other dermatologic signs, Skeletal anomalies	"Dermatologic" EDs, Other ectodermal structures or highly differentiated epithelia involved

dalle famiglie, i test genetici possono avere un alto costo e molte EDs non sono ancora state delineate a livello molecolare (Salinas CF., 2009).

## Classificazione di Lamartine

Proseguendo idealmente il percorso di enfattizzazione delle conoscenze genetiche come chiave per la distinzione e classificazione delle EDs, nel 2003 Lamartine propose una nuova classificazione. Essa suddivide (Tab. III) le Displasie in quattro gruppi, che distinguono forme sindromiche dovute a mutazioni in:

- *geni che regolano principalmente la comunicazione intercellulare e le vie di trasmissione del segnale correlate*
- *geni che regolano la trascrizione*
- *geni che regolano lo sviluppo embrionale*
- *geni implicati nell'adesione intercellulare*

Se da un lato questo approccio offre i già citati vantaggi della classificazione della Priolo, dall'altro vengono escluse tutte le patologie sindromiche per cui non sia ancora stata identificata una precisa causa genetica. Trascurare gli aspetti clinici che si manifestano in queste malattie riduce drasticamente il numero delle stesse che possono essere incluse nella classificazione (sono infatti meno di trenta sindromi), rendendola meno fruibile nella pratica clinica.

*Le Displasie Ectodermiche sono patologie che interessano diverse strutture del corpo umano. Il trattamento coinvolge perciò diversi specialisti: medici generici, dermatologi, otorinolaringoiatri, odontoiatri generici e specialisti, nonché genetisti, ricercatori ed esperti in diagnostica molecolare. Un sistema di classificazione fruibile da tutte queste categorie è l'obiettivo da raggiungere.*

I futuri schemi classificatori dovrebbero favorire il lavoro del clinico (pensiero interdisciplinare ed associativo) ma anche fornire basi utili al classificatore (pensiero logico e approfondimento analitico). Non ultimo la classificazione delle EDs dovrebbe tenere in considerazione la quantificazione del grado di invalidità legato alle singole sindromi per una più facile comunicazione con le famiglie, il Sistema Sanitario Nazionale o le compagnie assicurative.

**Tab III: Classificazione di Lamartine**

Disease	OMIM	Inheritance	Causative gene	Protein	Putative protein function
<b>Cell-cell communication and signalling</b>					
Anhidrotic ED (ED1)	305100	XR	<i>EDA</i>	Ectodysplasin	Soluble ligand, activates NF-κB pathway
Hypohidrotic ED (ED3)	129490	AD	<i>DL</i>	EDAR	EDA receptor
ED hypohidrotic	224900	AR	<i>DL</i>	EDAR	EDA receptor
ED hypohidrotic	224900	AR	<i>EDARADD</i>	EDARADD	Interacts with EDAR
Hidrotic ED (ED2, Clouston syndrome)	129500	AD	<i>GJB6</i>	Cx30	Form gap-junctions channels
Palmoplantar keratoderma with deafness	148350	AD	<i>GJB2</i>	Cx26	Form gap-junctions channels
Incontinentia pigmenti type 2	308300	XD	<i>NEMO</i>	IKK-gamma	Regulator of kinase phosphorylating IκB
Hypohidrotic ED/Immune deficiency	300291	XR	<i>NEMO</i>	IKK-gamma	Regulator of kinase phosphorylating IκB
OLEDAID syndrome	300301	XD	<i>NEMO</i>	IKK-gamma	Regulator of kinase phosphorylating IκB
<b>Adhesion</b>					
Margarita island ED (ED4)	225060	AR	<i>PVRL1</i>	Nectin-1	Ig-related cell-cell adhesion molecule
ED/skin fragility syndrome	604536	AR	<i>PKP1</i>	Plakophilin 1	Desmosomal protein
HJMD syndrome	601553	AR	<i>CDH3</i>	P-Cadherin	Calcium dependant cell adhesion molecule
Regulation of transcription					
Electrodactyly ED facial clefting	129900	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
Ankyloblepharon ED (AEC)	106260	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
ADULT syndrome	103285	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
SHFM syndrome	183600	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
Limb-Mammary Syndrome (LMS)	603543	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
Hypoparathyroidism renal dysplasia (HDR)	146255	AD or AR	<i>GATA3</i>	GATA3	Transcription factor
Ellis-Van Creveld syndrome (EVC)	225500	AR	<i>EVC</i>	EVC	DNA binding protein, putative transcription factor
<b>Development</b>					
Withkop syndrome	189500	AD	<i>MSX1</i>	Hox7	Putative homeodomain protein expressed in embryo
SMMC1 syndrome	147250	?	<i>SHH</i>	Sonic Hedgehog	Specifies the dorso-ventral polarity of neural tube during development
<b>Others</b>					
Rothmund-Thomson syndrome (RTS)	268400	AR	<i>RECQL4</i>	RecQ protein like 4	Helicase, involved in DNA replication, repair and recombination
Dyskeratosis congenita (DKC)	127550	XR	<i>DKC1</i>	Dyskerin	Component of the telomerase ribonucleoprotein
Marshall syndrome	154780	AD	<i>COL11A1</i>	Collagen type XI, alpha 1	Protein of the extracellular matrix

AD, Autosomal dominant; AR, autosomal recessive; XR, X-linked recessive; XD, X-linked dominant; ?, unknown.

## ASPETTI CLINICI

*Le Displasie Ectodermiche presentano una serie di caratteri fenotipici variabili nella manifestazione anche in individui affetti dalla stessa sindrome. Se alcuni di essi sono comuni a diverse patologie altri sono di più raro riscontro e caratteristici di singoli quadri. Nonostante la descrizione di questi pazienti abbia radici storiche piuttosto remote, lo studio estensivo dei segni tipici delle EDs è recente e tuttora difettivo per una difficoltà, intrinseca alla rarità delle stesse, nell'analizzare campioni numerosi di pazienti. Per tale ragione molti degli aspetti descritti sono stati evidenziati da studi con una numerosità campionaria di poche decine di pazienti e potrebbero essere convalidati o ridimensionati nella loro peculiarità in futuro.*

### **Manifestazioni di interesse dermatologico**

La cute e gli annessi cutanei sono tra le strutture maggiormente colpite in questo gruppo di sindromi. In molte di esse la cute appare secca e ruvida, con tendenza alla desquamazione (particolarmente sul volto ed in regione plantare) ed agli episodi eczemicici. La Displasia Ectodermica Ipoidrotica (HED) presenta peculiarmente cute sottile ed ipopigmentata; spesso si riscontra assenza di papille dermiche. La fragilità cutanea è un segno clinico rilevante. Essa è accentuata nel raro disordine Displasia Ectodermica con fragilità cutanea (ED/skin fragility syndrome). In questo caso si evidenziano vesciche ed erosioni plantari nei punti di pressione delle soles alla deambulazione prolungata o protratto ortostatismo (McGrath JA., 1999). Anche le infezioni cutanee sono di ricorrente riscontro. Un caso limite è rappresentato dalla Displasia Ectodermica Anidrotica con immunodeficienza (EDA-ID), con infezioni ricorrenti ed estese. Nella sindrome di Clouston la cute è spessa e ruvida, si riscontra sempre cheratoderma palmo-plantare progressivo con accentuazioni puntiformi. Il prelievo bioptico rivela in queste regioni paracheratosi, acantosi, spongiosi, blanda infiltrazione linfocitaria perivascolare nel derma papillare (Akhyani M., 2007). L'ipercheratosi palmo-plantare è diffusa in altre sindromi come ad esempio ED/skin fragility o la Displasia Ectodermica con labio-palatoschisi (CLPED1). L'iperpigmentazione è altra caratteristica spesso presente. Talvolta assume distribuzione peculiare in base alla patologia. Nelle HED si osserva sovente iperpigmentazione periorbitaria persistente (Fig. 1). Nella sindrome di Clouston è focalizzata a livello di nocche, gomiti, ascelle, areole e zona pubica (Priolo M., 2009).

Nella sindrome Acro-dermato-onico-lacrimo-dentale (ADULT) l'iperpigmentazione è lentiginosa.

**Fig 1:** Cute secca e rugosa con pigmentazione periorbitaria in paziente affetto da HED in età infantile



Nell'Incontinentia Pigmenti (IP2) si osservano macule pigmentate brune sul tronco. Inoltre possono manifestarsi in tale condizione patologica lesioni eritemato-vescicolo-bollose a gittate successive a disposizione lineare sul tronco e sugli arti. La disposizione delle lesioni avviene lungo le linee di Blaschko (mosaico della distribuzione dei melanociti con formazione di figure a V nel dorso ed a S nella parte anterolaterale del tronco). In uno stadio successivo, tra la seconda e la sesta settimana di vita, compaiono reazioni lichenoidi, ipercheratosiche e verrucose con aspetto di strie allungate alle estremità distali degli arti. Le macule compaiono spesso tra il terzo ed il sesto mese di vita, tuttavia le manifestazioni fenotipiche della IP possono essere molto variabili ed anche blande, venendo spesso identificate dopo la diagnosi in un altro membro della famiglia (Berlin AL., 2002). Anchilobrefaron è presente nella sindrome Displasia Ectodermica-anchiloblefaron-palatoschisi.

Il coinvolgimento delle ghiandole sudoripare è riscontrato in diverse EDs. L'importanza di questa manifestazione trascende il puro interesse dermatologico in quanto

compromette l'omeostasi della temperatura corporea. Conseguenza di una ridotta o mancata sudorazione sono episodi febbrili che possono essere aggravati nei casi più drammatici da convulsioni e danni neurologici (Segurado Rodriguez M.A., 2002). Inoltre il minor rilascio di sodio e di cloro con le secrezioni ghiandolari comporta alcalosi metabolica. I meccanismi compensatori che si attivano sono la diuresi e la tachipnea. Il respiro ansimante consente infatti il movimento di grandi quantità d'aria sulla superficie della lingua, della bocca e della trachea favorendone un abbassamento di temperatura, agevolato altresì da una maggiore evaporazione della saliva. Papule ipercheratosiche possono essere presenti allo sbocco delle ghiandole sudoripare, simulando eruzioni miliari al volto. Clinicamente si riscontrano Displasie Ectodermiche anidrotiche (aplasia delle ghiandole sudoripare), ipoidrotiche (ipoplasia) od idrotiche. HED ed EDA-ID sono esempi di malattie con ipoplasia od aplasia ghiandolare. La sindrome di Clouston è uno dei primi quadri sindromici idrotici che siano stati descritti.

Anche le ghiandole sebacee, al pari delle sudoripare, possono essere aplastiche o più spesso ipoplastiche. Nella cute di viso, pieghe ascellari ed inguinali sono spesso normalmente conservate (Bal E., 2008). Il sebo idrata lo strato corneo epidermico ed il suo pH acido è un'importante difesa per la cute; l'ipoplasia delle ghiandole sebacee si correla alle frequenti irritazioni cutanee. Si sono riscontrati rari casi di iperplasia ghiandolare paradossa (Masse J.F., 1994).

Le unghie si presentano in generale poco sviluppate. Possono essere presenti discolorazioni, striature, anomalie di forma (ispessimento, iperconvessità) o di struttura (unghie fragili). Possono presentarsi infezioni croniche del perionichio ed ipercheratosi subungueale (Akhyani M., 2007). Onicodisplasia si riscontra ad esempio nelle sindromi, IP, CLPED1, ADULT, Clouston. In quest'ultima si possono anche verificare ipoplasia o più raramente anonichia. Nella sindrome di Witkop le unghie sono piccole ed a crescita lenta nel bambino, più severamente affette ai piedi con comparsa di striature longitudinali.

I capelli sono frequentemente radi e sottili, ipopigmentati e corti fino a quadri di completa alopecia (Fig. 2). Si possono osservare alterazioni del fusto e pili torti.



**Fig. 2:** capelli radi ed ipopigmentati, con aree di alopecia

Barba e baffi nell'uomo hanno generalmente al contrario un normale sviluppo, in quanto esso è regolato dagli ormoni androgeni ed indipendente dalle interazioni ectomesenchimali dell'embriogenesi. Nella sindrome Trico-dento-ossea (TDO) si manifestano capelli contorti che in metà dei casi si lisciano con l'età [Prince et al., 1998]. Capelli fini e radi si riscontrano ad esempio nella sindrome di Ellis-van Creveld (EVC), in HED e nella sindrome Displasia Ectodermica-ectrodattilia-distrofia maculare (EEM). In quest'ultima può essere presente alopecia o ipotricosi. Anche le sopracciglia e le ciglia possono essere rade od assenti, così come nella sindrome di Clouston. Anche in IP si può osservare alopecia, perlopiù a chiazze come conseguenza dell'evoluzione atrofico-cicatriziale delle lesioni.

### **Manifestazioni di interesse oculistico**

Le ghiandole lacrimali possono essere variamente interessate. In alcune sindromi, come HED, possono apparire aplastiche. In altri casi, come in ADULT, si riscontra frequentemente ostruzione dei dotti lacrimali. La riduzione della lacrimazione comporta secchezza congiuntivale con conseguenti cheratocongiuntiviti secche e predisposizione a danni corneali. In pazienti affetti da HED si sono osservate panuveiti bilaterali (Rodriguez

N., 2002). Possono essere primitivamente coinvolte strutture ectodermiche oculari come cornea, cristallino e retina. Ne conseguono displasia corneale e più raramente opacità corneale e lenticolare, cataratte e strabismo. Nella IP possono essere ad esempio presenti retinite, uveite, cataratta od atrofia del nervo ottico, fino alla cecità in alcuni casi. La EEM presenta distrofia maculare, con lesioni all'epitelio retinico pigmentato che si presenta atrofico ed iperpigmentato (Priolo M., 2009).

### **Manifestazioni di interesse otorinolaringoiatrico e stomatologico**

Numerose sono le manifestazioni di interesse otorinolaringoiatrico che possono osservarsi nelle EDs. Esse tuttavia raramente si presentano quali caratteri distintivi e frequentemente riscontrabili per specifiche sindromi data la grande variabilità di penetranza più volte rimarcata per queste malattie.

L'aplasia o più frequentemente l'ipoplasia delle ghiandole mucipare si ripercuote sul fisiologico funzionamento di tutte le strutture costituenti le vie aeree e digestive superiori (vads). Alterazioni quantitative e qualitative nella produzione del muco compromettono la clearance muco-ciliare delle vie respiratorie superiori, privando l'individuo dell'azione protettiva di inglobamento ed espulsione di sostanze estranee. L'aria inspirata ha inoltre bisogno di essere umidificata, sin quasi a saturazione (l'aria che giunge in laringe è satura fino al 95% di vapore acqueo). Strettamente legato all'umidificazione è anche il riscaldamento dell'aria (circa 36°C in faringe). La stasi mucosa può provocare ostruzione nasale cronica con incrostazioni tenaci di secrezioni mucose precipitate e fetide (ozena). Riniti e sinusiti secondarie dei seni paranasali possono manifestare un carattere ricorrente o cronico. Si osservano talvolta riduzione dei seni frontali ed ipertrofia della membrana schneideriana dei seni mascellari (Daniel E., 2002). L'ispessimento del muco, le caratteristiche dell'aria inspirata e le infezioni dell'albero tracheo-bronchiale possono inoltre causare infezioni polmonari ricorrenti. Frequenti sono anche le manifestazioni allergiche (eczema, asma bronchiale con atalectasia, riniti allergiche). La secchezza dell'aria oltre a favorire le incrostazioni determina una generale disidratazione delle mucose con possibili ricorrenti epistassi. Aumenta la predisposizione a faringiti, laringiti e bronchiti croniche. L'inadeguata lubrificazione delle corde vocali può inoltre causare raucedine, ipertrofia ed anche

noduli alle stesse (Daniel E., 2002). Anche la tuba di Eustachio risente delle conseguenze delle alterazioni nel muco, con otiti medie sierose ricorrenti o croniche.

L'orecchio può direttamente essere interessato da alterazioni delle strutture di origine ectodermica con particolare riguardo alle ghiandole ceruminose e all'epitelio squamoso che riveste il terzo medio del meato. In esso risulta compromesso il fisiologico movimento di scorrimento del cerume dall'interno verso l'esterno, con conseguente formazione di tappi. Data la natura igroscopica di questi possono aversi episodi di occlusione auricolare, autofonia ed acufeni con il soggiorno in ambiente umido o al semplice movimento della massa ceruminosa per compressione sul trago, ad esempio durante il sonno. La complicanza più grave del tappo di cerume e delle otiti medie è la sordità di tipo conduttivo; la sua insorgenza precoce può portare a problemi di linguaggio se trascurata. In alcune sindromi, come Clouston si assiste a perdita di udito neuro-sensoriale (Daniel E., 2002). Tipica in molte sindromi è la malformazione dei padiglioni auricolari che appaiono larghi, sottili, prominenti, deformi e con bassa attaccatura, contribuendo a definire una tipica facies sindromica.

Nel cavo orale si osserva riduzione del flusso salivare con xerostomia. Ciò è imputabile a congenita alterazione delle ghiandole salivari che possono mostrare segni di infiammazione, ectasia duttale, aplasia od ipoplasia del parenchima (Bergendal B., 2006). La xerostomia comporta difficoltà nella masticazione e disfagia, aggravate dal frequente riscontro di una dentizione anomala e dall'ipoplasia delle ghiandole mucipare rispettivamente. Può inoltre predisporre alla patologia cariosa e parodontale. Ad incidere sulla corretta funzione è anche una muscolatura periorale e masticatoria ipotonica, sembra a causa di un deficit di sviluppo dello strato mesenchimale (Cawood J.L., 1991). Anomalie della lingua variano da macroglossia relativa all'atrofia delle papille gustative fungiformi e filiformi riportate nella Displasia Odonto-onico-dermica (OODD) (Adaimy L., 2007).

### **Manifestazioni d'interesse odontoiatrico**

Anomalie di numero, forma, struttura e tempi di eruzione interessano la dentizione primaria e permanente in molte EDs, rappresentando uno dei caratteri fenotipici peculiari e distintivi delle stesse. Le anomalie di numero variano dall'ipodonzia

all'oligodonzia (mancanza di sei o più elementi nella stessa arcata); talvolta si osserva anodonzia (Fig. 3).

**Fig 3:** Edentulia totale in giovane paziente affetto da X-linked HED



Anomalie di numero in difetto si notano ad esempio in HED, CLEPD1, EVC, EEM e molte altre. È stata riportata per la X-linked HED una media di 3,50 denti mascellari mancanti e 5,33 denti mandibolari mancanti nella dentatura primaria. I denti decidui più spesso mancanti, con frequenza decrescente sono gli incisivi mandibolari, gli incisivi laterali mascellari, i centrali mascellari, i molari mandibolari ed i primi molari mascellari (Barberia E., 2006). In dentizione permanente l'oligodonzia e l'ipodonzia sono apparse rispettivamente in percentuali dell'83% e 17% e le agenesie spaziano tra 11,2 e 16,4 elementi mancanti (Barberia E., 2006) (Prager T., 2006). La frequenza di agenesie si conferma più alta nei denti mandibolari (7,9 rispetto a 6,8 nella mascella). I denti più frequentemente mancanti nella mandibola sono, in ordine decrescente, gli incisivi centrali (83%), gli incisivi laterali (73%), i secondi premolari (70%) ed i secondi molari (53%); nella mascella sono invece gli incisivi laterali (86%), i secondi premolari (66%) ed i secondi molari (53%) (Prager T., 2006). Il secondo elemento per ogni tipologia di dente (incisivo laterale, secondo premolare e secondo molare) sembra essere più spesso interessato da agenesia, l'eccezione è costituita dagli incisivi centrali. Circa un 12% di pazienti con HED manifesta anodonzia (Yavuz I., 2006). Nelle forme autosomiche si riscontrano pattern di agenesia sovrapponibili, con una oligodonzia più severa nella

forma recessiva (Van der Hout A.H., 2008). In alcune sindromi come Witkop si possono osservare denti sovranumerari. In questa stessa sindrome possono aversi alterazioni di forma con denti conoidi talvolta spaziati. Nella sindrome di Clouston i denti assumono talvolta forma conoide, così come nella HED dove il riscontro più frequente si ha nel mascellare anteriore (Fig. 4) (Yavuz I., 2006).

**Fig. 4:** caratteristica forma conoide riscontrabile in molte EDs, specie agli elementi mascellari anteriori



La forma affusolata, meno frequente, si ha preferenzialmente agli incisivi (Lexner M.O., 2007). Nella Disostosi acrodentale di Weyer le anomalie si concentrano preferenzialmente sugli incisivi superiori ed inferiori. La microdonzia è comune in malattie come HED, CLPED1, EVC. Anche il taurodontismo affligge i portatori di diverse sindromi, come TDO ed HED, con una predilizione per i secondi molari mandibolari decidui (Glavina D., 2001). Altre anomalie dentali studiate in HED sono le anomalie di forma della radice (30%) ed il riassorbimento esterno (15%) (Yavuz I., 2006). È inoltre riscontrabile talvolta la persistenza dei denti decidui, soprattutto molari da latte e canini (Yavuz I., 2006). In EVC possono aversi ritardi di eruzione, inclusioni dentarie ed ipoplasia dello smalto, così come nella HED. L'allargamento della camera pulpare nel

taurodontismo e l'ipoplasia di smalto e talora dentina predispongono alla patologia cariosa ed a una più rapida evoluzione in pulpite.

Anomalie craniofacciali colpiscono un grande numero di sindromi. Talvolta esse appaiono come manifestazione primaria della sindrome stessa come le anomalie della mandibola nella Disostosi acrodentale di Weyer. Più spesso, sono la conseguenza dell'alterazione dei normali pattern di crescita cranio-facciale derivanti dall'ipodonzia, e di conseguenza direttamente proporzionali alla gravità della stessa. Le classiche dismorfie craniofacciali comprendono ipoplasia mascellare e del terzo medio del volto, il prognatismo mandibolare, un setto nasale depresso talora accompagnato da naso piccolo ed alterazioni nella crescita della base cranica (Lexner M.O., 2007). Prominenza frontale e talvolta bozze frontali, la ridotta altezza facciale, ipoplasia del vertice del cranio, ossa nasali retroinclinate, piega antimongoloide del canto e labbra everse sono altre manifestazioni tipicamente riscontrate che contribuiscono a definire una tipica facies "vecchieggiante" (Lexner M.O., 2007). L'ipoplasia mascellare si estrinseca in una diminuzione o riduzione dell'altezza e della lunghezza di quest'osso; anche il diametro trasverso è ridotto. Il retrognatismo della mascella, confermato da misure angolari (SNA, ANS-Na-S), è una delle caratteristiche craniofacciali che più colpisce (Bondarest N., 2002). Nella X-linked HED si manifesta nel maschio come nelle femmine eterozigote, con una modalità che appare piuttosto indipendente dal grado di ipodonzia (Clauss F., 2008). Il corpo mandibolare può esibire lunghezza normale o ridotta; nonostante questo presenta un'incrementata posizione prognatica relativa, come indicato dall'angolo Pog-Na-S e dalla distanza S-Pog (Clauss F., 2008). Questa condizione, come nell'anziano, è determinata dall'assenza dei denti. Le analisi cefalometriche nei soggetti con EDs, più profusamente attuate su soggetti HED, indicano nel complesso una tendenza alla terza classe. In un piano trasverso, la larghezza facciale inferiore (larghezza facciale bigoniale) dimostra un valore ridotto rispetto a soggetti controllo sani (Saksena S.S., 1990). Le dimensioni facciali verticali sono ridotte in bambini ed adolescenti, mentre sembrano meno accentuate negli adulti; ciò riguarda sia l'altezza facciale anteriore totale (Na-Me), sia l'altezza facciale anteriore inferiore (ANS-Me) e superiore (Na-ANS) (Jonhson E.L., 2002). La base cranica anteriore dimostra tendenza all'ipoplasia, mentre quella posteriore appare soggetta ad un'iperplasia antero-posteriore, essendo registrata un'incrementata deviazione dalla norma per la corrispondente lunghezza (51,9 mm vs.

43,8 mm all'età di tredici-diciassette anni) (Jonhson E.L., 2002). Palatoschisi con o senza labioschisi si hanno in AEC, CLPED1, Eterodattilia-displasia ectodermica-palatoschisi, Sindrome Limb-mammary, e Rapp-Hodgking. Quest'ultima è più raramente interessata da incompetenza velo-faringea od ugula bifida (Salinas C.F., 1988).

### **Altre manifestazioni**

Pazienti con EDA-ID presentano immunodeficienza con ipogammaglobulinemia sierica, livelli di linfociti b normali o aumentati e normale conta di linfociti t. Le altre immunoglobuline presentano valori normali mentre un certo numero di soggetti ha un alto livello di IgM (fenotipo iperIgM) (Mancini A-J-, 2008). Displasia ectodermica anidrotica con immunodeficienza, osteopetrosi e linfoedema (OL-EDA-ID) manifesta lo stesso genere di immunodeficienza accompagnata da linfoedema. Clinicamente i soggetti malati soffrono di infezioni batteriche e micotiche critiche al tratto respiratorio inferiore, ai tessuti molli, alle ossa, al tratto gastrointestinale, e come già detto, alla cute. Nella prima infanzia possono verificarsi setticemia e meningiti (Mancini A-J-, 2008).

In alcune sindromi sono interessate la struttura e il metabolismo ossei. Può manifestarsi l'osteopetrosi, come nella OL-EDA-ID, con ossa deformate, particolarmente radiopache e stenosi del canale midollare. Complicanze dell'osteopetrosi possono essere anemia da insufficienza midollare (per riduzione o scomparsa degli spazi della spongiosa), fratture patologiche per l'abnorme fragilità dell'osso sclerotico e deficit visivi fino a cecità, per restringimento dei fori della base cranica e successiva compressione sul nervo ottico (causati dall'osteosclerosi). In EVC si nota nanismo disarmonico con arti corti per l'accorciamento delle ossa lunghe. Il torace è stretto, le costole corte e si osserva displasia pelvica con ipoplasia dell'ala iliaca. In TDO si assiste ad un aumentata densità ossea della base cranica. Il grado di coinvolgimento delle ossa nel quadro di alterazioni fenotipiche delle EDs necessita di ulteriori indagini che aumentino la numerosità dei campioni di pazienti e delle diverse sindromi. Malformazioni agli arti sono manifestazioni di alcune sindromi come EEC, Sindrome Limb-mammary ed ADULT; tutte presentano ectrodattilia ed alcune un grado variabile di malformazione agli arti. In EVC si ha polidattilia postassiale, come nella Disostosi acrodentale di Weyer. CLPED1 può presentare deformità alle dita di mani e piedi, in EEM sono riscontrati difetti digitali di varia gravità e sindattilia; la mano è maggiormente affetta del piede.

Alcune sindromi possono presentare ipoplasia del capezzolo e della ghiandola mammaria (Sindrome Limb-mammary). Difetti cardiaci congeniti si associano ad EVC, malformazioni congenite dell'apparato genito-urinario riguardano alcune varianti cliniche di CLEPD1 (Sindrome di Zlotogora-Ogur). Anomalie neurologiche si riscontrano in alcuni casi di IP, con interessamento motorio-spastico, convulsioni e deficit intellettivo. Ritardo mentale è anche presente nella Sindrome Sindattilia-Palatoschisi-Ritardo mentale, altra entità clinica della CLEPD1. Deficit del peso sono stati riscontrati in bambini ed adolescenti affetti da EDs. Le anomalie di crescita ponderale sono presenti dalla nascita. Deficit in altezza si riscontrano con maggior frequenza in sindromi diverse da HED (Motil KJ., 2005). Rimangono scarse le indagini sui differenti pattern di crescita nelle diverse sindromi e resta da chiarire quanto le discrepanze di peso rispetto ai soggetti sani siano dipendenti dalle citate difficoltà nella masticazione e deglutizione. Anche disordini gastrointestinali per estesa ipoplasia ghiandolare potrebbero contribuire a suddetti deficit. Insufficienza ipotalamo-pituitaria si rileva in EEC, la HED può talvolta presentarsi come forma peculiarmente associata ad ipotiroidismo. L'alterazioni nella secrezione endocrina di pazienti con EDs è ad oggi tuttavia scarsamente indagata (Motil KJ., 2005).

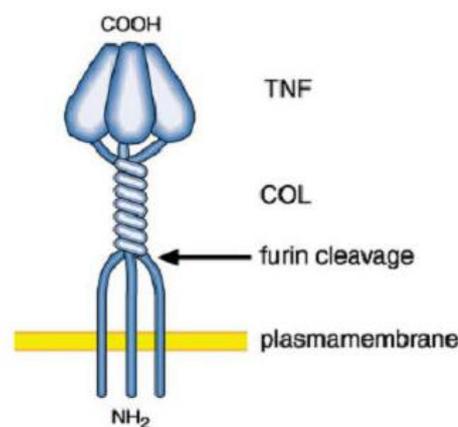
## **PATOGENESI**

Questo capitolo vuole essere una sintesi delle attuali conoscenze ed acquisizioni su una vasta e non ancora largamente indagata serie di complessi meccanismi molecolari che sono la base eziopatogenetica delle EDs. Essa è necessariamente incompleta dato che si conoscono solo 64 geni causativi le cui funzioni non sono sempre chiare alla ricerca. Ci concentreremo pertanto sui meccanismi meglio conosciuti.

### **Il pathway EDA di attivazione NF- $\kappa$ B**

Il gene EDA, localizzato nella regione cromosomica Xq11-12, comprende dodici esoni e, grazie ad un esteso splicing, codifica per diverse isoforme della proteina transmembrana Ectodisplasina A. Tale proteina, prodotto di EDA, è largamente tradotta nelle isoforme Ectodisplasina A1 ed A2 (EDA-A1, EDA-A2), che rappresentano circa l'80% del totale di isoforme e differiscono per due aminoacidi [Yan et al., 2000]. Dei dodici esoni di questo gene otto codificano EDA-A1 ed EDA-A2. L'Ectodisplasina A1 è una

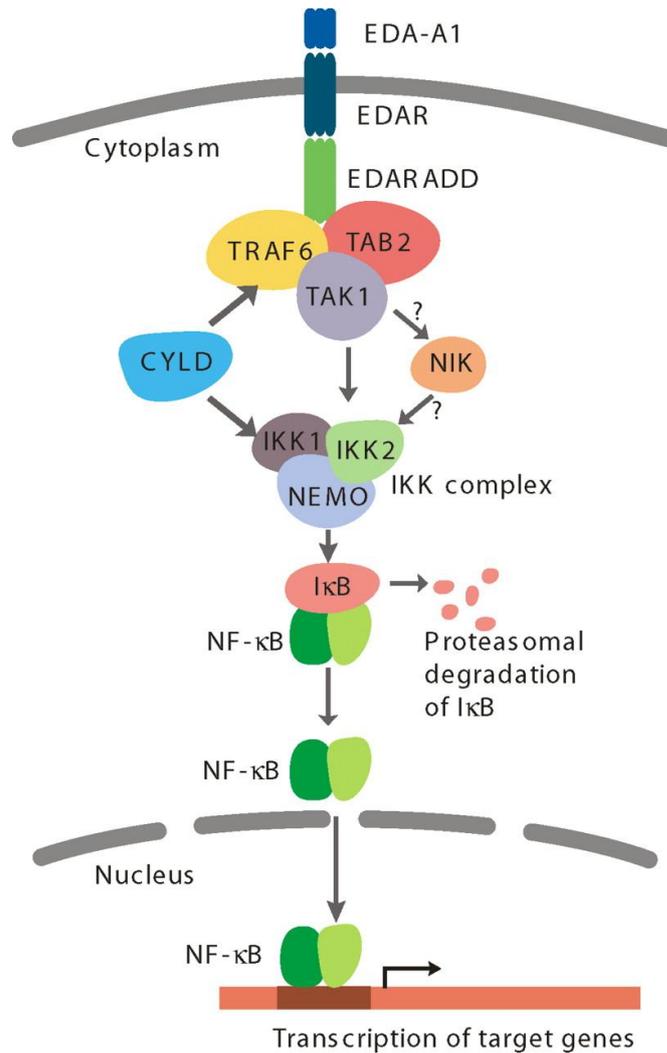
proteina transmembrana multidominio facente parte della famiglia di ligandi Tumor Necrosis Factors (TNF), citochine in grado di promuovere l'apoptosi, la proliferazione e differenziamento cellulare od entrambe. Più precisamente si tratta di una proteina di tipo II con un dominio TNF extracellulare ed un breve dominio collagene al terminale N che forma una tripla elica extracellulare con sito di clivaggio per una proteasi furino simile (Fig. 5). Questa proteasi consente la solubilizzazione di un trimero che agisce come segnale paracrino. Il dominio collagene contribuisce alla stabilità del trimero, per quanto privo dei residui di lisina tipici dei trimeri collagenici (Cui C.Y., 2006)



**Fig. 5:** schema della proteina Ectodisplasi A 1. In evidenza la porzione transmembrana con il terminale N-; il dominio collagene extracellulare (COL) ed il sito per il taglio proteasico (furin clivage) che libera un trimerico solubile contenente il dominio TNF

Il suddetto trimero EDA lega la proteina transmembrana EDAR. Si tratta di una proteina di tipo I, il cui gene è localizzato in 2q13, appartenente alla famiglia dei TNF receptors (TNFRs), in quanto possiede un dominio TNFR ed un dominio di morte intracellulare (Death Domain, DD). Nonostante la presenza di quest'ultimo, non è ancora stata dimostrata con certezza la capacità di EDAR di indurre apoptosi a differenza di altri membri di TNFR family (ad esempio TNFR1, NGFR) (Cui C.Y., 2006). Come altri membri della famiglia EDAR è però in grado, dopo il legame con EDA, di avviare una cascata di segnalazione tramite l'ingaggio di proteine adapter del death domain citoplasmatico. EDARADD (EDAR associated death domain) è la proteina adattatrice intracellulare che svolge questo ruolo. Il gene EDARADD è anch'esso autosomico e localizzato nella banda cromosomica 1q42,2-q43. L'omonima proteina possiede a sua volta un proprio DD che interagisce con i successivi complessi. Primo complesso coinvolto nella segnalazione downstream è costituito dalla proteina TNFR-Associated Factor 6 (TRAF6), da TGF-β

Activating Kinase 1 (TAK1) e da TAK1 Binding protein 2 (TAB2). L'azione di questo complesso si estrinseca nell'attivazione del successivo I- $\kappa$ B Kinase (IKK). Esso è un complesso di segnalazione multisubunità (segnalosoma). Le subunità sono tre: due di esse hanno funzione catalitica (IKK $\alpha$  o 1 e IKK $\beta$  o 2), la terza ha funzione regolatoria ed è conosciuta come IKK $\gamma$  o NEMO (NF- $\kappa$ B Essential Modulator) (Haiden M.S., 2004). Il gene NEMO è localizzato su Xq28 e consiste di dieci esoni con tre alternativi esoni iniziali non codificanti [Priolo, 2009]. L'azione di IKK complex è quella di fosforilare le proteine inibitrici della famiglia I- $\kappa$ B che sequestrano in forma inattiva il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B nel citoplasma. Queste proteine sono nel particolare I- $\kappa$  $\alpha$ , I- $\kappa$ B $\beta$  e I- $\kappa$ B $\epsilon$ , codificate mediante splicing alternativo dal gene IKBA localizzato presso 14q13 e consistente in sei esoni. Le molecole I- $\kappa$ B sono fosforilate su due residui serina critici e successivamente degradate nel citoplasma previa poliubiquitinazione (Smahi A., 2002) Questo permette di liberare il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B, eterodimero costituito dalle subunità p50 e p52. I fattori NF- $\kappa$ Bs sono costituiti dall'associazione di omo od eterodimeri di proteine della famiglia RelA/NF- $\kappa$ B (cinque omologhi nei mammiferi), molto conservata a livello evolutivo (Cui C.Y., 2006). Mutazioni di queste proteine o reazioni autoimmuni verso le stesse si osservano in vari disordini cutanei come psoriasi, malattie infiammatorie e tumori, essendo implicate per altro nella crescita e differenziamento dei cheratinociti. In particolare NF- $\kappa$ B è principalmente implicato nell'attività del sistema immunitario e risposta da stress, nello sviluppo di cellule B e T, e nel differenziamento e sviluppo di vari sistemi come ossa, epidermide, e sistema nervoso centrale (Courtois G., 2006).



**Fig. 6:** rappresentazione schematica della attivazione di NF- $\kappa$ B. Il trimerico EDA lega la proteina transmembrana EDAR. In questo modo viene attivata la proteina adattatrice intracellulare EDARADD. Essa attiva a sua volta il complesso formato da TRAF6, TAB2 e TAK1. Questo attiva il complesso IKK, in grado di fosforilare I $\kappa$ B, che trattiene NF- $\kappa$ B in forma inattiva. Il suo rilascio consente l'ingresso nel nucleo e l'attivazione della trascrizione.

NF- $\kappa$ B estrinseca le proprie funzioni attraverso l'attivazione di geni target; tra questi quelli riconosciuti e più studiati sono ad oggi sono WNT, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Sonic Hedgehog (Shh), e Linfotossina  $\beta$  (LT $\beta$ ) (Mikkola M.L., 2009)

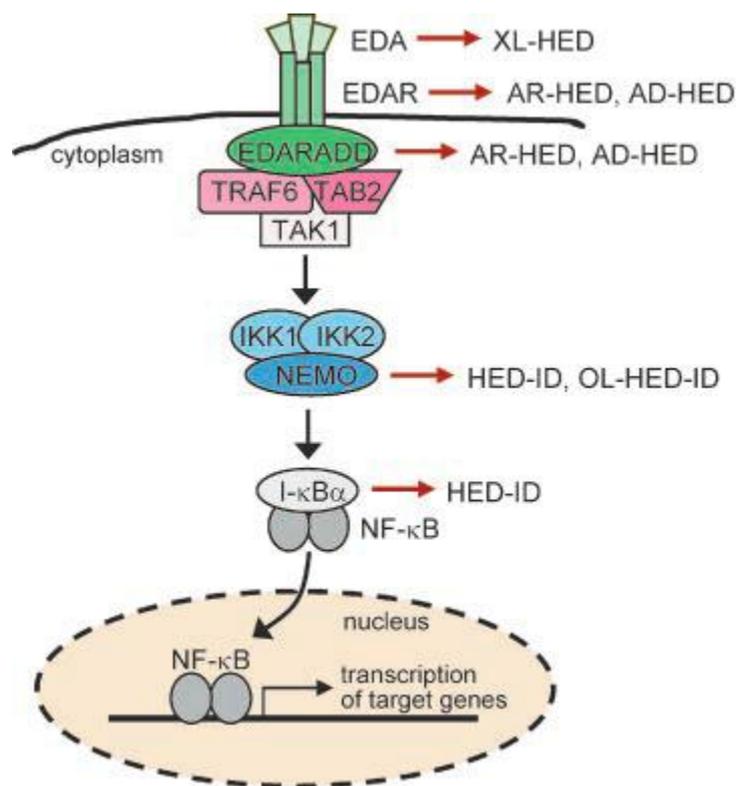
Il pathway EDA/EDAR/EDARADD, che porta all'attivazione di NF- $\kappa$ B mediante NEMO è essenziale per lo sviluppo embriogenetico degli annessi ectodermici. L'embriogenesi di questi avviene tramite un ispessimento focale dell'epitelio che prende il nome di placca ectodermica. Nello stadio successivo questa si invagina nel mesenchima sottostante a formare la gemma. Nel follicolo pilifero questa cresce rapidamente approfondendosi e reclutando un cluster di cellule dermiche che formano la papilla dermica. In organi più

complessi, come il dente, la gemma epiteliale va in contro ad una morfogenesi più articolata con vari stadi, come lo stadio di cappa e di campana (Mikkola M.L., 2009). L'espressione di EDA si nota negli stadi iniziali di sviluppo embrionale ectodermico e continua nell'epidermide adulta, nelle ghiandole sudoripare, e nei follicoli piliferi dei capelli. EDA regola l'organogenesi a diversi livelli, dall'iniziazione al differenziamento. Le molecole EDA, EDAR e EDARADD sono espresse a livello epiteliale prima della formazione della placca, nella placca stessa, e durante la morfogenesi e differenziamento di denti, ghiandole e capelli. La precisa sequenza temporale ed il meccanismo d'azione della coppia ligando/recettore EDA/EDAR non sono ancora pienamente compresi ma tali geni risultano espressi in maniera differenziale durante la formazione della placca nei vari stadi embrionali. L'ibridizzazione in situ e studi con immunofluorescenza indicano infatti che EDA e EDAR sono espressi in strati adiacenti o parzialmente sovrapposti nell'ectoderma che ricopre inizialmente l'embrione, per poi risultare rispettivamente espressi, ad avvenuta formazione della placca, nella regione interplacca ed a livello della stessa (Pispa J., 2003). Dopo la nascita essi tornano ad assumere un'espressione colocalizzata a livello dei bulbi piliferi e dei germi dentali (Cui C.Y., 2002). Questo schema espressivo è valido per la proteina EDA-A1, mentre EDA-A2 è monitorata solo a partire da uno stadio più avanzato rispetto all'isoforma A1. EDA-A2, con il suo specifico recettore XEDAR, è stata recentemente supposta avere un ruolo nell'oncosoppressione di alcune forme tumorali come i carcinoma colon-rettale. Sembra a tal proposito che l'espressione sia di questo ligando che del suo recettore possa essere indotta da p53 (Tanikawa C., 2010). La corretta formazione spaziale e dimensionale dei vari annessi ectodermici è dovuta ad un bilanciamento di segnali opposti, promotori di sviluppo od inibitori, prodotti dalla placca stessa o dal condensato di cellule mesenchimali sottostanti (Mikkola M.L., 2006). Le BMPs ed in particolare BMP4 sono considerate inibitori della formazione della placca e sono espresse nella stessa o nel derma sottostante durante l'embriogenesi di strutture quali i follicoli piliferi. Suddetta espressione è, almeno in parte, regolata dall'attività di EDA. Tramite l'attivazione di NF- $\kappa$ B il signaling EDA induce la trascrizione e traduzione di due antagonisti delle BMPs: Ccn2 connective tissue growth factor (Ccn2/ctgfd) e la Follistatina (Pummila M., 2007). Il gene EDA è a sua volta attivato dal pathway di Wnt, essenziale in numerosi processi embriogenetici e nell'omeostasi dei tessuti maturi, mediante il fattore di trascrizione

Lymphoid Enhancer- Binding Factor 1 (LEF1). Molto probabilmente non si tratta dell'unico pathway induttore di EDA in quanto avente espressione solo nei follicoli piliferi, mentre EDA abbiamo detto essere largamente rappresentato in altri annessi e nel resto della pelle. Tali ulteriori complessi di segnalazione e stimolazione non sono tuttavia ancora stati individuati con certezza. A sua volta EDA è in grado di inibire, con meccanismo a feedback negativo, l'espressione di WNT tramite l'attivazione via NF- $\kappa$ B di due antagonisti: Dickkopf-related protein 1 e 4 (Dkk1, Dkk4) (Durmowicz M.C., 2002). Altro target del pathway di EDA è il gene Shh. Esso non codifica un fattore di trascrizione, ma una molecola segnale secreta nello spazio intercellulare e in grado di attivare numerosi meccanismi. Tra di essi alcuni sono fondamentali per l'embriogenesi ed in particolare per lo sviluppo delle dita o l'organizzazione dell'encefalo. Ne è prova l'Oloprosencefalia, difetto di sviluppo nell'uomo associato a mutazioni del gene SHH in cui lo spettro fenotipico può variare da presenza di un solo ventricolo cerebrale con ciclopia e schisi mediana del palato a varianti meno gravi come la presenza di un solo incisivo centrale superiore conoide quale unico segno clinico. Il fenotipo dentale si può spiegare con un coinvolgimento di Shh nell'embriogenesi dentale. Infine Shh sembra mediare anche gli effetti di EDA sui follicoli piliferi, per quanto riguarda il fisiologico approfondimento dermico della gemma e in successive fasi di crescita e determinazione della morfologia del capello (Hammewrschmidt B., 2007). La cascata di segnalazione attivata da EDA ed estrinsecata da NF- $\kappa$ B ha come ulteriore bersaglio l'attivazione di LT $\beta$ . Questa è una citochina peraltro coinvolta nell'organogenesi dei linfonodi in cooperazione con altre molecole della stessa famiglia. Tramite interazione con le Keratin Associated Proteins (KAP), coinvolte nella formazione di fibre di cheratina in epidermide e peli, contribuisce a regolare gli stadi tardivi dello sviluppo di questi ultimi (Cui C.Y., 2006). LT $\beta$ , come altri membri della famiglia TNF può attivare NF- $\kappa$ B in maniera NEMO indipendente attraverso la NFK $\beta$  inducing kinase (NIK). Questa attiva direttamente IKK $\alpha$ , la quale fosforila un precursore di p52 (p100) generando il dimero p52-RelB, che penetra nel nucleo ed attiva la trascrizione (Cui C.Y., 2006). Appare chiaro come l'interazione delle molecole segnale e target nello sviluppo reciprocamente influenzato di ectoderma e mesoderma è molto complessa ed ancora poco conosciuta. È tuttavia possibile comprendere come mutazioni di numerosi geni implicati in suddetti processi comportino inevitabilmente una compromissione della normale formazione di annessi

nell'embrione. Mutazioni al gene EDA per qualsiasi dominio proteico possono causare la Displasia Ectodermica Ipoidrotica (Hypohidrotic Ectodermal Displasia, HED, OMIM 305100) (Fig. 6). Questa sindrome a trasmissione X-linked recessiva è principalmente caratterizzata dalla triade sintomatica ipoidrosi, ipotricosi, ed ipodonzia ed esprime un pieno fenotipo nel maschio. Non c'è nessuna specifica correlazione genotipo-fenotipo in pazienti portatori di diverse mutazioni di EDA (Paakkonen K., 2001). Tutte le mutazioni missenso nel dominio TNF-like risultano in una abolita o drasticamente ridotta capacità di legame di EDA-A1 ad EDAR (Priolo M., 2009). Mutazioni al gene EDAR sono causa di forme autosomiche dominanti (AD) ed autosomiche recessive (AR) di HED (ADHED, OMIM 129490; ARHED, OMIM 224900) (Fig. 6). Mutazioni missenso e nonsense all'esone 12 di EDAR causano AD HED. Sono state comunque descritte anche modalità di trasmissione autosomica recessiva (Priolo M., 2009). Mutazioni missenso in omozigosi del gene EDARADD sono state riportate quali causa di ARHED, la gran parte delle quali localizzate nel DD. Recentemente una mutazione in eterozigosi dello stesso gene ha dimostrato di poter causare anche ADHED in una famiglia marocchina (Bal E., 2008) (Fig. 6). Pertanto qualsiasi mutazione per ciascuna molecola del pathway EDA-EDAR-EDARADD comporta un disturbo nell'attivazione a cascata di NF- $\kappa$ B, con conseguente ipoplasia degli annessi ectodermici, il cui sviluppo è legato a tale attivazione. Mutazioni al gene NEMO possono provocare l'Incontinentia Pigmenti (IP2, OMIM 308300), sindrome a trasmissione dominante X-linked. Questa genodermatosi letale nel maschio esprime nella femmina un fenotipo con lesioni cutanee, ipodonzia, onicodisplasia ed ipotricosi. Possono altresì essere coinvolte altre strutture di origine ectodermica (oculari) o neuroectodermica. Le manifestazioni cliniche possono variare notevolmente per la lionizzazione del cromosoma X. La più comune mutazione nella IP2 è un rearrangement genomico risultante nella delezione degli esoni dal 4 al 10 che avviene durante la meiosi paterna, causando l'80% delle nuove mutazioni (Fusco F., 2008 ). Risultato di una simile mutazione è la traduzione di una proteina con almeno 26 amminoacidi sovrannumerari ed incapace di attivare NF- $\kappa$ B (mutazione amorfica). Nei rari casi di pazienti maschi affetti, questi presentavano un cromosoma X sovrannumerario, o mosaicismo per la più comune mutazione amorfica (Fusco F., 2008 ). Mutazioni puntiformi in NEMO, generalmente solo ipomorfiche, possono causare Displasia Ectodermica Anidrotica con Immunodeficienza (Anidrotic Ectodermal Displasia

with Immuno Deficiency, EDA-ID, OMIM 300291) o una sindrome simile accompagnata da linfedema ed osteopetrosi (OL-EDA-ID, OMIM 300301) (Fig. 6). Entrambi sono disordini rari a trasmissione X-linked recessiva che si manifestano nel maschio. Oltre ai segni classici di Displasia Ectodermica sovra menzionati questi pazienti presentano una critica immunodeficienza, ed eventualmente linfedema ed osteopetrosi. La gran parte di essi presentano mutazioni missenso o piccole delezioni principalmente a carico dello Zinc-finger domain di NEMO o mutazioni nonsense nella regione del terminale C. Anche mutazioni  $IKB\alpha$  sono state riscontrate in pazienti con EDA-ID autosomica dominante (Fig. 5). Queste mutazioni affliggono la regione N-terminale della proteina agendo attraverso un meccanismo di guadagno di funzione (mutazione ipermorfica). È infatti amplificata la capacità inibitoria nei confronti di  $NF-\kappa B$  da parte di  $IKB\alpha$  attraverso una sua acquisita resistenza alla degradazione (Lopez-Granados E., 2008).



**Fig. 7:** principali sindromi derivanti da mutazioni ai diversi componenti della cascata di segnalazione attivata dal legame EDA/EDAR. Mutazioni che coinvolgono NEMO o si localizzano a valle ( $I-\kappa B\alpha$ ) sono responsabili di una più estesa perdita di trascrizione ai geni target di  $NF-\kappa B$ . Questo comporta una associazione di immunodeficienza alla Displasia Ectodermica.

La perdita del signaling EDA/EDAR/EDARADD porta in definitiva ad una perdita di stimoli induttivi durante l'embriogenesi degli annessi ectodermici, con loro conseguente iposviluppo od assenza. Tuttavia, con queste mutazioni si assiste ad una conservazione di molte funzioni legate al targeting di NF- $\kappa$ B (risposta immunitaria ed infiammatoria, sviluppo dei linfociti, sviluppo del tessuto osseo e nervoso...). Questo potrebbe ipoteticamente trovare spiegazione nella possibilità di induzione della cascata di attivazione di NF- $\kappa$ B da parte di pathways alternativi, che agiscono a valle di EDA/EDAR/EDARADD. Ad esempio anche i Fibroblast Growth Factors (FGFs), mediante legame con FGFRs, sono in grado di liberare NF- $\kappa$ B nel nucleo, mediante attivazione del complesso IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , e IKK $\gamma$ . Tuttavia mutazioni a carico di NEMO o di elementi successivi nella cascata di trasduzione del segnale sembrerebbero contribuire ad una più vasta perdita di funzioni legate al signaling di NF- $\kappa$ B. Ciò spiegherebbe ad esempio l'immunodeficienza riscontrata in alcune mutazioni di NEMO o IKK $\alpha$ . Alcuni segnali mediati dal recettore CD40 (essenziale nella maturazione T helper indotta che porta alla secrezione di anticorpi) sono infatti NEMO dipendenti nei linfociti B. In questo modo in alcuni pazienti c'è un'alterata risposta a questi stimoli con diminuzione nella produzione di IgG (EDA-ID e OL-EDA-ID). In altri pazienti può osservarsi un'attivazione anomala con iperproduzione di IgM. In generale l'immunodeficienza di queste sindromi risulta da un'impropria risposta cellulare dei linfociti nel sangue periferico per la stimolazione da LPS, IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$  e CD40L (Smahi A., 2002). Il ligando del Receptor Activator di NF- $\kappa$ B (RANKL) è un recettore presente nei progenitori degli osteoclasti. Anche il differenziamento di queste cellule è perciò legato a segnali mediati da NF- $\kappa$ B (Priolo M., 2009). L'interruzione di questo signaling può comportare un inefficiente sviluppo di osteoclasti con osteopetrosi nella OL-EDA-ID. Il coinvolgimento di LT $\beta$  nell'organogenesi dei linfonodi potrebbe, sempre in via ipotetica, spiegare il deficiente drenaggio linfatico in OL-EDA-ID, in quanto anch'essa target di NF- $\kappa$ B. L'esatta conoscenza dei meccanismi molecolari che sottendono alle manifestazioni fenotipiche di queste sindromi è tuttavia ancora molto scarsa, sia per la loro grande complessità che per la rarità con cui esse si manifestano.

## Fattori di trascrizione

Il gene p53 è uno dei principali oncosoppressori conosciuti, essendo coinvolto in circa il 50% dei tumori maligni (Levrero M., 2000). Il ruolo di p53 è essenziale nella risposta da stress e nella riparazione dei danni genotossici. La proteina p53 è in grado di arrestare il ciclo cellulare, prevenendo la replicazione del DNA danneggiato, infatti, ne promuove la riparazione e quand'essa non è possibile ne induce l'apoptosi. Recentemente sono stati studiati nuovi membri della famiglia p53, ossia p63 e p73. Le proteine p73 e p63 hanno una affinità pari al 63% del proprio DNA Binding Domain (DBD) rispetto a quello di p53 (Levrero M., 2000). Tali identità fa supporre funzioni ridondanti per queste proteine. Mentre p73 sembra giocare un ruolo nella soppressione dei tumori e la sua perdita si osserva nel neuroblastoma ed in alcuni tipi di linfoma, p63 è stata correlata ad un corretto sviluppo ectodermico, craniofacciale e degli arti nel periodo embrionale. A differenza di p53, p73 e p63 possono dare origine a diversi mRNAs per splicing alternativo. Il gene p63 situato al cromosoma 3q27 codifica sei varianti di splicing tutte accomunate da una struttura comprendente un dominio di legame al DNA (DNA binding domain), un dominio di oligomerizzazione al terminale C (carboxy-oligomerization domain) ed un motivo  $\alpha$  sterile (steril  $\alpha$  motif, SAM). Quest'ultimo è un dominio di circa 70 amminoacidi comune a diverse proteine deputate all'interazione con altre proteine, con il DNA o l'RNA ed è generalmente formato da quattro o cinque  $\alpha$  eliche. Nell'adulto la proteina p63 è localizzata nel nucleo delle cellule basali di epitelii stratificati quali epidermide, mucosa orale e vaginale, cervice, prostata, uretere. In queste cellule la forma maggiormente espressa è  $\Delta Np63\alpha$ , mancante il dominio di transattivazione (Transactivating Domain, TAD). La sua espressione sembra decrescere con il progressivo differenziamento cellulare e si suppone agisca come un repressore di trascrizione su geni target con un probabile meccanismo di interazione diretta proteina-proteina (Priolo M., 2009). Le mutazioni di p63 comportano una serie di sindromi accomunate da una più o meno marcata displasia degli annessi ectodermici, labioschisi o palatoschisi ed ectrodattilia. Sono inoltre state descritte mutazioni non sindromiche il cui unico risultato fenotipico può essere l'ectrodattilia o la palatoschisi (Rinne T., 2007). Si riconoscono almeno cinque sindromi legate a mutazioni di p63 con espressione autosomica dominante e recentemente identificate come p63 associated disorders. Ectrodattilia

Displasia-Ectodermica e Labio-Palatoschisi (Ectrodactyly Ectodermal Dysplasia and Cleft Lip/Palate Syndrome, EEC, OMIM 604292) è principalmente determinata da mutazioni puntiformi che coinvolgono il DBD, compromettendone la capacità di legame. Si contano più di trenta mutazioni al DBD coinvolgenti più di venti amminoacidi (Rinne T., 2007). Meno frequenti sono le mutazioni che coinvolgono il SAM. Vi è una estrema variabilità di espressione del fenotipo che sembra essere correlata al tipo di mutazione (Rinne T., 2007). La Sindrome Arto-Mammaria (Limb Mammary Syndrome, LMS, OMIM 603543) rispecchia il fenotipo precedente, con manifestazioni ectodermiche spesso più blande e malformazione della ghiandola mammaria e del capezzolo. La maggior parte delle mutazioni di LMS è localizzata ai terminali N e C del gene p63. Si tratta principalmente di mutazioni puntiformi o delezioni che possono risultare in un codone di stop prematuro. La Sindrome Acro-Dermato-Onico-lacrimo-Dentale (Acro-Dermato-Ungual-Lacrima-Tooth Syndrome, ADULT, OMIM 103285) manifesta sintomatologia alla cute, ai capelli ed alle unghie e si contraddistingue per l'assenza di schisi. Essa è causata da mutazioni missenso del DBD che conferiscono, al contrario di quanto si osserva nella EEC un guadagno di funzione dell'attività di transattivazione dell'isoforma  $\Delta Np63\gamma$ . Questa è normalmente priva del dominio TA al terminale N e non possiede quest'attività; la mutazione attiva costitutivamente un secondo dominio di transattivazione (TA2), normalmente represso (Priolo M., 2009). La Sindrome Anchiloblefaron- Displasia Ectodermica e Labiopalatoschisi (Ankyloblepharon-Ectodermal Dysplasia-Cleft/Lip Palate Syndrome, AEC, OMIM 106260) si distingue per la severità del fenotipo cutaneo con frequente anchiloblefaron e assenza di ectrodattilia od eventualmente sola sindattilia cutanea. È causata da mutazioni missenso che coinvolgono il dominio SAM, pregiudicando probabilmente le interazioni proteina-proteina, data la loro dipendenza dalla conformazione sterica. La Sindrome Rapp-Hodgkin (RHS, OMIM 129400) rispecchia il fenotipo AEC con assenza di anchiloblefaron e manifestazioni cutanee meno severe. Le mutazioni più frequenti sono puntiformi al dominio SAM o delezioni nello stesso o nel dominio inibitore della transattivazione (Transactivating Inhibitor Domain TID). Le conseguenze delle mutazioni di p63 sono dunque dipendenti dal loro tipo e localizzazione. Biopsie cutanee di pazienti affetti dimostrano l'anomala localizzazione citoplasmatica di p63 e la sua atipica espressione negli strati epiteliali più superficiali (Priolo M., 2001).

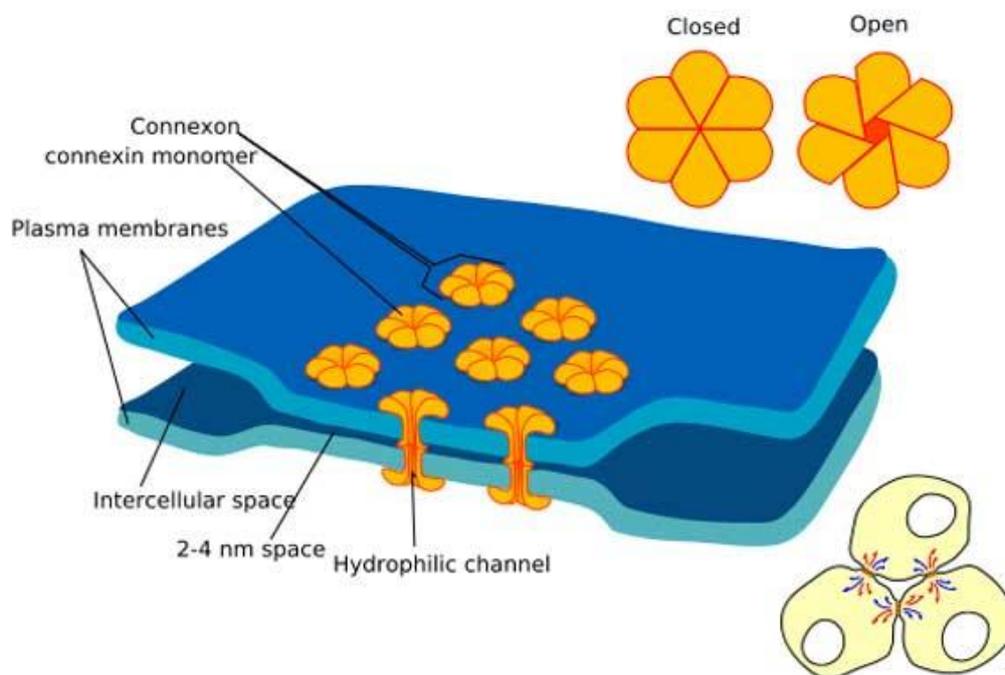
Uno dei target di p63 è il gene DLX3, localizzato al cromosoma 17q21. Esso è espresso durante lo sviluppo in molte strutture derivanti dalle interazioni epitelio mesenchima come i denti, i follicoli piliferi, e gli abbozzi degli arti (Priolo M., 2009). La delezione di quattro nucleotidi G nel gene DLX3 provoca un'interruzione prematura della proteina dlx3. Ciò comporta un guadagno di funzione nella sua capacità di legare il DNA. Si ipotizza che questa proteina mutata abbia maggiore affinità di legame per il DNA ma incapacità di attivarne la trascrizione (Priolo M., 2009). Una simile mutazione è causa della sindrome autosomica dominante Trico-Dento-Ossea (Tricho-Dento Osseous, TDO, OMIM 190320) in sette famiglie [Price et al., 1998]. Recentemente anche una delezione di due paia di basi localizzate al terminale N di DLX3 sono state correlate ad una forma attenuata di TDO (Wright J.T., 2008).

Il gene MSX-1 è un Homeobox localizzato presso il cromosoma 4p16,1 in un cluster che comprende anche i due geni EVC ed EVC2. I geni Homeobox (Hox) sono altamente conservati nell'evoluzione essendo presenti in ogni specie. L'uomo possiede 39 geni Hox raggruppati in quattro cluster. Essi sono coinvolti nello sviluppo embrionale e contraddistinti da una stretta corrispondenza tra la loro organizzazione genomica e la loro espressione a livello anatomico. Ogni cluster è organizzato in direzione 3'-5' in modo tale da rispecchiare fedelmente la sequenza di attivazione spazio temporale lungo l'asse anteroposteriore dell'embrione (collinearità spazio-temporale). Tutte le proteine prodotte dai geni Hox possiedono un dominio di legame al DNA in grado di attivare o reprimere i processi di trascrizione (Homeodomain). MSX-1 viene espresso nell'interfaccia tra ectoderma e mesoderma, meramente confinato in quest'ultimo. Esso rappresenta pertanto, in base alle attuali conoscenze, l'unico gene coinvolto nelle EDs a non essere espresso in un derivato ectodermico (Priolo M., 2001). L'espressione di MSX-1 può essere peraltro stimolata da NF- $\kappa$ B, suggerendo un'interazione con il pathway di EDA. Un signaling difettivo dell'Ectodisplasina A potrebbe decrementare l'espressione di MSX-1, responsabile con altri geni come MSX-2 e DLX-2 di processi di sviluppo embrionale come l'odontogenesi. Una mutazione nonsense nell'esone 2 risulta in un codone di stop all'interno dell'Homeodomain, compromettendone la capacità di legame. A tale mutazione si associa la Sindrome di Witkop (OMIM 189500), autosomica dominante e principalmente caratterizzata da anomalie di denti ed unghie.

La funzione dei geni EVC ed EVC2 non è ancora chiara. EVC2 codifica per una proteina, la Limbina, che sembra coinvolta nella regolazione dello sviluppo embrionale, nonché dell'organogenesi di cuore, pancreas, fegato ed altre strutture. Mutazioni in questi geni sono state riscontrate nella Sindrome di Ellis-van Creveld (EvC, OMIM 225500), disordine autosomico recessivo con malformazioni ossee ed agli arti, difetti dentali, alle unghie ed ai capelli. Mutazioni missenso in eterozigosi al gene EvC sono state riscontrate in un caso anomalo di EvC e nella Disostosi Acrodentale di Weyers (Weyers Acrodental Dysostosis, OMIM 193530), con difetti dentali, ungueali e agli arti (Priolo M., 2009).

### Proteine per l'adesione e comunicazione tra cellule

Le gap junctions sono porzioni di membrana in due cellule affrontate ove si localizzano complessi proteici disposti a formare strutture esagonali. Queste costituiscono dei canali di comunicazione intercellulari attraverso i quali possono fluire ioni e piccole molecole. L'apertura di questi canali può essere regolata dal pH o dalla concentrazione di ioni Ca. Ogni gap junction consiste di due Connexine, una per ciascuna cellula, composte da sei proteine di connessione (Fig. 8).

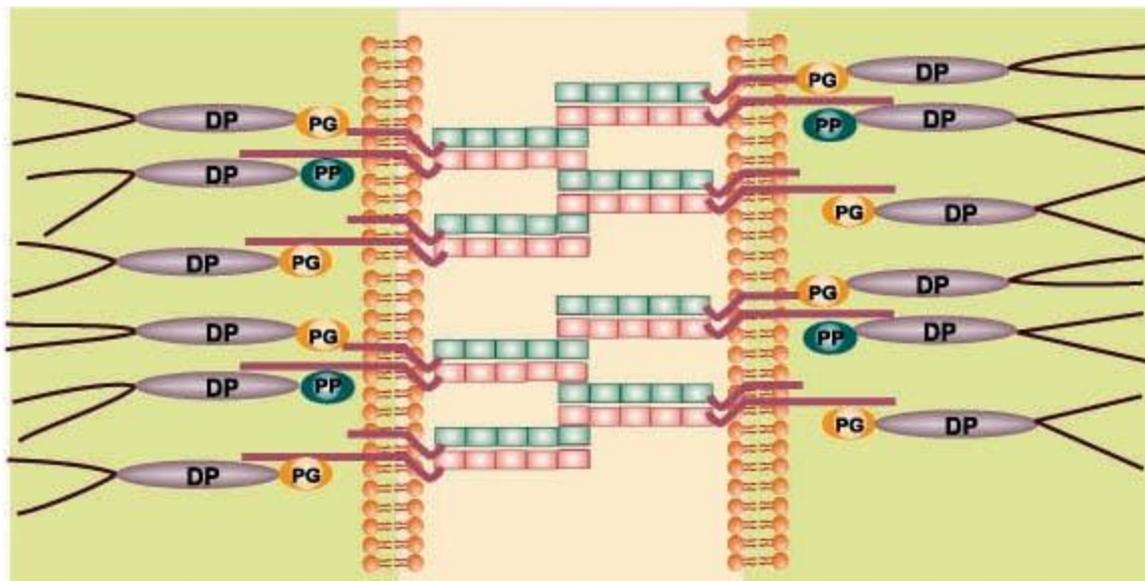


**Fig. 8:** rappresentazione schematica di una gap junction. Ciascuna giunzione è formata da due unità esagonali di sei proteine (Connessione) che si affrontano nello spazio extracellulare. Il pH o la concentrazione di ioni Ca possono determinarne l'apertura o la chiusura

La famiglia di geni Connexine codifica per le subunità proteiche dei canali gap junction. Essi vengono espressi in maniera specifica per i diversi tipi di cellule, con possibili sovrapposizioni di specificità. Il gene della Connexina umana 30 (CX30 o GJB6) si trova al 13q11-12 ed è espresso in una varietà di tessuti che include le strutture epiteliali e mesenchimali dell'orecchio interno. Mutazioni del gene CX30 comportano un fenotipo mutato di connexine che non sono in grado di assemblare le gap junctions ed interferiscono con l'aggregazione delle proteine wild type (effetto negativo dominante). Ne consegue la Sindrome di Clouston (OMIM 129500), una ED idrotica a trasmissione autosomica dominante con anomalie di capelli, orecchie, unghie e cute. Mutazioni in altre connexine sono responsabili di altre sindromi, come le mutazioni di CX43 nella Displasia Oculo-Dento-Digitale (Oculodentodigital Dysplasia, ODDD, OMIM 164200).

I desmosomi o macule aderenti sono giunzioni intercellulari particolarmente abbondanti nell'epidermide. Sono costituiti da proteine transmembrana, le Caderine, appartenenti a due famiglie di proteine, le Desmogleine e le Desmocolline; per ciascuna delle due famiglie sono note isoforme diverse espresse in maniera differenziale nell'epidermide. Queste proteine attraversano lo spazio intermembrana di due cellule affrontate (20 nm) mantenendole adese mediante la reciproca interazione. Il loro dominio endocellulare è in rapporto con una zona elettrondensa detta placca di adesione. Questa è per altro costituita da numerose proteine, quali Desmoplachine, Placoglobuline, Envoplachine e le Plachifiline (Fig. 9). Il loro ruolo principale è di ancoraggio ai filamenti citoscheletrici, in particolare filamenti intermedi (filamenti di circa 10 nm di spessore costituiti da Cheratine). I desmosomi consentono l'adesione delle cellule, come ad esempio i cheratinociti, rappresentando le strutture di resistenza dell'epidermide.

**Fig. 9** : rappresentazione schematica del desmosoma e delle principali proteine della placca di adesione : DP, Desmoplachina; PG, Placoglobulina; PP, Placofillina.



Il gene Plakophilin1 (PKP1) si trova su 1q32. Composto da quindici esoni, codifica la proteina Placofillina 1 (Pkp1), proteina accessoria della placca desmosomiale endocellulare. Membro della famiglia placoglobuline/catenine/proteine armadillo, ha un ruolo cruciale nell'adesione tra cellule. Situata nella membrana apico-laterale dei cheratinociti, essa funge infatti da collegamento tra giunzioni aderenti, desmosomi e strato corneo epidermico. Inoltre ha un ruolo nell'ancoraggio dei filamenti di cheratina intermedi alla placca di desmosomi ed emidesmosomi, oltre che alla membrana nucleare dove è ugualmente localizzata. L'Head Domain di Pkp1 interagisce con la Desmogleina 1, la Desmoplachina e la Cheratina. Mutazioni a questo gene comportano pertanto difetti nell'interazione intercellulare ed anormale distribuzione dei filamenti di Cheratina citoscheletrici, che appaiono disorganizzati e prevalentemente sparsi attorno al nucleo (Priolo M., 2009). Mutazioni al gene Pkp1 comportano la Displasia Ectodermica con fragilità cutanea (ED/skin fragility syndrome, OMIM 604536), con displasia di capelli, unghie e ghiandole sudoripare ed estrema suscettibilità cutanea a traumi anche modesti.

La Nectina1 è un recettore di membrana immunoglobulino simile localizzato nella membrana apicollaterale delle cellule epiteliali in prossimità della giunzioni aderenti. Essa lega l'Afadina, una proteina scaffold con un dominio PDZ (piccoli domini globulari con struttura  $\alpha$  e  $\beta$ ) e la Ponsina. In questo modo costituisce il complesso Nectina/Afadina/Ponsina (NAP system). Il NAP system mantiene la stabilità ed integrità

del plasmalemma attraverso il legame dell' Afadina all' Actina e attraverso il legame della Ponsina alla Vinculina. Si ipotizza altresì un legame del NAP system al sistema Caderina-Catenina (Priolo M., 2001). La Nectina1 ha un ruolo primario nell'indurre una cascata di segnalazione intracellulare deputata alla corretta interazione cellula-cellula e disposizione dei domini di membrana plasmatici (Priolo M., 2009). Nectina1 è un prodotto del gene Human Poliovirus-Receptor (PVRL) mappato all'11q23-q24. Mutazioni missenso, nonsense e frameshift in PVRL comportano la sindrome Displasia Ectodermica con Labiopalatoschisi (Cleft Lip Palate- Ectodermal Displasia Syndrome, CLEPD1, OMIM 225060) autosomica recessiva, essenzialmente caratterizzata da labioschisi o palatoschisi, ipotricosi ed ipodonzia, e da una serie di manifestazioni che può variare ampiamente, comprendendo ritardo mentale, deformità alle dita, e malformazioni al sistema genitourinario.

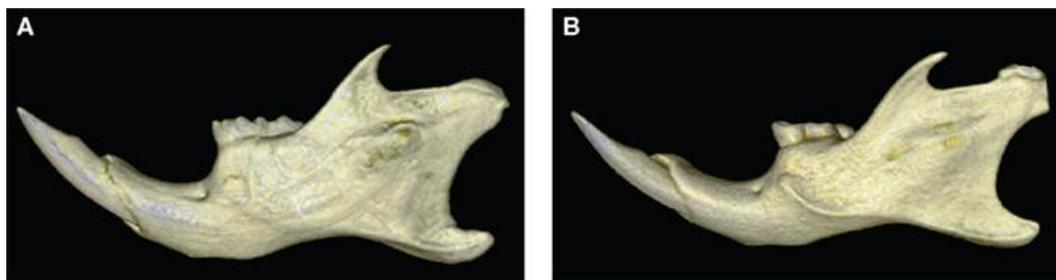
Le  $\beta$ -Catenine sono proteine essenziali in due diversi processi: l'adesione intercellulare calcio-dipendente e l'attivazione di un segnale di trascrizione mediato da Wnt. La partecipazione all'uno o all'altro di questi processi è dettata dalla espressione di distinte forme molecolari di  $\beta$ -Catenina (Priolo M., 2009). Nell'adesione cellula-cellula la  $\beta$ -Catenina e l' $\alpha$ -Catenina legano il dominio citoplasmatico della Caderina collegandola all'Actina ed agli altri filamenti citoscheletrici. I geni Wnt, come già anticipato, giocano un ruolo importante nello sviluppo embrionale e nel mantenimento dell'omeostasi dei tessuti maturi. La  $\beta$ -Catenina è in grado di rispondere agli stimoli di Wnt e BMP e, legandosi ad altri fattori citoplasmatici (T-cell factor-Lef, TCF-Lef), indurre la trascrizione dei geni target. La fosforilazione della Caderina sembra inibire questo segnale in quanto in grado di sequestrare la  $\beta$ -Catenina ed inoltre di competere direttamente con la stessa per il legame di CTF. Mutazioni del gene CDH3, che codifica per la Caderina 3, comportano disturbi nel legame intercellulare calcio-dipendente (tra Caderina e Catenina). Ad essa è correlata la sindrome Displasia Ectodermica-Ectrodattilia-Distrofia Maculare (Ectodermal Dysplasia, Electroductyly, and Macular Dystrophy, EEM, OMIM 225280). In questo disordine autosomico recessivo si hanno ipotricosi, ipodonzia, difetti alle dita ed alla retina. Mutazioni nonsense al gene WNT10A, della famiglia WNT, comportano una proteina segnale prematuramente tronca con perdita di funzione. L'assenza di un segnale Wnt funzionale potrebbe portare alla fosforilazione e degradazione della  $\beta$ -Catenina deputata alla trasmissione del segnale (Adaimy L., 2007).

Queste mutazioni sono state individuate nella gran parte dei pazienti affetti da Displasia Odonto-Onico-Dermica (Odonto-Onycho-Dermal Dysplasia, OODD, OMIM 257980), sindrome autosomica recessiva che coinvolge cute, unghie, e capelli. Recentemente è stato dimostrato che la Caderina P è un target di p63 e sembra avere un ruolo nello sviluppo embrionale di follicoli piliferi ed arti (Shimomura Y., 2008). Questo potrebbe fornire una spiegazione alla presenza di ectrodattilia in EEM come nei disordini p63 related (Priolo M., 2009).

## **MODELLI SPERIMENTALI ANIMALI**

La maggior parte delle acquisizioni sulla patogenesi delle EDs è stata resa possibile dalla sperimentazione su modelli di studio animale. I meccanismi embriogenetici difettivi in queste sindromi sono infatti altamente conservati nell'evoluzione delle specie. Il topo rappresenta storicamente un animale ideale per la sperimentazione data la brevità del ciclo riproduttivo (otto settimane dal concepimento sino al raggiungimento della maturità sessuale) e l'elevato numero di embrioni per gravidanza. Inoltre i processi patologici in questo mammifero sono molto simili a quelli umani. A conferma di ciò anche nel topo sono state osservate mutazioni spontanee ai geni Tabby, Downless e Crinkled, che sono rispettivamente omologhi di EDA, EDAR e EDARADD nel murino. I topi portatori di queste mutazioni esprimono il fenotipo simile alla ED umana con alterazioni a carico degli annessi ectodermici. In questi mammiferi si riscontra infatti l'assenza di ghiandole sudoripare sul palmo della zampa; le ghiandole sebacee, anali e prepuziali, sono ugualmente aplastiche od ipoplastiche; l'assenza delle ghiandole del Meibomio unitamente ad aberrazioni di tessuti di origine ectodermica come la cornea o la congiuntiva comportano una patologia oculare simile a quella dei pazienti HED umani, nei quali tuttavia si registrano alterazioni ma non assenza delle ghiandole del Meibomio (Cui C-Y., 2005). I topi portatori di mutazioni per questi tre geni non presentano peli sulla coda ed hanno caratteristiche aree di alopecia dietro le orecchie; due dei tre tipi di peli prevalentemente presenti nel manto del topo (Guard, Zigzag e Awl) hanno uno sviluppo ed un'organizzazione anormale della medulla pilifera (Awl-like). Nel topo la dentatura è costituita da 16 denti: in ogni emiarcata sono presenti un incisivo e tre molari; gli incisivi hanno una crescita ed eruzione continua nel tempo e tra essi ed i molari è presente una zona di diastema. La mancanza dei premolari risulta da una aumentata apoptosi focale

che riduce il numero di denti primordiali nell'embrione durante l'odontogenesi (Matalova E., 2004).



**Fig. 10:** fenotipo fisiologico della mandibola e della dentatura del topo (A); fenotipo Tabby con anomalie nella forma dei denti e dell'osso basale

Topi con mutazioni ai suddetti geni manifestano difetti congeniti nel numero di denti con frequente mancanza di incisivi e terzi molari; la morfologia dei molari può essere alterata nelle dimensioni e nella forma delle cuspidi, spesso meno pronunciate (Fig. 10). Talvolta topi Tabby manifestano l'anomala presenza di un premolare, specie nella mandibola. L'importanza e la versatilità di questi animali come modelli sperimentali è particolarmente legata alla possibilità di applicarvi le tecniche del gene targeting e della mutagenesi condizionale. Il gene targeting consente l'introduzione nel modello sperimentale di qualsiasi mutazione a livello di uno specifico locus, permettendo di ottenere il fenotipo patologico desiderato. Introducendo in cellule staminali embrionali una molecola di DNA di circa 10 kb omologa alla regione che si intende modificare, le ricombinasi deputate alla ricombinazione omologa (crossing over) possono sostituire il DNA endogeno con la molecola esogena. Ciò avviene con una frequenza di circa 1:100.000, ma è possibile selezionare le cellule mutate accoppiando la molecola di DNA introdotta ad un vettore in grado di conferire la resistenza ad un antibiotico. Trattando le cellule con l'antibiotico specifico sopravvivranno i cloni in cui è avvenuta la ricombinazione omologa, che potranno essere iniettati in una blastocisti ed impiantati nell'animale.

La mutagenesi condizionale sfrutta le proprietà dell'enzima Cre ricombinasi del virus batteriofago P1. Questo enzima è in grado di riconoscere due sequenze specifiche di 34 basi, dette Locus di crossover o siti LoxP, una sul proprio DNA e l'altra nel DNA batterico bersaglio. Attraverso questo riconoscimento la Cre ricombinasi guida una ricombinazione sito specifica tra le due sequenze. Nel caso in cui suddette sequenze si

trovino sulla stessa molecola di DNA e nello stesso orientamento, il tratto di DNA interposto tra i due siti LoxP viene deletato. In questo modo è possibile ottenere la delezione del gene di cui si intendano studiare gli effetti. Attraverso la tecnica del gene targeting viene creato un topo transgenico per il gene in oggetto, i cui esoni vengono fiancheggiati da due sequenze LoxP. È quindi ottenuto un secondo topo portatore del gene della Cre ricombinasi espressa selettivamente da un promotore in uno specifico tessuto od in una determinata fase dello sviluppo. L'incrocio di questi due topi risulta in un mosaico funzionale in cui il gene è selettivamente deletato nei tessuti che esprimono la Cre ricombinasi. La creazione con questa tecnica di topi knockout consente di studiare l'effetto dei geni su singoli tessuti; l'eliminazione selettiva dei geni in diversi momenti dello sviluppo permette anche di studiare la funzione di quei geni che, essendo necessari ai primi stadi di sviluppo embrionale, comporterebbero la perdita precoce degli embrioni se completamente deletati.

L'applicazione di queste tecniche ha consentito di delineare con maggior precisione il ruolo predominante nell'embriogenesi di EDA-A1 rispetto all'isoforma A2. Topi Tabby transgenici con over-espressione di EDA-A1 ma non di EDA-A2 presentano miglioramenti fenotipici che mettono in luce l'importanza dell'Ectodisplasia A nei processi di iniziazione, morfogenesi e differenziamento embrionale. A ulteriore conferma di ciò, il modello murino knockout per il gene Xedar non presenta alterazioni fenotipiche a carico degli annessi epidermici (Cui C.Y., 2002). L'overspressione di Ectodisplasia A1 in animali sani è invece associata alla comparsa di placche ectodermiche dentali e di ghiandole mammarie soprannumerarie, ad un'aumentata attività delle ghiandole sudoripare e ad una maggior crescita di peli ed unghie (Pummila M., 2007). Anche altre mutazioni responsabili di displasia ectodermica nell'uomo sono state confermate dalla sperimentazione animale. Ad esempio, topi transgenici che esprimono resistenza alla degradazione di I $\kappa$ B $\alpha$  sviluppano un fenotipo ectodermico simile ai topi EDA mutanti, confermando che anche mutazioni al gene IKBA sono responsabili di malattie (Mikkola M.L., 2009).

Analoghe sperimentazioni hanno permesso di ipotizzare il targeting del pathway EDA/EDAR/EDARADD. Ad esempio topi Lef1 $^{-/-}$  presentano difetti nello sviluppo di vari organi tra cui peli, denti e vibrisse (Cui C.Y., 2006). Ciò dimostrerebbe l'importanza del pathway di Wnt nell'attivazione, mediante il fattore LEF1, dell'EDA signaling per lo

sviluppo embrionale di queste strutture. Anche la  $\beta$ -Catenina, noto attivatore di trascrizione indotto da LEF1, è stato associato alla regolazione della formazione di annessi quali il follicolo pilifero. Infatti, l'overespressione di  $\beta$ -Catenina in topi transgenici ottiene la morfogenesi di nuovi follicoli piliferi (Shindo M., 2004). L'importanza del gene Shh in queste patologie è stata messa in luce dalla creazione dei topi knockout, i quali presentano un arresto dello sviluppo di follicoli piliferi durante la vita embrionale. La sua relazione con il pathway EDA è dimostrata dall'evidenza sperimentale. Nei topi con sovrpressione di EDA-A1 si ha up-regolazione di Shh, mentre nel fenotipo Tabby si ha la down-regolazione di Shh (Cui C.Y., 2006). Tuttavia l'over-espressione di Shh non induce la formazione di follicoli piliferi ma tumore nelle cellule basali della pelle. Sembra quindi che il pathway di EDA agisca con un meccanismo di feedback negativo, inducendo la trascrizione degli specifici inibitori dei recettori per Shh, come Ptc ed Hhip, e limitandone il potenziale effetto estremo (Cui C.Y., 2006). Allo stesso modo i murini  $LT\beta^{-/-}$  presentano una variante anomala dei tre tipi di pelo, mentre la funzionalità delle ghiandole sudoripare è mantenuta. La sperimentazione sul topo ha anche permesso di evidenziare come questo target di NF- $\kappa\beta$  svolga un ruolo indipendente nell'epidermide e nella morfogenesi dei linfonodi. Infatti i topi  $LT\beta^{-/-}$  e con midollo osseo wild-type mantengono i peli con struttura anormale (Cui C.Y., 2007). Anche altri geni coinvolti nelle EDs e fondamentali per l'embriogenesi sono stati individuati dagli studi sulle cavie. Ad esempio topi knockout per il gene Msx1 esibiscono un arresto nello sviluppo dei molari nello stadio della gemma, mentre topi deficienti per Msx2 esibiscono difetti nella morfogenesi tardiva di cuspidi, radici e differenziamento dell'organo dello smalto.

Tuttavia non sempre vi è corrispondenza tra il modello animale e quanto clinicamente osservato nell'uomo. Ad esempio nessuna mutazione TRAFs è stata associata a EDs nell'uomo mentre i topi  $Traf6^{-/-}$  hanno un fenotipo degli annessi ectodermici simile a quello di Tabby, difetti ossei ed immunodeficienza (Naito A., 2002).

Anche altre specie animali riportano mutazioni spontanee a geni omologhi di EDA, EDAR, EDARADD.

Analisi comparative del genoma di bovini con fenotipo HED hanno rivelato una struttura simile al gene EDA umano, con otto esoni e principali mutazioni all'esone tre (delezione) o al sito di splicing 5' nell'esone otto (mutazione puntiforme) (Drogemuller C., 2003).

Anche il pollo e il cane sono stati usati come modello sperimentale. Il cane con una dentatura di 42 elementi comprendente anche i premolari ed uno sviluppo difiodontico, è un modello animale più facilmente comparabile all'uomo per lo studio dell'odontogenesi.

Recentemente la sperimentazione ha concentrato l'attenzione su un nuovo modello animale appartenente alla famiglia dei Ciprinidi, lo Zebrafish (*Danio rerio*), vantaggioso per molteplici aspetti. Lo Zebrafish, un pesce d'acqua dolce tropicale originario del Sud Est asiatico di piccole dimensioni (l'adulto ha una lunghezza variabile dai tre ai cinque cm) è oggi tra i modelli animali sperimentali più utilizzati ed apprezzati. Le ragioni di tanto successo sono molteplici. Lo Zebrafish può essere allevato con facilità in popolazioni di alta densità; non necessita infatti di grossi costi di mantenimento e le ridotte dimensioni facilitano lo stoccaggio di molti esemplari con un basso dispendio economico. L'alta fertilità (ogni coppia può produrre fino a 200 embrioni la settimana) ed il raggiungimento della maturità sessuale in soli quattro mesi consentono inoltre un'alta disponibilità di esemplari nell'arco di un anno. La fecondazione esterna delle uova consente di osservare e manipolare lo sviluppo dal momento della fecondazione. Uno dei maggiori punti di forza del pesce Zebra risiede nello sviluppo esterno di embrioni trasparenti che possono essere osservati facilmente con lo stereomicroscopio ottico da dissezione (Dodd A., 2000). Tale peculiarità permette l'osservazione diretta dello sviluppo embrionale di tessuti ed organi, non possibile con gli altri animali classicamente usati. La rapida crescita permette la formazione di embrioni già simili all'esemplare adulto nell'arco di ventiquattro ore, processo che nel topo richiede mediamente ventuno giorni. A distanza di quattro o cinque giorni dalla fecondazione gli embrioni diventano piccole larve autonome nel nuoto e nella ricerca di cibo. Risulta quindi evidente come sia semplice ottenere, sfruttando il rapido ciclo riproduttivo di questi pesci, quadri di mutazioni su larga scala introducendo agenti mutageni nell'acqua o manipolando l'embrione. Attraverso queste procedure si sono ottenuti fenotipi mutanti simili a stati sindromici e patologici umani, rendendo lo Zebrafish un valido modello comparativo della fisiopatologia umana, sebbene non siano sempre stati individuati i rispettivi geni mutati nel pesce.

A conferma della facilità di allevamento e mantenimento di questi animali, l'embrione di Zebrafish si sviluppa ad un intervallo di temperatura piuttosto ampio, compreso tra 21 e

32 °C (con valori ideali tra 26 e 28), la fecondazione è esterna a seguito della deposizione di uova da parte della femmina, la prima divisione cellulare avviene dopo circa quarantacinque minuti e nel giro di ventiquattro ore il pesce mostra caratteristiche morfologiche ben distinte e facilmente identificabili al microscopio ottico (Fig. 11).



**Fig. 11:** embrione di Zebrafish a ventiquattro ore dalla fecondazione

Sono già visibili occhi, otoliti, dotti pronefritici, placodi olfattivi ed epifisi; il sistema nervoso è già organizzato ed è già presente un sistema vascolare. Essendo l'embrione trasparente, dopo quarantotto ore è possibile vedere la pompa cardiaca completamente formata e la dinamica vascolare. Sono distinguibili il fegato, i reni e lo stomaco, la cui formazione si completa in cinque giorni.

La possibilità di osservare i diversi stadi di crescita è vantaggiosa per lo studio dei meccanismi molecolari che governano la formazione del complesso cranio-facciale, considerando che sono altamente conservati nelle specie, dai pesci fino agli alti vertebrati. Si possono evidenziare, in una organizzazione spaziale più semplice e con un ridotto numero di cellule, tutte le tipologie di tessuti e strutture ossee e muscolari corrispondenti nei vertebrati superiori. Ad esempio, studi con l'iniezione cellulare di destrani fluorescenti hanno reso possibile evidenziare il contributo delle cellule della cresta neurale alla formazione degli archi faringei e del mesoderma alla formazione dei muscoli (Yelick P.C., 2002). Si è evidenziato che il mesenchima craniofacciale deriva da

cellule migranti dalla cresta neurale e parzialmente anche dal mesoderma, confermando precedenti osservazioni su modelli sperimentali come il pollo od il topo e ribadendo la conservazione dei pattern molecolari di sviluppo tra i vertebrati. Le cellule migrate dalla cresta neurale si differenziano in cellule cartilaginee, neuronali, gliali e pigmentate, mentre il circostante mesenchima dà origine a muscoli ed endotelio. Il segmento di collocazione finale nella migrazione delle cellule della cresta neurale è predeterminato dalla loro posizione rostro-caudale; il differenziamento in tipi cellulari diversi è invece in relazione con la loro posizione medio-laterale. Le cellule a primordiale localizzazione laterale si differenziano in cellule di Schwann o neuroni, mentre quelle più mediali in cartilagine, cellule pigmentate e connettivali. Questo genere di differenziamento basato sulla posizione pre-migratoria nella cresta neurale non è stato osservato in altri vertebrati. Trattandosi di un processo altamente conservato tra esseri viventi con diverso grado evolutivo, è possibile sia più facilmente apprezzabile nel pesce dati il rapido sviluppo ed il relativamente basso numero di cellule (Yelick P.C., 2002). La determinazione dei destini di differenziamento cellulare sembra essere dovuta, almeno in parte, dall'espressione di proteine della Wnt family nella linea mediana dorsale embrionale. Anche l'analisi della segmentazione degli archi faringei appare diretta e facilitata in questi embrioni trasparenti. Ogni arco è formato da cartilagini ed ossa derivanti dalla cresta neurale che rassomigliano quelle degli altri vertebrati. Lo sviluppo cartilagineo è molto rapido ed in cinque giorni gran parte dello scheletro faringeo appare ben formato. La formazione delle ossa avviene a partire dal quinto o sesto giorno di sviluppo. Anche lo Zebrafish presenta osso di origine sia intramembranosa che endocondrale. Osservando al microscopio l'embrione di Zebrafish è possibile constatare come le cellule si organizzino e dividano per definire la complessità di forma e dimensione degli organi.

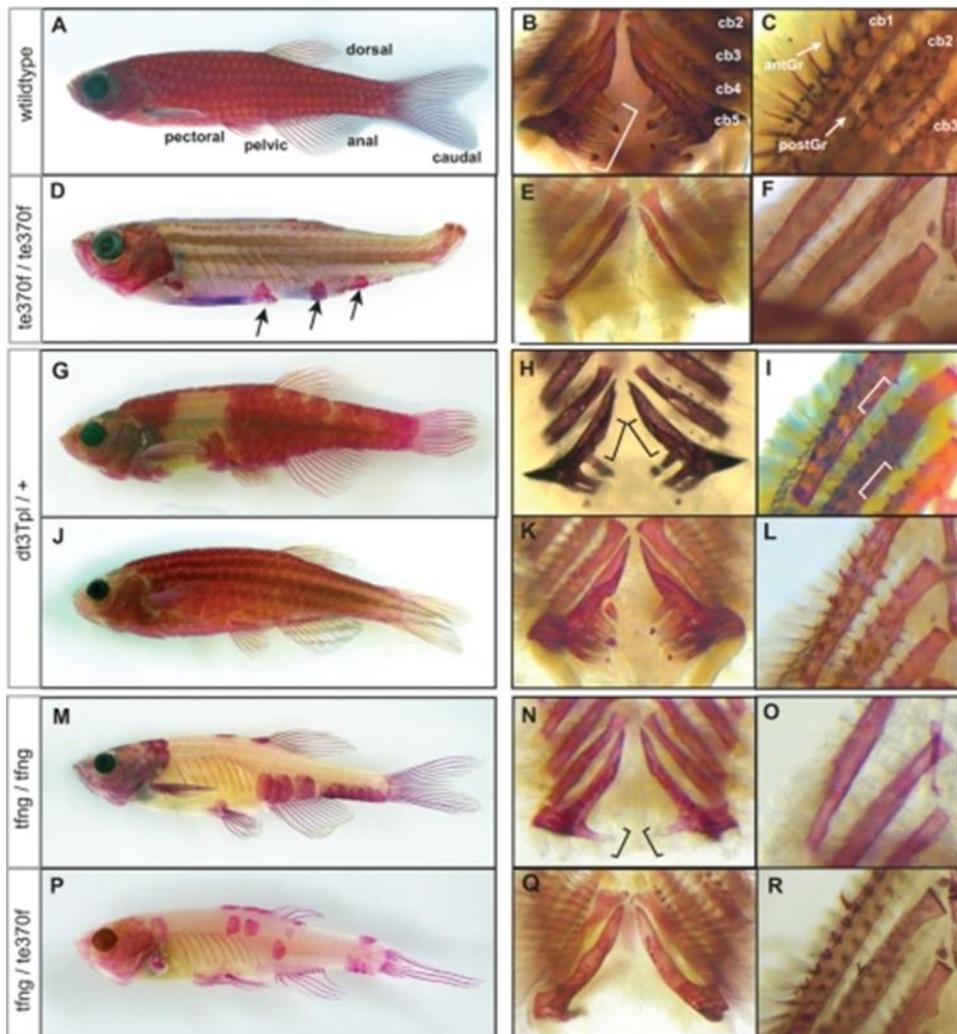
In tutti i Ciprinidi vi è assenza di denti nella cavità orale, ma sono presenti denti faringei bilaterali e simmetrici che esibiscono una struttura analoga a quelli degli altri vertebrati, rappresentando perciò un potenziale modello di studio. Nel pesce Zebra i germi dentari compaiono attorno al quattordicesimo giorno dopo la fecondazione, originando direttamente dall'epitelio faringeo. Nello stadio iniziale si assiste alla formazione di un organo epiteliale che acquista la tipica forma a campana e già dopo quarantotto ore dalla fecondazione si assiste alla formazione di smalto e dentina. Nell'arco di altre

ventiquattro ore il dente è completamente differenziato e fornito di un apparato di attacco all'osso. Il dente faringeo maturo presenta cavità pulpare, dentina ed una componente simile allo smalto. La morfogenesi è controllata da segnali epiteliali che inducono una espressione differenziale di fattori di trascrizione nel mesenchima dentinale adiacente, particolarmente quelli espressi da geni Homeobox. Ogni regione del mesenchima faringeo specifica la differente forma e tipo di dente attraverso l'espressione di Hox differenti nelle varie regioni. Il maggior ruolo nella promozione dello sviluppo dentale dei mammiferi avviene grazie a quattro gruppi di molecole: Wnts, BMPs, FGFs ed Hhs. L'espressione dei rispettivi geni durante i vari stadi dell'odontogenesi risulta nella formazione di denti di specifica forma e tipo. Attualmente nel pesce Zebra sono stati identificati molti geni ortologhi a quelli coinvolti nell'odontogenesi dei mammiferi, inclusi i membri di tutte e quattro le categorie citate (Yelick P.C., 2002).

La maggior parte delle mutazioni della mandibola e degli archi branchiali dello Zebrafish sono state identificate in due studi su larga scala adottando agenti mutagenici chimici, ad esempio introducendo nell'acqua la N-etil N-Nitrosurea (ENU). Il primo di questi studi, condotto al Max Planc Institute di Tubinga ha da solo condotto all'isolamento di più di 100 diversi mutanti, classificati quattro gruppi: difetti nello scheletro ventrale di ogni arco faringeo (particolarmente gli archi di mandibola e ioide); difetti negli archi posteriori, oltre il quinto (riguardanti in particolar modo branchie e denti); difetti di crescita e differenziamento cartilagineo; difetti craniali mediani (Neuhass S.C., 1996). Lo screening mutagenico realizzato presso l'università di Boston ha portato alla produzione di quarantotto fenotipi di mutazione scheletrica in trentaquattro loci genetici, molti dei quali simili all'esperimento di Tubinga, classificati in -difetti dell'intera organizzazione dello scheletro cranio facciale, -difetti morfogenetici e di differenziazione cartilaginea, -difetti nell'arrangiamento spaziale di elementi scheletrici di aspetto normale.

Date le possibilità di studio dello sviluppo craniofaciale e delle interazioni tra ectoderma e mesoderma negli stadi embrionali lo Zebrafish è un modello utile anche per lo studio della Displasia Ectodermica. E' stato infatti rilevato come mutazioni dei geni dell'Ectodisplasia e del suo pathway di regolazione portino alla formazione di un fenotipo analogo a quello umano, in particolare per quanto riguarda le anomalie dentali di numero e forma, essendo il segnale espresso da EDA necessario al corretto sviluppo di

queste strutture anche nel pesce. Numerose sono state le mutazioni individuate che presentano analogie con sindromi EDs umane. Uno di questi fenotipi mutanti era già stato isolato nelle sperimentazioni di Tubinga come Finless (Fls) in esemplari adulti caratterizzati dall'assenza delle pinne, causati da mutazioni alleliche recessive (Fig. 12).



**Fig. 12:** Alterazioni dello scheletro dermico dell'adulto e dei denti faringei negli esemplari affetti da mutazione di Fls

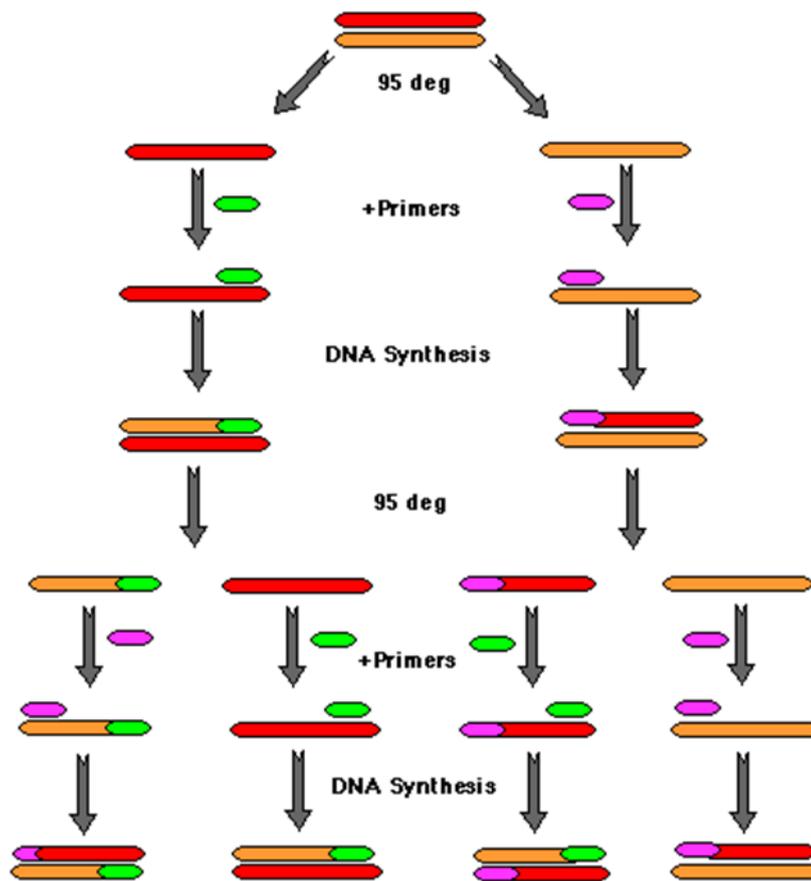
La mutazione in omozigosi di un altro gene, denominato Fang, genera un fenotipo con un unico dente nel quinto arco branchiale. Un altro gene chiamato Nackt (nkt) mutato in eterozigosi causa un difetto nella forma e disposizione delle scaglie ed in omozigosi provoca alterazioni dello sviluppo craniofacciale e riduzione del numero dei denti. Nei fenotipi Fls ed Nkt sono rispettivamente mutati EDAR ed EDA pertanto lo Zebrafish si

presta allo studio della Displasia Ectodermica Ipoidrotica e probabilmente in futuro anche di altre EDs.

## **DIAGNOSI GENETICA**

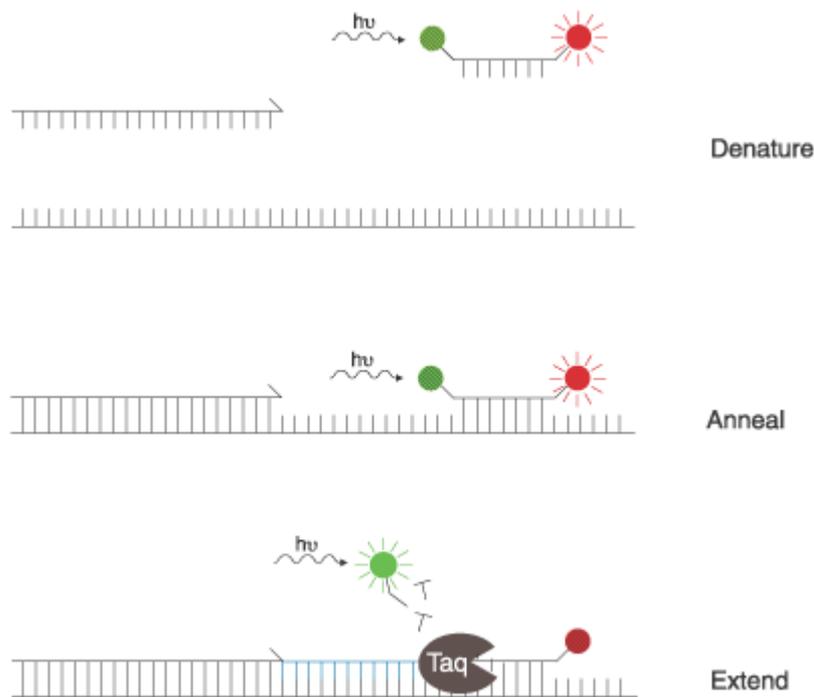
Nelle Displasie Ectodermiche si assiste alla presenza di tratti fenotipici simili in sindromi differenti, alla penetranza molto variabile ed a diversi tipi di mutazioni per una stessa malattia. Essendo patologie ereditarie che possono essere trasmesse alla prole, la diagnosi genetica è fondamentale non solo per diagnosticare la sindrome ma anche per offrire consulenza in caso un individuo affetto o portatore intenda avere figli. Il sequenziamento del DNA è una procedura fondamentale nella diagnosi genetica delle malattie mendeliane. Quando si conosce la mutazione causativa (o più spesso nelle EDs, le differenti mutazioni patologiche di un gene) il sequenziamento permette di identificare differenze di sequenza tra il gene proveniente dal probando e la fisiologica sequenza nota. Qualora si identifichino nuove mutazioni differenti da quelle cui è già riconosciuta una valenza eziologica, il problema è stabilire se esse abbiano o meno una valenza patologica. In genere estese delezioni, mutazioni nonsense e slittamenti del modulo di lettura provocano la perdita di funzione genica. Anche le mutazioni alle sequenze di nucleotidi che fiancheggiano gli introni causano spesso patologie per alterazione dello splicing. Mutazioni di un singolo aminoacido sono tanto più probabilmente patogene quanto più l'aminoacido è conservato tra le specie e fa parte di un dominio funzionale cruciale della proteina in questione. Duplicazioni e delezioni possono essere individuate con la tecnica della Polymerase Chain Reaction (PCR), che consente la sintesi esponenziale in vitro di un frammento di DNA a partire da un filamento "stampo" di cui si conosca la sequenza nucleotidica delle regioni terminali. Il processo si basa su tre procedure fondamentali: la denaturazione al calore, l'ibridizzazione di primers complementari alle estremità del tratto da amplificare e la polimerizzazione dei due singoli filamenti da parte della DNA polimerasi previa aggiunta di nucleotidi in soluzione. La ripetizione di questo ciclo consente di ottenere numerose copie del frammento interessato (Fig. 13). Sottoponendo i prodotti ottenuti ad elettroforesi (migrazione sotto azione di un campo elettrico attraverso una matrice di gel), i diversi frammenti di DNA migrano da un polo all'altro con velocità proporzionale alla loro grandezza e alla loro resistenza nel gel. Conoscendo la porzione di DNA

generalmente deleta in una determinata malattia vengono inseriti dei primer specifici per quella regione. L'assenza di un prodotto di duplicazione è indicativa di delezione.



**Fig.13:** rappresentazione schematica delle tre fasi della PCR che dimostra come venga esponenzialmente aumentato il numero di copie del frammento selezionato

Attualmente l'accuratezza nella ricerca di duplicazioni e delezioni è stata incrementata dalla messa a punto della tecnica di PCR real time, basata sull'introduzione nella miscela PCR di una sonda fluorogena complementare alla sequenza di DNA da amplificare. Durante la fase di ibridazione i primers e la sonda si legano alla porzione della singola elica complementare alla loro sequenza. Durante la fase di estensione del primer la DNA polimerasi separa la sonda grazie alla sua attività endonucleasica e determina la liberazione del marcatore fluorescente con emissione di una radiazione luminosa, che viene rilevata in tempo reale da una fotocamera CCD: per ogni copia di DNA sintetizzata una sonda venga degradata con emissione di una unità di fluorescenza rivelabile dal detector (Fig. 14).



**Fig. 14:** incorporazione di una sonda nella Real Time PCR. La sonda è dotata di due fluorocromi. Quello a più bassa energia annulla la fluorescenza dell'altro. Quando la polimerasi li distacca si ha perciò emissione di radiazione luminosa

Questa tecnica permette di ottenere informazioni precise in termini di quantificazione del prodotto di sintesi, individuando delezioni e duplicazioni. In commercio sono reperibili anche altri sistemi in grado di determinare mutazioni note, anche riguardanti un solo nucleotide, ad esempio sfruttando la capacità di piccole sonde di DNA a singola elica (15-20 nucleotidi) di legarsi specificamente alla porzione complementare di DNA target in cui si intende verificare la presenza di una mutazione. Tutte queste tecniche fanno parte della cosiddetta diagnosi molecolare diretta, in cui le mutazioni vengono ricercate direttamente sul DNA del probando (o eventualmente sull'RNA o sul prodotto proteico). La diagnosi molecolare indiretta (analisi di linkage) stabilisce la possibilità di avere ereditato e di trasmettere un gene malattia studiando la segregazione tra i familiari di polimorfismi del DNA di cui si stabilisce la tendenza statistica alla segregazione con il gene malattia. Durante la prima divisione meiotica avviene la ricombinazione di porzioni cromosomiche (crossing over). Qualora due loci siano posti in siti molto distanziati (ad esempio alle estremità del braccio lungo e del braccio corto), la regione compresa tra di essi sarà sempre soggetta ad almeno un evento di crossing over ed i geni segregheranno in modo indipendente come se fossero posizionati in

cromosomi diversi. Al contrario tanto più sono vicini quanto minore sarà la possibilità che vi sia un crossing over tra i loci, per cui essi segregheranno insieme. Studiando la distribuzione familiare di polimorfismi prossimi al locus del gene malattia si comprende se sia stato ereditato. Questa tecnica presenta alcuni svantaggi e limitazioni, ad esempio la necessità di ottenere campioni di DNA da molti membri familiari distribuiti in più generazioni e l'impossibilità di individuare mutazioni de novo. L'analisi di linkage è stata frequentemente utilizzata per diagnosticare malattie di cui non si conosca l'identità genetica ma solo il locus del gene causa. Negli ultimi anni la diagnosi genetica si basa sempre più sugli approcci diretti, più rapidi e vantaggiosi. L'individuazione dei geni causa di malattia è spesso effettuata sull'analisi di geni candidati, i geni che per la loro funzione vengono sospettati causa della patologia. Con il progetto Genoma Umano la determinazione della sequenza dei geni che compongono l'intero genoma ha permesso di incrementare l'uso della diagnostica molecolare diretta. Quando si conosce la funzione ed il pattern di espressione nei tessuti di un gene è facile eleggerlo a candidato per una malattia. Tuttavia, non essendo sempre precisamente definite le funzioni dei singoli geni la correlazione tra gene candidato e fenotipo della malattia non è immediata, come avviene proprio in molte EDs che restano tutt'oggi prive di un gene/causa identificato. Al contrario in quelle forme di EDs di cui si conosca l'eziologia si procede con il testing più idoneo per le mutazioni più frequentemente riscontrate. Ad esempio nel sospetto, guidato dalla diagnosi clinica, di una X-linked HED, vengono innanzitutto performate analisi di sequenza del gene EDA, che identificano circa il 95% delle mutazioni di EDA, incluse mutazioni nonsense, missenso o le piccole delezioni. Se non si identifica la mutazione con il sequenziamento si passa ai sistemi per individuare grandi delezioni o duplicazioni. Qualora il test risulti nuovamente negativo si ripete l'analisi per geni causa di HED autosomiche (Wright J.T., 2009).

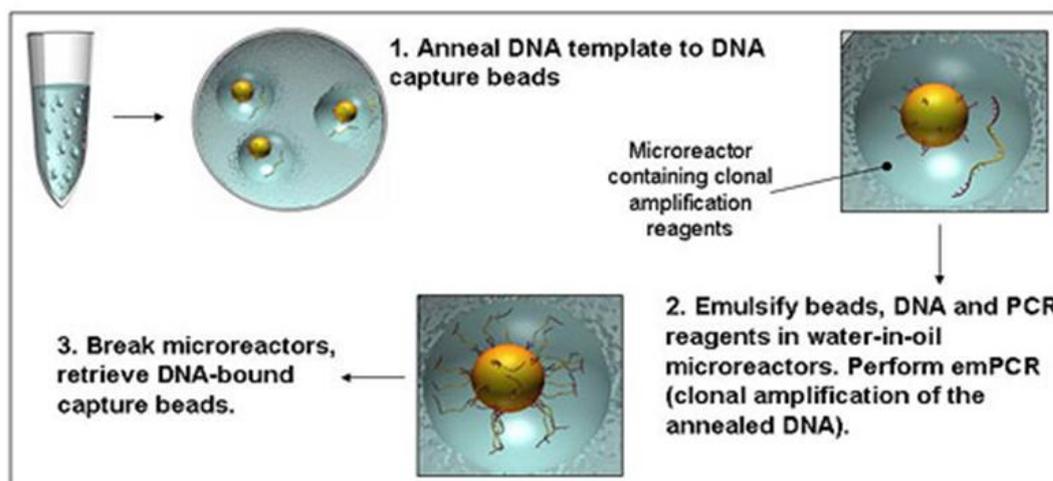
## **Il sequenziamento genetico**

Il sequenziamento del DNA, una delle tecniche più utilizzate per identificare mutazioni genetiche, fu introdotta da Sanger nel 1975. Questa tecnica sfrutta il principio della interruzione della sintesi del DNA da parte della DNA polimerasi (che sintetizza la doppia elica a partire da un filamento stampo a singola elica), grazie all'introduzione in soluzione dei quattro nucleotidi, ciascuno associato ad un distinto fluorocromo. Nella

stessa soluzione sono introdotti dei dideossinucleotidi terminatori, analoghi alle quattro basi del DNA ma in assenza del gruppo -OH nel carbonio in posizione 3' dello scheletro di zucchero legato alla base. Questo gruppo Ossidrile è necessario al legame con il nucleotide successivo durante la neosintesi della nuova catena e la sua mancanza provoca un'interruzione della catena in quella posizione. Il rapporto di concentrazione tra i dideossinucleotidi ed i normali nucleotidi è tale per cui la DNA polimerasi termina la catena nascente in tutte le posizioni statisticamente possibili in cui un dideossinucleotide possa essere inserito. Il risultato è la produzione di una serie di frammenti che condividono l'estremità iniziale ma risultano sfasati nella posizione finale di un unico nucleotide. Le diverse molecole di differente lunghezza che si ottengono al termine della reazione vengono separate tramite elettroforesi su gel. La sequenza, identificata mediante lettura delle emissioni a diverse lunghezze d'onda dei differenti fluorocromi da parte di una fotocamera digitale CCD, è riportata in un grafico (elettroferogramma), caratterizzato da una successione di picchi di quattro colori (adenina in verde, citosina in blu, guanina in nero e timina in rosso) corrispondenti ai diversi fluorocromi. Questa tecnica permette attualmente di individuare lunghe sequenze (fino a 1.000-1.200 basi). Promettenti vantaggi in ambito diagnostico derivano dalle recenti evoluzioni delle tecnologie di sequenziamento, denominate next generation sequencing (NGS). La base comune delle NGS è il principio del sequenziamento shogun. I singoli frammenti ottenuti dalla frammentazione enzimatica o meccanica del DNA genomico vengono clonati in numerosi campioni con la possibilità di essere sequenziati individualmente. Questo sistema permette il completo sequenziamento di lunghi frammenti di DNA mediante il riassettaggio dei frammenti di sequenza, guidato da una sovrapposizione parziale delle basi degli stessi diversi frammenti (Zhang J., 2011). Essendo il principio base delle NGS il sequenziamento contemporaneo di numerosi piccoli frammenti di DNA veicolati da differenti supporti (templates), si parla anche di sequenziamento parallelo massivo, considerando tuttavia che la lunghezza di lettura (il numero di basi sequenziale) è molto più corta rispetto al metodo Sanger (tra 50 e 500 paia di basi) a causa delle limitazioni della tecnologia attuale. Attualmente sono disponibili cinque differenti tecnologie di next generation sequencing: Roche GS-FLX 454 Genome Sequencer, Illumina/Solexa Genome Analyzer, ABI SOLiD platform, Danaher/Dover/Azco Polonator G.007, Helicos HeliScope.

## 454 genome sequencer

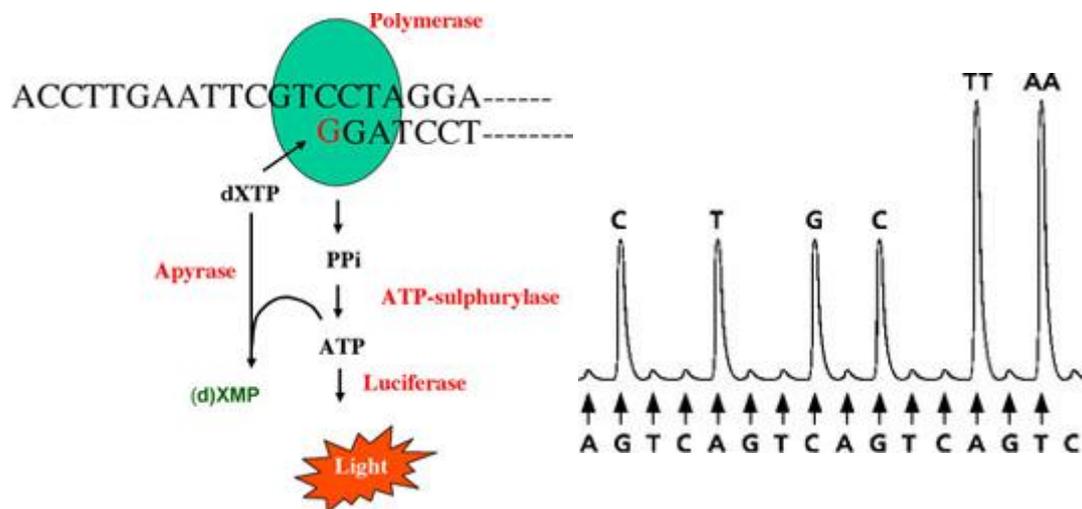
Questa tecnica di sequenziamento si basa sul procedimento preliminare di amplificazione del DNA mediante una particolare tecnica di Polimerase Chain Reaction detta PCR ad emulsione (Fig. 15).



**Fig. 15:** PCR ad emulsione. Nella sospensione si trovano diverse sfere; per ciascuna viene amplificato un diverso frammento di DNA. I frammenti di DNA legano la sfera attraverso degli adattatori oligonucleotidici comuni che fungeranno da primer per la polimerasi

Sfrutta il principio dell'emulsione, per cui un fluido è disperso in forma di minute goccioline in un altro fluido non miscibile. In una sospensione oleosa vengono inserite numerose micelle acquee, ognuna delle quali contiene una microsfera, la DNA polimerasi ed i nucleotidi per la reazione di sintesi. Su ciascuna microsfera sono legati dei primer comuni per l'innescamento della reazione di sintesi del filamento di DNA a singola elica da amplificare. Permette di condurre numerose reazioni PCR simultaneamente, una per ogni micella. Per ogni microsfera è possibile ottenere il sequenziamento di distinte porzioni di DNA mediante sintesi di nucleotidi trifosfati aggiunti ciclicamente e registrazione dell'impulso luminoso ottenuto dalla reazione delle molecole di Fosfato (rilasciate durante l'incorporazione dei nucleotidi) con proteine fluorescenti (Fig. 16), ottenendo la produzione di luce in quantità equimolare al nucleotide inserito in ogni ciclo. La luce prodotta è letta da una camera CCD con foto moltiplicatore e tradotta come picco in un pirogramma. Continuando il processo, il filamento di DNA complementare è sintetizzato e la sequenza nucleotidica è determinata dai picchi del pirogramma (Fig. 16). Questa tecnica è attualmente in grado di sequenziare porzioni di

DNA fino a 400 base pair (bp), le più lunghe tra le NGS attualmente prodotte (Zhang J., 2011).

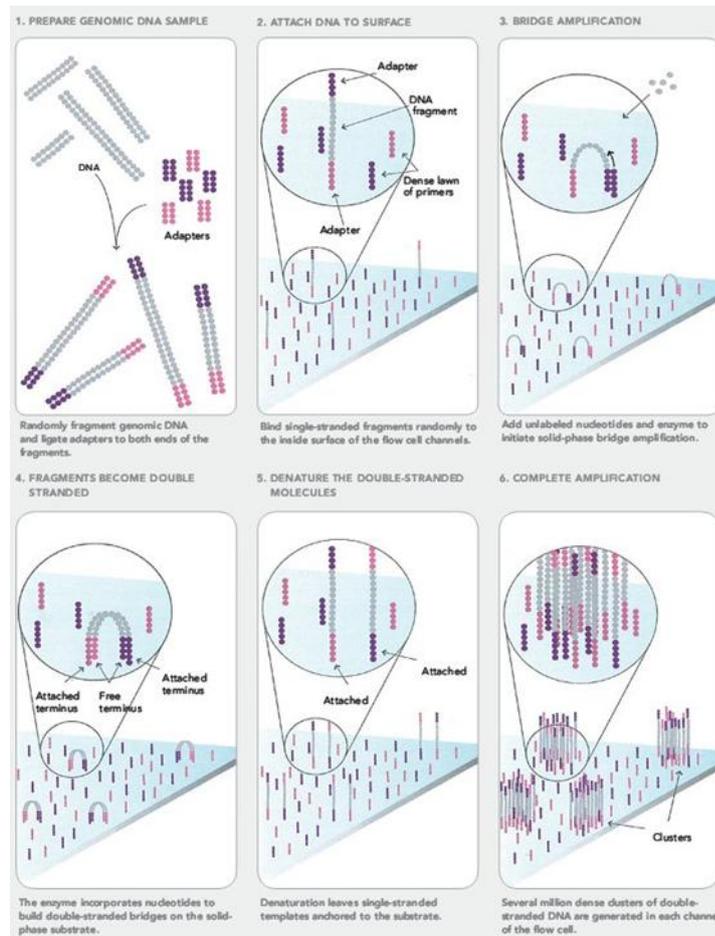


**Fig. 16:** rappresentazione schematica del sequenziamento e dell'emissione luminosa. Nel pirogramma la quantità di nucleotidi per ciclo è dedotta proporzionalmente dall'altezza del picco

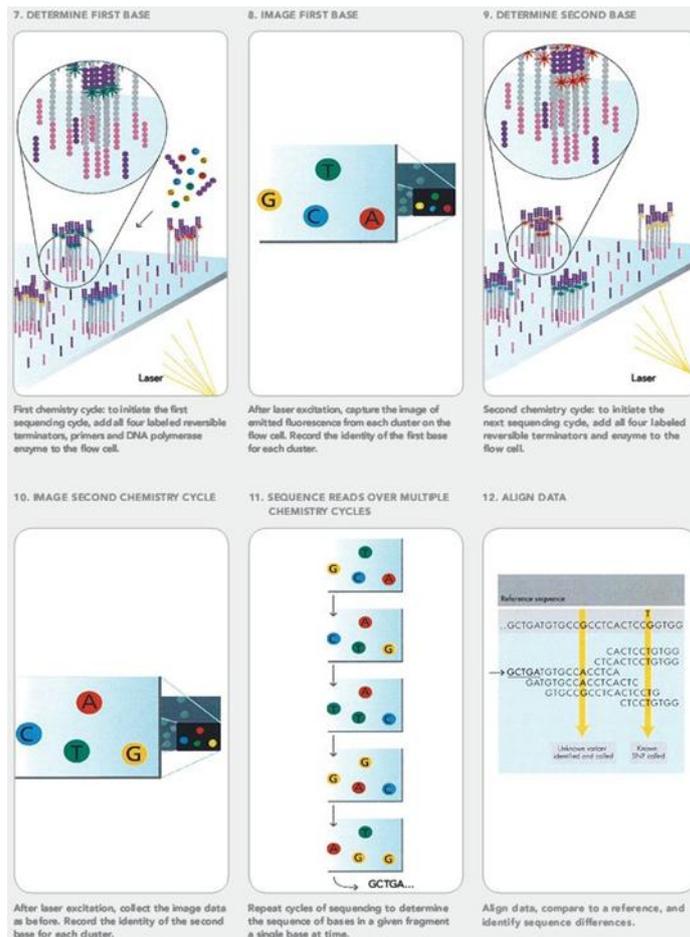
## Illumina/solexa

Il sistema Illumina/Solexa, la seconda tecnologia di nuova generazione ideata, è attualmente la più utilizzata per la sua versatilità ed il basso numero di distorsioni. Sfrutta l'utilizzo di templati rigidi densamente arricchiti con sequenze primer standard portanti filamenti di DNA a singola elica. La duplicazione clonale di questi filamenti avviene lungo i primer liberi ad opera di una polimerasi batterica termoresistente (Fig.17). Innalzando la temperatura si ottengono nuovi singoli filamenti che possono essere ulteriormente amplificati con l'aggiunta di altri nucleotidi. In questo modo si ottengono numerosi cloni a singola elica del frammento di DNA che si intende sequenziare. In uno stesso template possono essere ottenuti clusters di diversi frammenti di DNA. Il sequenziamento vero e proprio avviene tramite l'aggiunta di nucleotidi associati ad un marcatore reversibile. A differenza del precedente sistema vengono aggiunti contemporaneamente alla reazione tutti e quattro i tipi di nucleotidi, ciascuno dei quali è associato ad un distinto marcatore fluorescente. Il marcatore reversibile consente l'incorporazione di un nucleotide per volta durante la sintesi del DNA. Il processo prosegue con il distacco del terminatore previo aumento di temperatura. Ad ogni nucleotide incorporato alla catena nascente viene effettuata una

stimolazione laser che consente la lettura dell'emissione di luce differente per gli specifici nucleotidi. È possibile procedere ad una lettura simultanea di più clusters durante la sintesi incrementando l'efficienza e la versatilità del sistema (Fig. 18). Attualmente questa tecnologia svolge letture corte di un massimo di 200 bp (Zhang J., 2011).



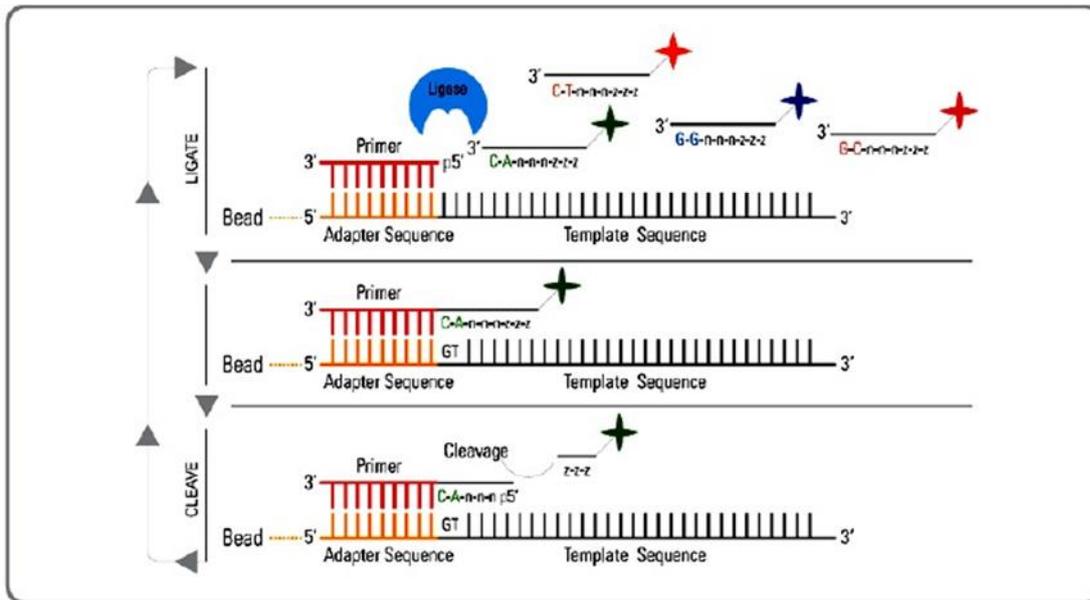
**Fig. 17:** rappresentazione della PCR su supporto solido. Il frammento di DNA a singola elica con gli adattatori alle estremità si lega agli adattatori complementari di cui è coperto il template e che fungono da primer per la polimerasi



**Fig. 18** : rappresentazione del sequenziamento in contemporanea su più clusters grazie all'incorporazione di nucleotidi distintamente marcati che terminano temporaneamente la sequenza ad ogni incorporazione permettendo la lettura laser di tutti i cluster un nucleotide per volta.

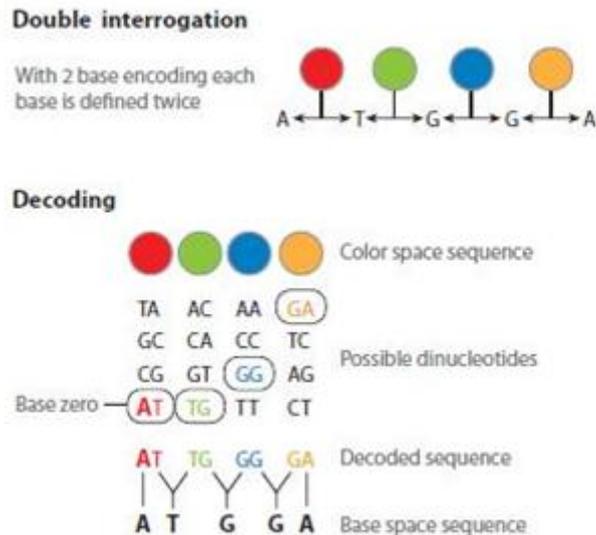
## ABISOLiD

Nel sistema **ABISOLiD**, che utilizza la PCR ad emulsione per l'amplificazione del DNA, il monofilamento da sequenziare è collegato ad una microsfera tramite una specifica sequenza di primer. La differenza rispetto alle precedenti tecniche consiste principalmente nell'utilizzo, al posto della polimerasi, della DNA ligasi (sequenziamento per ligazione) è in grado di legare nucleotidi alle catene di DNA interrotte procedendo sia in direzione 5'-3' che viceversa. Questa metodica utilizza le sonde dinucleotidiche, associate a quattro differenti marcatori fluorescenti visualizzati secondo un output di quattro colori. In condizioni ambientali appropriate l'enzima svolge la ligazione delle sonde dinucleotidiche alle posizioni complementari (Fig. 19).



**Fig. 19:** rappresentazione dell'incorporazione delle sonde oligonucleotidiche inserite contemporaneamente che competono per il legame con la sequenza complementare del filamento in studio

In seguito alla visualizzazione a quattro colori, le sonde 1,2 legate sono chimicamente separate con ioni Argento, ripetendo il ciclo altre nove volte. Quindi si procede al clivaggio dei prodotti di sintesi e si sostituisce il primer con un altro analogo ma differente per una sola base rispetto al precedente (n-1). Si procede con altri quattro round di ligazione, ognuno per dieci cicli. Le sonde 1-2 dinucleotidiche sono designate per interrogare la prima (x) e la seconda (y) posizione adiacenti al primer ibridizzato, cosicché i sedici dinucleotidi sono visualizzati da quattro colori. L'esatto ordine delle basi nella sequenza di DNA si ottiene dalla definizione di ogni base nucleotidica in due reazioni di ligazione indipendenti con due distinti primers (Fig. 20). Anche questa tecnica consente il sequenziamento di una grande quantità di materiale genetico mediante letture corte (50 bp) (Zhang J., 2011).



**Fig. 20:** nel sistema ABI SOLiD ciascuna sonda di un certo colore è riferita a due possibili nucleotidi. La determinazione dell'esatto nucleotide su ogni punto della sequenza si ottiene con l'indagine comparativa su differenti reazioni

## Polonator G.007

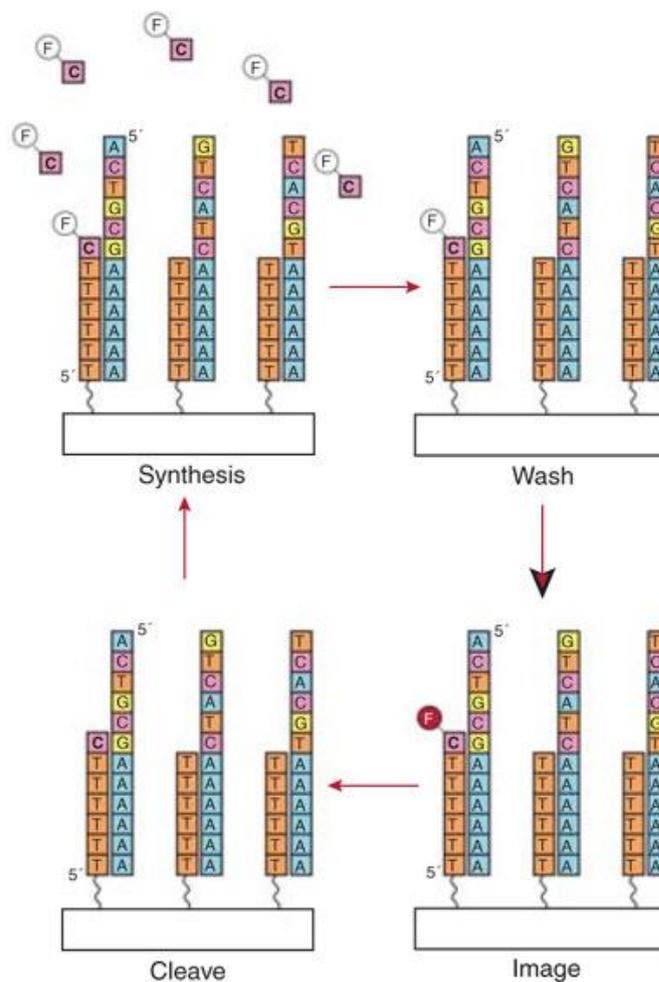
Il sistema Polonator, una recente tecnologia anch'essa basata sull'amplificazione della sequenza da analizzare mediante PCR ad emulsione, consente il sequenziamento in parallelo di diversi frammenti di DNA legati a microsferi con una lunghezza di lettura è di ventisei paia di basi (Zhang J., 2011).

## Helicos HeliScope

Tutte le tecniche di sequenziamento analizzate necessitano di una preliminare amplificazione del DNA mediante tecnica PCR per ottenere durante l'incorporazione dei nuovi nucleotidi un output di lettura (un segnale luminoso), sufficientemente rappresentato ed intenso da evitare errori di interpretazione. Il progresso nelle tecnologie di amplificazione e lettura dell'output luminoso ha permesso il sequenziamento in tempo reale mediante rilevamento della radiazione luminosa emessa con l'incorporazione di ogni singolo nucleotide. L'affinamento di questi sistemi ha permesso di ottenere precise informazioni sulla sequenza senza necessità di intensificare il segnale.

Il sistema Helicos HeliScope si basa sul principio del sequenziamento senza amplificazione. Il campione di DNA o di RNA viene frammentato e legato a specifici

primer (code poli A e poli T) su un supporto rigido. Assieme alla polimerasi vengono aggiunti i nucleotidi con marcatore fluorescente, procedendo sequenzialmente una base per volta. Quando un nucleotide è aggiunto alla catena il distacco del marcatore provoca l'emissione di una radiazione luminosa (Fig. 21). Questo sistema, che può essere performato su miliardi di frammenti di DNA, consente una lettura rapida, una diminuzione dei tempi procedurali complessivi e delle distorsioni potenzialmente legate all'aggiuntiva procedura di PCR (Zhang J., 2011) Attualmente questo sistema performa letture in frammenti di trenta-trentacinque paia di basi.



**Fig. 21:** rappresentazione schematica del sequenziamento Helicos. I nucleotidi vengono inseriti una base per volta; quelli che vengono legati liberano una radiazione luminosa captata dal sistema di imaging. È possibile effettuare più letture contemporaneamente

In conclusione le nuove tecniche permettono un sequenziamento rapido, scarsamente influenzato da distorsioni procedurali, capace di analizzare grandi quantità di DNA con

una riduzione dei tempi e delle procedure fino all'annullamento delle tecniche di espansione (sequenziamento di terza generazione). Queste tecnologie sono state impiegate nel progetto di sequenziamento dell'intero genoma umano. La possibilità di sequenziare il genoma di un intero organismo in tempi relativamente brevi (nell'ordine di mesi) apre nuove prospettive di ricerca per individuare nuove mutazioni sconosciute. È quindi chiaro come l'auspicabile passaggio dalla sperimentazione alla diffusione commerciale per un più capillare utilizzo clinico possa permettere di individuare i geni responsabili delle molte EDs ad eziologia molecolare ancora sconosciuta.

## **DIAGNOSI PRENATALE**

### **Ecografia**

L'ecografia in epoca prenatale può suggerire la diagnosi di sospetto di Displasia Ectodermica evidenziando l'assenza di germi dentali. La mineralizzazione dei germi ha inizio all'incirca alla quattordicesima settimana per terminare verso la diciottesima, epoca a partire dalla quale queste strutture sono evidenziabili all'ecografia. La diagnosi di sospetto indirizza verso test genetici, particolarmente in famiglie in cui sia già presente un figlio affetto. L'indagine ecografica è particolarmente utile nella diagnosi di alcune patologie ectodermiche dai tratti peculiari, come la sindrome EvC, essendo possibile valutare la crescita degli arti fetali nel primo trimestre di gravidanza. La sindrome di EvC si caratterizza per la presenza di polidattilia postassiale, arti corti e torace stretto. Numerose altre Displasie Ectodermiche presentano malformazioni alle dita della mano e possono essere sospettate e poste in un quadro di diagnosi differenziale con altre Displasie Scheletriche e malformazioni. L'abbozzo dell'arto è visibile con gli ultrasuoni dalla settima settimana di gestazione, la calcificazione delle ossa lunghe ha inizio alla decima settimana e digitazioni distinte sono facilmente visibili dall'undicesima e valutabili nel primo trimestre comparandole a misurazioni biometriche statistiche di crescita (Dugoff L., 2001). È comunque raccomandabile un follow-up con ecografia di controllo nel secondo trimestre per confermare queste malformazioni in uno stadio di sviluppo più avanzato. L'aumento dello spessore di traslucenza nucale è un marker sonografico accreditato di anomalie cromosomiche fetali. Su di esso si basa ad esempio il primo test per la sindrome di Down, che compara questo parametro al

rischio di base dell'età materna ed all'epoca gestazionale (undici-tredici settimane). Questo intervallo di tempo corrisponde ad una lunghezza del feto dal vertice cranico all'osso sacro (crown-rump length, crl) compresa tra i 45 e gli 80 mm. Successivamente questo segno tende a diminuire progressivamente con l'avanzare della gravidanza. L'incremento di spessore di traslucenza nucale è stato associato anche a numerose sindromi con cariotipo normale, incluse Displasie Scheletriche come la Displasia Tanatofora e l'Osteogenesi Imperfetta. Le possibili cause del fenomeno sono - congestione venosa del distretto testa- collo per compressione intratoracica dovuta al petto stretto, -alterazione nella composizione del collagene (Osteogenesi Imperfetta), - sviluppo anomalo o ritardato del sistema linfatico (Venkat-Raman N., 2005). Un caso di EvC è stato diagnosticato in una gestante con positività familiare per la sindrome mediante osservazione di un'aumentata traslucenza nucale alla tredicesima settimana di gestazione, diagnosi confermata dopo l'aborto con indagini post mortem. Un'ulteriore applicazione dell'ecografia è il suo utilizzo per la biopsia guidata di campioni di cute fetale, sui quali è possibile stabilire la presenza delle ghiandole sudoripare dopo la ventiquattresima settimana di vita intrauterina. Tuttavia attualmente la fetoscopia e la biopsia fetale sono in disuso per la diagnosi nelle Displasie Ectodermiche in quanto molto invasive e poco specifiche. In conclusione, l'ecografia non rappresenta uno strumento diagnostico in grado di identificare precisamente una sindrome ED ma può rivelare anomalie che indirizzano verso ulteriori approfondimenti diagnostici.

### **DNA fetale circolante**

Fino agli anni Cinquanta era possibile la diagnosi prenatale di una malattia genetica solo nelle famiglie con rischio conosciuto. Dal 1968 la possibilità di diagnosi prenatale è stata notevolmente ampliata dall'introduzione della tecnica dell'amniocentesi. Questa tecnica è in genere eseguita dalla sedicesima settimana di gestazione prelevando 15-20 ml di liquido amniotico con ago-aspirato sotto guida ecografica. Tuttavia questa procedura è correlata ad un rischio (pari allo 0,2-0,4%) di complicanze infettive e/o emorragiche il cui esito può essere l'aborto. (Sekizawa A., 2007). L'introduzione dell'analisi genetica dal prelievo dei villi coriali, intorno alla decima settimana di gravidanza, ha ridotto l'invasività della procedura diagnostica, nonostante permanga una percentuale (0,01-0,03%) di rischio di aborto o malformazioni agli arti del feto (queste ultime per

villocentesi prima dell'ottava settimana) (Sekizawa A., 2007). Per questo motivo la diagnosi prenatale con queste tecniche viene applicata solamente qualora vi sia un ragionevole rapporto tra il rischio ed il beneficio, come nel caso di un'età avanzata della gestante o di positività familiare per patologie genetiche. Ulteriori benefici sono stati introdotti da analisi del sangue condotte a metà del primo trimestre che attualmente permettono di individuare condizioni di aneuploidia come la trisomia 21. Infatti lo screening del siero materno per la valutazione della Gonadotropina Corionica Umana, dell'Estriolo, e dell' $\alpha$ -fetoproteina consente di individuare approssimativamente il 60% dei casi di trisomia 21, limitando l'uso dell'amniocentesi nei casi di positività al test. Permane tuttavia una percentuale di falsi positivi pari al 5%. Le possibilità di ridurre l'invasività procedurale per le malattie dovute a mutazioni di singoli geni è tuttavia rimasta molto limitata fino al recente ricorso dell'analisi del DNA fetale. Questo può essere isolato dal sangue materno tramite la ricerca delle cellule come i trofoblasti, i leucociti o gli eritrociti fetali che vengono generalmente individuati ricorrendo all'isolamento con anticorpi fluorescenti. Ad esempio i leucociti fetali possono essere isolati mediante marcatori fluorescenti associati ad anticorpi che individuano specifici polimorfismi del Complesso Maggiore di Istocompatibilità ereditati paternamente e quindi distinguibili da quelli materni. Più complessa è l'individuazione dei trofoblasti, per cui non sono attualmente disponibili specifici anticorpi (Sekizawa A., 2007). La grande limitazione legata all'uso di queste cellule per l'estrazione del DNA fetale risulta nella loro persistenza nel sangue materno anche per diversi anni dopo la gravidanza. In questo modo un tentativo diagnostico potrebbe risultare falsato dalla coltivazione selettiva di cellule in realtà derivanti da una precedente gestazione. L'utilizzo degli eritrociti fetali nucleati può ovviare a questo problema, in quanto essi non sopravvivono più di alcuni mesi (Bianchi D.W., 1990). Nonostante ciò queste cellule sono molto rare e la loro ricerca ed arricchimento in vitro rimane un processo laborioso e costoso. La scoperta di DNA liberamente circolante nel plasma (cell free DNA, cfDNA) risale al 1948. La quantità di questo DNA aumenta considerevolmente in soggetti affetti da patologie come tumori maligni, lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide, ecc. ... tuttavia solo nel 1997 è stata dimostrata la presenza di cfDNA fetale (fetal cell free DNA, fcfDNA) nel plasma materno (Lo Y.M., 1997). Questo rinvenimento ha aperto nuovi scenari nel campo della diagnosi prenatale non invasiva. Il DNA fetale circolante nel plasma può

essere isolato già a partire dalla quinta settimana postmestruale ed è sempre rilevabile dalla nona, può raggiungere percentuali discretamente elevate (3,4-6,2% del DNA circolante totale) e la sua concentrazione aumenta proporzionalmente al progredire della gravidanza. Con un emivita di circa sedici minuti l'fcdDNA rappresenta un affidabile strumento diagnostico per la gravidanza corrente. L'origine di questo DNA fetale è ancora dibattuta. Una fonte sembra rappresentata dall'apoptosi dei trofoblasti, che avviene fisiologicamente entro un certo limite nella gravidanza ed aumenta considerevolmente nella preclampsia (Sekizawa A., 2007). Anche gli eritrociti fetali nucleati vanno incontro ad apoptosi quando passano nella circolazione materna. L'innescò dell'apoptosi sembra essere determinato dalla maggior concentrazione di ossigeno nel sangue materno, e potrebbe essere un meccanismo attraverso cui vengono eliminate le cellule fetali dal sangue della gestante in assenza di una risposta immunitaria materna, provocando il rilascio del DNA fetale (Sekizawa A., 2007). Il principale problema nell'utilizzo dell'fcdDNA risiede nella necessità di distinguerlo dal DNA circolante che origina dalle cellule materne. Il metodo più sicuro consiste nell'individuazione di sequenze tipiche di geni presenti nel cromosoma Y. In questo modo è possibile distinguere il DNA del feto da quello della madre in quanto priva del cromosoma Y. Diversamente non è possibile distinguere il DNA materno da quello di un feto femmina. In una famiglia dove il padre sia affetto da una condizione autosomica dominante e la madre sana, la diagnosi dipende dall'identificazione dell'allele paterno. Infatti, se il padre è affetto dalla malattia un test positivo del DNA fetale indica la presenza dell'allele paterno mutato ed il feto sarà affetto. Attualmente questa tecnica ha permesso di diagnosticare disturbi autosomici dominanti ereditati dal padre come la Corea di Huntington, la Distrofia Miotonica e l'Acondroplasia. Essa potrebbe trovare applicazione anche per le forme di EDs a trasmissione autosomica dominante. Tuttavia se il disturbo dominante si manifestasse nella madre non sarebbe possibile procedere con questa tecnica diagnostica, data l'impossibilità di distinguerne il DNA circolante materno da quello del feto per una mutazione autosomica. Diversamente in una famiglia dove entrambi i genitori siano portatori di differenti mutazioni per un disordine autosomico recessivo, il test negativo esclude l'eredità di un allele paterno mutato e quindi la possibilità di malattia per la prole. Non è comunque possibile sapere con questa metodica se il figlio è portatore di un allele mutato ereditato dalla madre. Allo

stesso modo un test positivo indica l'eredità paterna della mutazione ma non dà informazioni sull'eredità materna impedendo di diagnosticare la malattia nel feto. La diagnosi di patologie a trasmissione X-linked non è attualmente possibile per la stessa difficoltà di distinzione del DNA materno da quello fetale. Tuttavia sono attualmente in studio tecniche di riconoscimento basate sull'identificazione di sequenze di DNA metilate in modo differente nei tessuti materni ed in quello feto-placentare. Ad esempio è stata proposta una distinzione su base epigenetica basata sul polimorfismo di un singolo nucleotide del gene Insuline Growth Factor 2 (IGF2). Questo è metilato quando ereditato dalla madre e non è metilato se ereditato dal padre (Poon L.L, 2002). Vi è attualmente un maggior interesse nello sviluppo di test per la ricerca di aneuploidie (trisomia 21) piuttosto che di malattie mendeliane legate a mutazione di un singolo gene, data la loro minore diffusione e le difficoltà descritte. Tuttavia se queste tecniche per l'individuazione del DNA fetale si svilupperanno con successo i test prenatali non invasivi potranno essere applicati ad un largo numero di malattie a trasmissione mendeliana, incluse le EDs di cui si conosca il gene responsabile.

## **DIAGNOSI CLINICA**

Nonostante i progressi nella diagnosi genetica, derivati anche da una migliore comprensione dell'eziologia di alcune delle sindromi EDs, molto spesso essa viene performata solo dopo una diagnosi clinica presuntiva. Questo è soprattutto valido in tutti i casi in cui non vi sia una storia familiare di Displasia Ectodermica. La diagnosi clinica nel periodo neonatale può talvolta essere difficoltosa in quanto non è possibile l'immediata osservazione clinica dei caratteri fenotipici talvolta altamente suggestivi, come l'ipodonzia. Anche l'ipotricosi può essere sottostimata come indicatore diagnostico per la sua comune presentazione in epoca perinatale. Un segno spesso indicativo sono i ricorrenti episodi febbrili fin dai primi giorni di vita, con iperpiressia spesso grave (temperatura rettale superiore ai 41°) (Guerrero-Fernandez J., 2003). L'esclusione di fattori eziologici alternativi (ad esempio infettivi) unitamente all'osservazione di una scarsa od assente sudorazione guidano verso il sospetto di una sindrome ipo od anidrotica. Un'indagine retrospettiva su 52 pazienti con HED ha rivelato che sedici di essi (31%) aveva presentato episodi febbrili nel periodo neonatale, confermando una buona validità di questo indicatore (Clarke A., 1987). Più complessa

può essere una precoce identificazione di sindromi idrotiche. L'ipoparatiroidismo idiopatico può associarsi a difetti dello sviluppo delle strutture ectodermiche comportando una diagnosi differenziale. La verifica dell'ipoplasia od assenza di ghiandole sudoripare è stata spesso condotta analizzando campioni istologici da biopsie cutanee, in particolar modo in regione palmare (Rouse C., 2004). Test per quantificare la sudorazione possono essere presi in considerazione. È possibile ad esempio verificare visivamente la sudorazione dopo aver apposto sui palmi delle mani un materiale siliconico da impronta di uso odontoiatrico (Wright J.T., 2009). Questo permette anche all'odontoiatra di rafforzare un iniziale dubbio diagnostico scaturito dall'osservazione della dentatura in un ipotetico paziente con un fenotipo dubbio. Una quantificazione più precisa della sudorazione si ottiene sottoponendo la mano del paziente ad una provvisoria fonte di calore ed apponendola successivamente su fogli con talco-iodato. La soluzione iodata vira verso un colore scuro al contatto con il sudore offrendo un'immagine della distribuzione delle ghiandole sudoripare (Rouse C., 2004). Attualmente queste tecniche diagnostiche sono in disuso, a favore di una osservazione degli sbocchi delle ghiandole sudoripare mediante oftalmoscopio, meno invasiva e traumatizzante nel bambino (Masse J.F., 1994). Un'altra possibile caratteristica che acquisca il sospetto diagnostico è la presenza di pigmentazione periorbitaria nel bambino normo maturo o la sua persistenza nel postmaturo. Qualora la diagnosi prenatale non sia disponibile e quella post natale non avvenga in maniera tempestiva, l'osservazione di caratteristiche fenotipiche quali l'ipotricosi, i difetti ungueali e l'ipodonzia può rivelarsi un utile approccio nell'iter diagnostico; anche l'osservazione con lampada a fessura della palpebra per la ricerca di un ridotto od assente numero di dotti delle ghiandole Meibomiane può essere indicativo (Saw V.P., 2008). Molti di questi pazienti presentano ipotricosi in associazione a capelli ipopigmentati, fragili e sottili. Questi caratteri non sono però patognomonic né abbastanza sensibili da costituire da soli un sufficiente criterio diagnostico (Rouse C., 2004). L'ipodonzia è di frequente riscontro in numerose sindromi EDs. Nella HED è stata ad esempio riscontrata una media di nove denti permanenti; sono più spesso presenti i canini ed i primi molari (Lexner M.O., 2007). Frequenti sono anche le anomalie di forma, come l'aspetto conico della corona, o quelle di dimensione, come la microdonzia. Anche il taurodontismo è stato riportato come un marker sindromico significativo, particolarmente in riferimento ai molari mandibolari

(Gros C.L., 2010). L'associazione di anomalie dentarie con una tipica facies vecchieggiante è un significativo indicatore di una sindrome displastica. Per una più estesa descrizione dei pattern dentali e craniofacciali si rimanda al Capitolo 2. In donne portatrici di X-linked HED è stata riscontrata la presenza di incisivi conoidi e riduzione delle dimensioni mesiodistali molari (Clauss F., 2008). Esse sembrano inoltre esibire un fenotipo craniofacciale caratteristicamente presentante ipoplasia mascellare e del terzo medio del volto, indipendentemente dalla gravità del fenotipo dentale (Clauss F., 2008). Una più estesa quantificazione di questi caratteri fenotipici nei portatori, analizzando campioni numerosi, potrebbe fornire importanti markers per indirizzare verso la consultazione genetica.

In conclusione la diagnosi clinica si basa sull'osservazione di segni e sintomi ricorrenti nelle diverse sindromi (ipotricosi, ipodonzia, aspetto della cute, ecc.) e talvolta anche di aspetti caratteristici di quadri sindromici particolari (ectrodattilia, anchiloblefaron, ecc.). La diagnosi non si basa tanto sulla ricerca di singole caratteristiche patognomiche quanto piuttosto sull'associazione di più sintomi e caratteristiche ricorrenti ed il suo scopo è indirizzare al counseling genetico.

## **TERAPIE SPERIMENTALI**

### **Terapia con proteina ricombinante**

Il trattamento causale delle malattie genetiche è uno dei più importanti obiettivi che la genetica medica si prefigge. Negli ultimi due decenni la terapia genica è stata al centro degli sforzi della ricerca contribuendo ad importanti progressi ma spesso senza giungere a soluzioni terapeutiche applicabili sul piano clinico quotidiano per la cura di sindromi.

Anche per quanto riguarda le Displasie Ectodermiche la sperimentazione si è concentrata sulla ricerca di soluzioni causali e definitive per le manifestazioni di questi disordini. L'approfondimento delle conoscenze sui meccanismi eziologici di alcuni quadri come la HED hanno reso possibile l'ideazione di strategie terapeutiche mirate. Allo stesso modo l'assenza di chiarezza sul ruolo di geni e proteine alla base di altre Displasie Ectodermiche od una loro mancata individuazione non consente un progresso per tutte le forme di ED. Questa tendenza è almeno in parte correlabile alla frequenza di incidenza. Sindromi più rare offrono minori possibilità di studio ed osservazione ma

d'altra parte suscitano anche un minor interesse nell'investimento per la ricerca se paragonate a malattie più diffuse.

Studi sperimentali condotti negli ultimi anni su animali hanno evidenziato nuove possibilità terapeutiche nella cura della Displasia Ectodermica Ipoidrotica attraverso la somministrazione di una forma ricombinante di Ectodisplasina A. Il principio alla base di questa soluzione terapeutica è correlato alle conoscenze emerse sul ruolo di questa proteina. Avendo chiarito come il fenotipo della HED sia provocato dall'assenza di una proteina correttamente funzionante si è ipotizzato di poterlo correggere introducendo la proteina wild type.

La produzione di questa proteina è ottenuta a partire dal DNA complementare (cDNA). Per ottenere cDNA si sfrutta l'azione della trascrittasi inversa, in grado di ottenere il filamento di DNA complementare da un mRNA maturo (che sia cioè già stato sottoposto a splicing delle sequenze introniche). Attraverso la DNA polimerasi viene dunque sintetizzata una doppia elica che, analogamente al DNA procariote, risulta priva di sequenze introniche e può quindi essere integrata in esso. Questo procedimento consente di ottenere la sintesi di proteine eucariotiche da parte di cellule procariotiche. Sfruttando questa tecnica sono state prodotte proteine EDA-A1 ed EDA-A2 consistenti del solo Receptor Binding Domain (AA 245-391 per l'isoforma A1 ed AA 245-389 per l'isoforma A2). La proteina ricombinante si lega al terminale C di un IgG1Fc Domain. Fc garantisce la stabilità alla proteina proprio come il dominio collagene e consente la veicolazione della stessa dal circolo materno all'embrione tramite i recettori Fc placentari.

Esperimenti hanno testato l'efficacia terapeutica di questa soluzione sia durante la gravidanza che sulla prole in diversi periodi post-nascita e con differenti protocolli di dosaggio. L'iniezione endovenosa di 400 µgr dei ricombinanti Fc:EDA-A1 ed Fc:EDA-A2 in topi Tabby nei giorni gestazionali undici, tredici e quindici non ha sortito alcun cambiamento del fenotipo materno [Gaide e Schneider, 2003]. La prole ha invece manifestato una correzione fenotipica notevole e stabile per tutta l'età adulta a seguito della terapia con Fc:EDA-A1. In particolare si è osservato un ripristino dei peli della coda e delle ghiandole sebacee. Nel manto erano presenti quasi tutti i tipi di pelo e si notava un ripristino dei peli nelle caratteristiche aree di alopecia retroauricolare. Il numero complessivo dei follicoli piliferi del ventre in topi di dieci giorni apparivano in numero

maggior rispetto al wild type, per quanto questa accentuazione fenotipica differenziale si pareggiasse con la crescita. Tuttavia specifici tipi di pelo come Zig zag ed Awl restavano deficitari. Questo loro mancato sviluppo appare in contrasto con la provata espressione di EDA nei follicoli piliferi dell'adulto. Si è ipotizzato che un trattamento combinato di Fc:EDA-A1 e FC:EDA-A2 potesse ottenere migliori risultati implicando una tardiva e sinergica partecipazione di EDA-A2 nella determinazione dello sviluppo di forma del pelo. I risultati sono stati solo parzialmente a favore di questa ipotesi, con una modesta ricomparsa di peli Zig zag-like e Awl-like, più sottili, corti e contorti. Il mancato ripristino del wild type potrebbe risultare da una difficoltà nel riprodurre con somministrazioni esogene il normale gradiente di questi due recettori, o da una parziale perdita di attività biologica delle proteine ricombinate (Gaide O., 2003). Con la somministrazione di FC:EDA-A1 le ghiandole del Meibomio erano normofunzionanti ed in grado di secernere un fisiologico film lipidico, con scomparsa della sintomatologia oculare. Nelle zampe erano presenti papille dermiche e ghiandole sudoripare funzionali al test del sudore. Non venivano infine riportate modificazioni alla morfologia mandibolare e dentale, con molari normodimensionali e cuspidi pienamente sviluppate. Il terzo molare risultava tuttavia mancante nel 50% dei soggetti. Al contrario, in modelli sperimentali con overespressione transgenica di EDA si è ottenuta la correzione dell'ipodonzia ma non dei difetti di forma (Srivastava A.K., 2001).

Il trattamento con la sola Fc:EDA-A2 non ha promosso significativi cambiamenti fenotipici, confermando ancora una volta come questa isoforma non sia centrale nell'embriogenesi degli annessi ectodermici.

Successive sessioni sperimentali si sono prefisse lo scopo di indagare il periodo limite post nascita per l'ottenimento del miglioramento del fenotipo Tabby. È stata testata la somministrazione di diverse dosi con iniezioni ai giorni di vita due, tre, cinque e nove. Nei protocolli di iniezione postnatale si è constatata comparsa dei peli della coda a tredici giorni dalla nascita (circa corrispondente al tempo necessario per sviluppare i peli nel topo wild type). I peli Guard e Zig zag non erano presenti e permaneva l'alopecia retroauricolare. A fronte di una normalizzazione nell'apertura della palpebra e nella funzionalità delle ghiandole del Meibomio, permaneva l'agenesia del terzo molare. Il ripristino delle ghiandole salivari avveniva con iniezioni somministrate solo entro nove giorni post nascita. Somministrazione intrauterina ai giorni embrionali quindici e

diciassette permetteva la scomparsa dell'alopecia dietro all'orecchio a dosi di 1,5 mg/kg, sensibilmente inferiori a quelle necessarie per un risultato nei protocolli post nascita. Studi analoghi sono stati ripetuti sul cane. Anche il cane affetto da Displasia Ectodermica Ipoidrotica presenta alopecia simmetrica, decremento nel numero di elementi dentali ed alterazioni di forma, infezioni polmonari ed oculari con croste nasali. Bronchiti e polmoniti portano talvolta ad una morte precoce prima dello svezzamento; queste affezioni del sistema respiratorio non si osservano nel topo Tabby e rendono il cane un modello comparativo umano più efficace da questo punto di vista. L'aumento di peso in questi cuccioli è deficitario rispetto al controllo sano, anche le ghiandole sudoripare sono assenti. I cani XLHED presentano in genere un minor numero di premolari ed incisivi, nonché anomalie di forma. Nel cane le prime gemme dentarie si sviluppano al 42° giorno. La dentatura primaria inizia l'eruzione a quattro settimane ed è completa tra le otto e le dodici settimane. A sedici settimane inizia l'eruzione dei permanenti e da 36 settimane tutti i permanenti sono in arcata. L'eccezione è rappresentata dal primo premolare, che non è preceduto da un dente deciduo.

Dal momento che il trasferimento intrauterino di Immunoglobuline è pressoché assente nel cane, in questo animale sono state indagate le potenzialità della sola terapia post-nascita [Mauldin et al., 2009]. Diversi sono stati i dosaggi e le tempistiche di somministrazione testati: due cuccioli hanno ricevuto una singola iniezione di 2 mg di Fc:Eda-A1 endovena due giorni dopo la nascita; quattro cuccioli hanno ricevuto dosi decrescenti a due, cinque, otto ed undici giorni dopo la nascita (da 3,5 a 1,8 mg/kg). Infine quattro cani hanno ricevuto dosi decrescenti a due, cinque, otto, undici e quattordici giorni dalla nascita (da 7 a 2 mg/kg). La somministrazione del trattamento con proteina ricombinante ha portato ad un aumento di peso comparabile ai controlli sani. La sintomatologia respiratoria dei cani era quasi sempre migliorata con assenza di tosse e starnuti persistenti e scomparsa delle ricorrenti infezioni tracheobronchiali e delle croste nasali. Immagini statiche sequenziali acquisite dopo inoculazione endotracheale di marcatore radioattivo hanno evidenziato una clearance mucociliare comparabile od eccedente il wild type. Anche la produzione lacrimale e quella sudoripara erano recuperate e talvolta eccedenti gli animali sani. L'esame clinico e radiografico ha confermato lo sviluppo di una dentatura permanente completa ed avente come uniche anomalie canini dal diametro vestibolo-linguale leggermente

ridotto e premolari con cuspidi poco sviluppate. È evidente come quest'ultimo dente, non preceduto da un deciduo ed avendo una embriogenesi più precoce, non benefici significativamente degli effetti della terapia. In generale le somministrazioni più precoci o quelle più prolungate hanno determinato risultati migliori. Uno dei cani che hanno ricevuto somministrazioni nei giorni due, cinque, otto ed undici si dimostrò completamente non rispondente al trattamento. In conclusione, questi studi sperimentali sugli animali prospettano un ottimistico e piuttosto esclusivo scenario terapeutico futuro. È evidente come sia necessario ampliare la numerosità campionaria e comprendere le corrette dosi per poter adattare e trasferire il protocollo all'uomo. Il cane dimostratosi insensibile al trattamento non ha sviluppato reazione immunitaria verso la proteina ricombinante; si è probabilmente trattato di una problematica di suscettibilità individuale alle dosi minime che impone ulteriori indagini (Mauldin E.A., 2009). La minor rispondenza dei cani per quanto riguarda il fenotipo del pelo (mancata correzione della calvizie simmetrica) è probabilmente legata alle differenze di sviluppo rispetto al topo. Quest'ultimo nasce privo di pelo e dunque anche il trattamento postnatale può risultare parzialmente correttivo, mentre il cane nasce con un manto formato e la somministrazione post nascita è tardiva. È possibile che un trattamento post natale abbia alcuni risultati nell'uomo in questo senso, poiché vi sono due ondate di crescita dei capelli che si completano dopo otto/dodici settimane. In generale il trattamento si è dimostrato tanto più efficace quanto più precoce; d'altro canto l'esperienza sui cani ha dimostrato come anche un parziale ripristino fenotipico porti ad un notevole incremento della qualità di vita, con abolizione totale o subtotale di patologia oculare o respiratoria. L'applicazione all'uomo resta tuttavia una realtà in fieri, specie in considerazione delle implicazioni bioetiche di una somministrazione a gestanti od embrioni. La mancanza di effetti collaterali è incoraggiante ma la comprensione degli esatti dosaggi resta tuttora un appannaggio.

### **Terapia rigenerativa con cellule staminali**

Quanto illustrato in precedenza trova applicazione nel ristretto caso della XLHED. Nell'ampio spettro delle differenti sindromi che costituiscono le EDs molti meccanismi genetici e molecolari non sono ancora stati chiaramente identificati o non trovano comunque una possibilità di correzione in procedimenti relativamente semplici come la

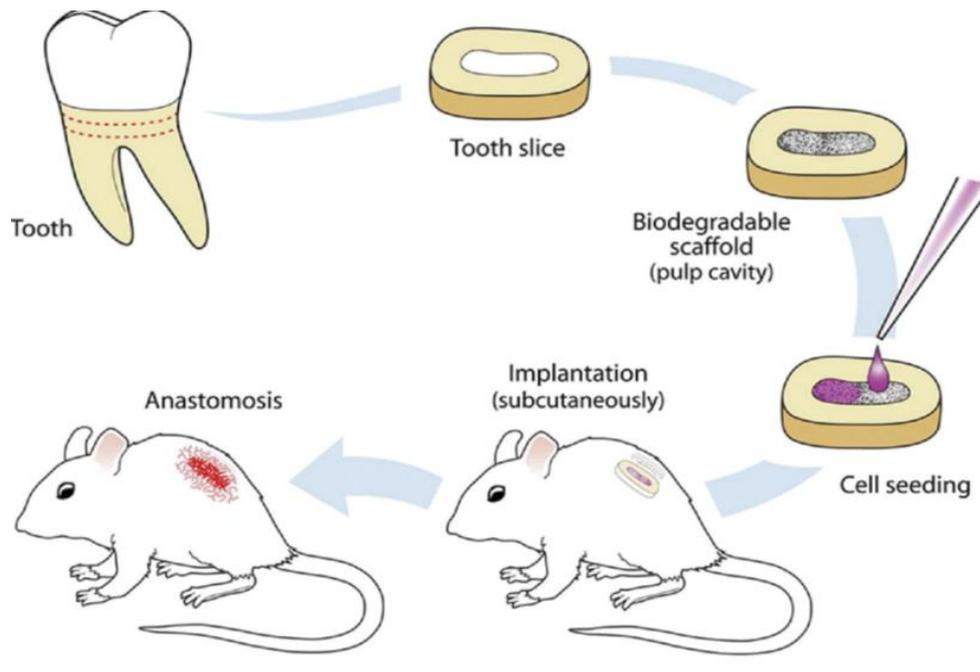
somministrazione di una proteina di segnale ricombinante. Nonostante la terapia causale richieda una ricerca mirata e specifica per le singole malattie o gruppi di malattie, la terapia sintomatica potrebbe in futuro giovare dell'importante contributo di una medicina rigenerativa basata sulle cellule staminali. La possibilità di un ripristino delle strutture ectodermiche alterate, come ghiandole e denti, porterebbe ad un significativo aumento della qualità di vita e scongiurerebbe la potenziale mortalità legata a condizioni come l'ipertermia maligna.

Le cellule staminali si caratterizzano per le proprietà di autorinnovamento ed alta capacità replicativa. Esse costituiscono la base dello sviluppo embriogenetico di organi e tessuti e permangono nell'organismo adulto come riserva funzionale, ad esempio per la riparazione tissutale da ingiuria. Le cellule staminali embrionali sono facilmente identificabili nella massa più interna della blastocisti nei primi stadi di sviluppo embrionale; si tratta di cellule totipotenti ossia in grado di differenziarsi verso qualsiasi linea cellulare in base allo stimolo biochimico a cui vengono sottoposte (Casagrande L., 2011). L'utilizzo di queste cellule comporta notevoli implicazioni a livello etico e legale, mentre l'uso di cellule staminali prelevate da individuo adulto bypassa suddette implicazioni e sembra potere ugualmente garantire risultati incoraggianti, nonostante tutte le loro potenzialità non siano ancora state messe in luce. Queste cellule staminali sono multipotenti, non potendo differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula secondo una selettività di differenziamento correlata alla loro origine embriogenetica. Il grande vantaggio di queste staminali è la possibilità di ottenerle in qualsiasi stadio di vita e di poterle prelevare da numerosi tessuti (midollo osseo, adipe, cute, muscoli, numerosi tessuti dentali e parodontali, ecc...). Questa risorsa accessibile viene prelevata dallo stesso paziente evitando le problematiche immunitarie (Graft versus hostess disease). La stimolazione di queste cellule al differenziamento ed alla replicazione dipende strettamente dalla conoscenza dei meccanismi biochimici ed embriogenetici sottendenti. Si è poi rivelato utile nella sperimentazione introdurre queste cellule in associazione a scaffolds, spesso biodegradabili, che dovrebbero idealmente costituire un supporto tridimensionale alla iniziale replicazione, riassorbirsi con un ritmo sincrono alla formazione di nuovo tessuto e fornire una riserva dei growth factors necessari a questi processi. La medicina rigenerativa risulta quindi un campo multidisciplinare che coinvolge le scienze biologiche, la bioingegneria e le scienze cliniche. Una delle prime

risorse cellulari esplorate dalla sperimentazione clinica è stata il midollo osseo. Le cellule derivate dal midollo osseo (Bone Marrow Derived Cells, BMDs) sono un'eterogenea popolazione consistente in progenitori di fibroblasti, osteoblasti ed adipociti (Peng L., 2009). Vi è poi una percentuale di cellule staminali mesenchimali (Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells, BM-MSCs) compresa tra 0,001 e 0,01 % (Tomar G.B., 2010). Le cellule staminali di origine mesenchimale hanno chiaramente origine dal mesenchima derivato dalla cresta neurale ed hanno proprietà simili alle cellule mesenchimali generiche, con un fenotipo fibroblast-like. È riportata la loro capacità in vitro ed in vivo di differenziare in diversi lineaggi cellulari mesenchimali (odontoblasti, condrociti, adipociti, ecc....) (Volponi A.A., 2010). Le diverse staminali di origine mesenchimali differiscono tuttavia parzialmente nel grado di crescita in coltura, nell'espressione di alcuni markers genetici e nel differenziamento cellulare. Resta da chiarire fino a che punto tali differenze dipendano dall'origine, da fattori come il sito di origine o le condizioni di coltura. Un' interessante applicazione di queste BM-MSCs è stata messa in luce da un esperimento volto al ripristino delle ghiandole sudoripare in topi cui furono indotte ustioni di terzo grado (Cai S., 2011). Per indurre la formazione delle ghiandole sono stati estratti frammenti del gene EDA da feti umani spontaneamente abortiti tra l'ottava e la 36° settimana di gravidanza. Da questi frammenti si è ottenuto un plasmide contenente il gene. Questo plasmide è stato trasferito nelle BM-MSCs ottenute da donatori volontari. Le EDA transfected BM-MSCs sono state trapiantate nei siti ustionati di topi privi di pelo ed immunodeficienti con iniezioni sottocute di  $1 \times 10^6$  alla sei cellule staminali. Gruppi controllo erano trattati con la diretta somministrazione del plasmide contenente EDA con iniezioni di 2  $\mu$ gr o senza somministrazione di alcun presidio terapeutico. Analisi del sudore sono state performato periodicamente per trenta giorni. Il test ha dato i primi segni di positività a partire dal decimo giorno per topi trattati con EDA/BM-MSCs e dal quattordicesimo nel gruppo con iniezione di pc-DNA EDA. Analisi di coltura in vitro hanno dimostrato come l'overespressione di EDA non interferisca nella crescita e replicazione di BM-MSCs. Biopsie effettuate al trentesimo giorno hanno dimostrato come il gruppo privo di trattamento manifestasse uno scarso od assente ripristino delle ghiandole sudoripare. Il gruppo con pc-DNA presentava un ripristino più rapido ma pressoché comparabile al solo trattamento con BM-MSCs. In quest' ultimo caso indagini immunoistochimiche hanno rivelato come le cellule staminali midollari non

abbiano partecipato alla formazione della ghiandola. L'overespressione di EDA nelle cellule staminali ha dato i migliori risultati, con un recupero di sudorazione più precoce e maggiore in topi aventi già dalle cinque alle sei settimane di vita. Dalla biopsia si è constatata una struttura ghiandolare lievemente differente rispetto al wild type; ciò potrebbe essere dovuto a differenze nella struttura collagenica connettivale tra il feto e l'adulto od all'eventuale concorrenza di altri geni oltre a EDA nell'organogenesi ghiandolare (Cai S., 2011). Nonostante in questo disegno di studio non sia stata contemplata un'osservazione a lungo termine della stabilità funzionale ghiandolare, è evidente come un approfondimento di questa metodica rigenerativa possa giovare anche ai pazienti con EDs ipo od anidrotiche. Anche le anomalie dentarie delle EDs possono trovare una possibile futura risoluzione nella ricerca con le cellule staminali. Molti studi hanno valutato il potenziale delle BM-MSCs nella rigenerazione dei tessuti dentali e parodontali. Alcuni hanno provato la loro capacità di formare in vivo, a seguito di autotrapianto in siti con difetti parodontali, legamento parodontale, osso alveolare e cemento (Kawaguchi H., 2004). Ricombinando BM-MSCs con cellule di epitelio orale derivate da embrioni di ratto queste staminali hanno dimostrato la capacità di esprimere geni odontogenici come Pax9, DMP1 e DSPP ed hanno dato origine alla formazione di strutture simili al dente (Li Z.Y., 2007). Risultati analoghi, con formazione di osso e tessuti dentali furono ottenuti trapiantando semplicemente una popolazione eterogenea di BMDCs trasferite in una capsula renale (Ohazama A., 2004). Di grande interesse è la dimostrata capacità delle BM-MSCs di differenziare in ameloblasti, rappresentando di fatto una potenziale fonte sia di tessuto mesenchimale che epiteliale per l'ingegneria tissutale dentale [Hu et al., 2006]. Studi comparativi di colture in vitro tra cellule BM-MSCs e cellule staminali mesenchimali ottenute da prelievi bilaminari gengivali hanno dimostrato una più rapida proliferazione di queste ultime, un fenotipo più stabile e la capacità di mantenersi differenziate dopo lunghi cicli replicativi (Tomar G.B., 2010). Anche analisi del cariotipo non hanno rivelato anomalie; l'attività telomerasica era mantenuta in modo continuativo. Al contrario le BM-MSCs dimostrarono senescenza replicativa tra i sette ed i dodici cicli in vitro, con ingrossamento cellulare, morfologia anomala e perdita di markers. Cellule staminali gengivali possono rappresentare un risorsa vantaggiosa alla luce di queste osservazioni e di un loro più agevole prelievo. La rigenerazione dei tessuti dentali si è pertanto concentrata sull'utilizzo di queste stesse

cellule provenienti dalla gengiva o dal legamento parodontale, nonché di cellule staminali dentali isolate nel dente adulto o a diversi stadi dell'odontogenesi. Il dente è un organo di origine ectodermica derivante da interazioni tra l'epitelio orale e le cellule mesenchimali originanti dalla cresta neurale. La componente epiteliale dà origine agli ameloblasti secernenti lo smalto; dalle cellule multipotenti del mesenchima prendono origine il legamento parodontale, gli odontoblasti ed i cementoblasti. Da ciò si comprende come il dente ed il parodonto possano mantenere una ricca riserva di staminali mesenchimali. Le prime cellule staminali mesenchimali identificate nel dente furono quelle della polpa dentale (Adult Dental Pulp Stem Cells, ADPSCs) (Gronthos S., 2000). Esse sono responsabili della limitata capacità riparativa delle cellule pulpari in risposta a danno con produzione di dentina terziaria. Le ADPSCs, inizialmente isolate da terzi molari permanenti, sono in grado di mantenersi indifferenziate dopo lunghi cicli di coltura e di differenziare in cellule simili agli odontoblasti ed al connettivo pulpare, nonché in cellule simili alla cresta neurale od agli osteoblasti. Studi in vivo hanno dimostrato la capacità di formare pre-osteoblasti e produrre woven bone nel sottocute di topi immunocompromessi, utilizzando scaffolds di Idrossiapatite anche dopo due anni di criopreservazione (Pappaccio G., 2006). Una tecnica spesso utilizzata nella sperimentazione animale consiste nell'associare queste cellule a scaffolds in Acido Poli-lattico (PLLA), Poliglicolico (PGA) o di un copolimero tra i due (PLGA) che permette una modulazione del grado di biodegradabilità in base alla proporzione tra PLLA/PGA. Le cellule vengono coltivate in questi scaffolds interposti a sezioni (slices) di tessuto dentinale prelevato da terzi molari (Fig 22). Il trapianto di questo complesso nel sottocute del topo immunocompromesso porta alla formazione di un complesso funzionale pulpo-dentinale (Casagrande L., 2011). Altri studi hanno testato la coltura delle ADPSCs in differenti scaffolds (collagene, ceramica porosa, mesh in fibre di titanio), senza l'uso di slices dentali. Il trapianto nei topi ottenne la formazione di un tessuto connettivo dissimile da quello pulpare (Zhang J., 2011). Questo rimarca l'importanza della matrice dentinale come fonte di fattori per la crescita e morfogenesi dentinale.



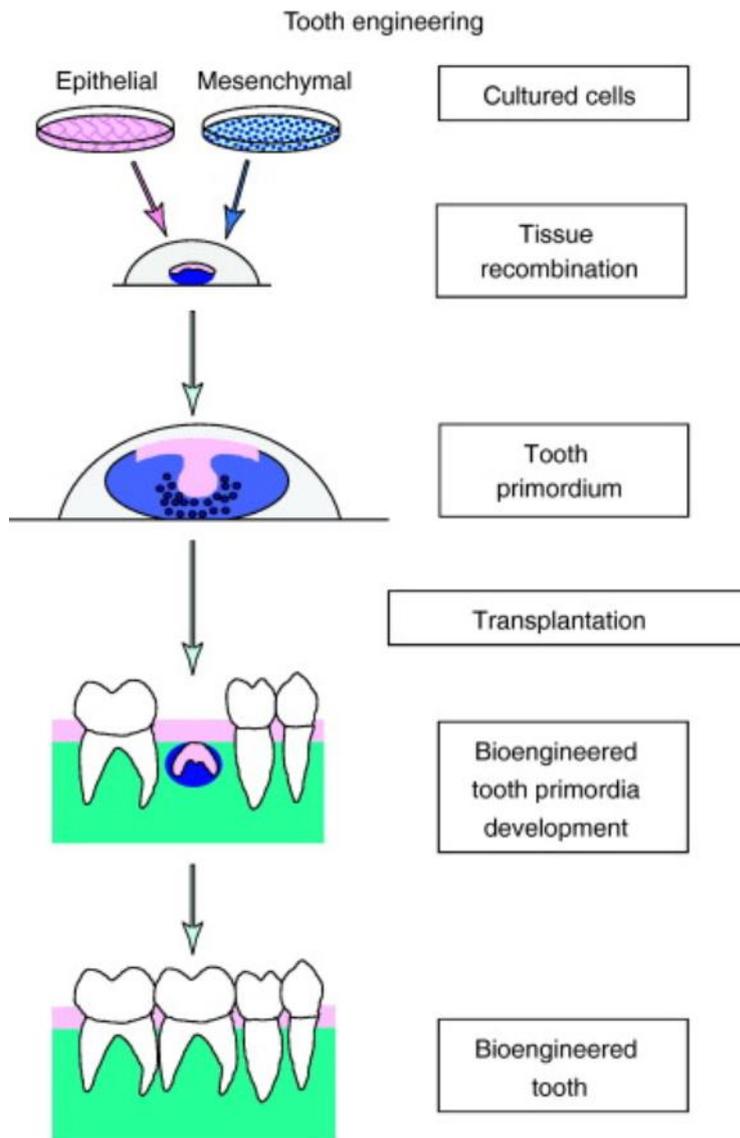
**Fig. 22:** disegno schematico del trapianto sottocutaneo di cellule mesenchimali veicolate in scaffolds costituiti da sezioni di tessuto dentale

L'odontogenesi riparativa si avvale di molte delle molecole segnale coinvolte nella dentinogenesi primitiva. Durante quest'ultima, infatti, la formazione e mineralizzazione della matrice dentinale incorpora e ritiene come molecole fossilizzate  $TGF\beta$ , BMPs, PDGF, FGF e VEGF. L'organizzazione tubulare della dentina favorisce il loro rilascio in forma bioattiva quando questa sia danneggiata dalla carie o da agenti acidi. Come dimostrato da evidenza sperimentale su animali molecole come  $TGF\beta$ , BMPs 2, 4 e 7, Dentin Matrix Protein (DMP1) possono favorire il differenziamento delle ADPSCs in cellule secernenti dentina e la formazione di cristalli di Apatite (Casagrande L., 2011). Queste cellule staminali sono inoltre in grado di differenziarsi in cellule endoteliali funzionali originando vasi con una circolazione funzionale quando coltivate in un gel di collagene tridimensionale in presenza di fattori di crescita come VEGF. Questa osservazione ha aperto nuove possibilità di cura sperimentale di tessuti affetti da necrosi ischemica. Altri studi in vitro hanno dimostrato la possibilità di differenziamento in neuroni funzionalmente attivi ampliando la possibilità di utilizzo di queste cellule, apprezzabili per la facilità ed accessibilità di prelievo [Volponi et al., 2010]. Pochi anni dopo vennero scoperte cellule staminali mesenchimali in denti decidui esfoliati (SHEDs) (Miura M., 2003). L'ovvio vantaggio di queste cellule risiede nella loro possibilità di

prelievo privo di costi biologici per il paziente. Esse possono differenziare in cellule simili ad osteoblasti, odontoblasti, adipociti e neuroni. Rispetto alle ADPSCs manifestano una maggior capacità replicativa in vitro, una capacità osteoinduttiva in vivo ed una tendenza a formare aggregati (clusters) sferici. L'impianto di questi clusters cellulari nel muscolo striato di topi affetti dal morbo di Parkinsons ne ha parzialmente migliorato la risposta all'apomorfina (Volponi A.A., 2010). Il trapianto sottocute del topo ne ha dimostrato un'alta capacità di differenziamento in cellule endoteliali con possibilità di formare vasi che si anastomizzano con i capillari dell'ospite (Cordeiro M.M., 2008). Cellule staminali originanti dal legamento parodontale (Periodontal Legament Stem Cells, PDLSCs) giocano un ruolo endogeno nel mantenimento della popolazione cellulare del legamento stesso, essendo questo costantemente sottoposto a rimodellamento in adattamento agli stress masticatori. Questa loro continua attività spiega i migliori risultati ottenuti con questa popolazione cellulare nei tentativi di formare strutture simili al legamento parodontale [Volponi et al., 2010]. Le PDLSCs sono in grado di differenziarsi in adipociti, connettivo secernente collagene di tipo I e cellule simili a cementoblasti. Cellule del legamento isolate da terzi molari umani e coltivate in dischetti di Poli-isopropil-acrilamide (PIPA Am) hanno consentito il distacco di fogli di cellule vitali con trattamento a basse temperature. Trapiantando questi fogli in ratti immunocompromessi con precedente rimozione del cemento radicolare dai primi molari si è ottenuto un ancoraggio di fibre simili al legamento ed un ripristino di uno strato di cemento acellulare [Volponi et al., 2010]. Studi in vitro ed in vivo hanno anche messo in luce le potenzialità osteogeniche di queste cellule in grado di differenziare verso odontoblasti, con una aumentata produzione di ioni Calcio ed Ossido Nitrico. Una popolazione di cellule staminali dentali molto interessante è rappresentata dalle cellule della papilla dell'apice radicolare (Root Apical Papilla Stem Cells, SCAPs). Esse si localizzano all'apice di radici in crescita esclusivamente durante il processo di genesi radicolare, avendo pertanto caratteristiche più simili a cellule embrionali partecipanti agli eventi morfogenetici. È stata dimostrata la loro capacità di differenziare in adipociti ed odontoblasti. L'espressione di CD24+ è notevole nelle cellule indifferenziate, mentre è downregulated nel differenziamento in vitro, potendo rappresentare un marker della proprietà di multipotenza. La loro proliferazione in vitro è maggiore rispetto ad ADPSCs. Il trapianto di scaffolds contenenti SCAPs e PDLSCs nelle cavità alveolari di mini pigs ha

portato alla formazione di dentina e legamento parodontale (Volponi A.A., 2010). Questo interessante esperimento potrebbe rappresentare la base per lo sviluppo di radici utilizzabili come impianto biologico protesizzabile, prospettiva questa particolarmente utile nei casi di oligo ed ipodonzia legati alle EDs. SCAPs e ADPSCs prelevate da terzi molari umani, coltivate in scaffolds PLLA/PGA inseriti in spazi canalari radicolari sono state trapiantate nel sottocute di topi immunocompromessi. A distanza di quattro mesi si è potuto osservare il completo riempimento canalare con tessuto simile alla polpa e ben vascolarizzato, nonché la deposizione di tessuto mineralizzato simile alla dentina sulle pareti canalari preesistenti (Volponi A.A., 2010). L'applicazione clinica di questa sperimentazione per rigenerare la polpa affetta da necrosi resta tuttavia soggetta alla limitazione anatomica per cui tutti i vasi devono penetrare e rapidamente progredire dal solo forame apicale. Ciò deve avvenire abbastanza rapidamente per scongiurare il deperimento delle cellule staminali. La ricerca si sta dunque concentrando nell'associazione di VEGF a scaffolds compatibili, per accelerare l'angiogenesi (Casagrande L., 2011) Il follicolo è un sacco di tessuto connettivo di derivazione ectomesenchimale che circonda l'organo dello smalto e la papilla dentale del germe prima dell'eruzione. Si ritiene contenga progenitori dei cementoblasti, degli odontoblasti e delle cellule del legamento parodontale. Al pari delle SCAPs le cellule staminali del follicolo dentale (Stem Cells from Dental Follicle, DFSCs) partecipano all'organogenesi dentale ed hanno caratteristiche più simili a cellule staminali embrionali. Anch'esse possono differenziare verso cellule simili ad osteoblasti, cementoblasti, adipociti e neuroni. Il trapianto in topi immunocompromessi ha prodotto la formazione di un tessuto simile al legamento parodontale in quattro settimane, con fibroblasti secernenti fibre collagene. La più rilevante e difficile sfida terapeutica consiste tuttavia nella rigenerazione dell'intero elemento dentario, della quale beneficerebbe in maniera particolare il paziente affetto da EDs. Fisiologicamente l'odontogenesi è come detto il risultato di reciproche interazioni di tipo induzione/risposta tra epitelio e mesenchima. Anzitutto avviene l'induzione da parte dell'epitelio dentale verso le cellule mesenchimali, stimulate allo sviluppo e differenziamento. Esse sono rispondenti al segnale epiteliale fintanto che mantengono caratteristiche di cellule staminali con proprietà in comune alla cresta neurale da cui derivano. In seguito è il mesenchima a reciprocare un segnale induttivo avente come target il tessuto epiteliale (Volponi A.A.,

2010). L'induzione sperimentale dell'odontogenesi può dunque percorrere due possibili strade, identificando le cellule epiteliali o quelle mesenchimali in grado di indurre il processo. Attualmente non si conoscono altre riserve di cellule epiteliali capaci di stimolare l'odontogenesi ad eccezione dell'epitelio dentale dei primi stadi embrionali. Cellule epiteliali in grado di rispondere ad un segnale induttivo mesenchimale sono invece le cellule dei residui di Malassez. Il loro isolamento e coltura da soggetti adulti ha permesso di dimostrare la loro capacità di produrre tessuto simile allo smalto quando ricombinate con cellule dentali pulpari non coltivate. L'utilizzo di cellule dell'epitelio dentale embrioniche in associazione con mesenchima dentale embrionico ha reso possibile la formazione di strutture dentali piuttosto che di denti completi e funzionali dopo una loro ricombinazione in vitro ed il trapianto nel topo [Volponi et al., 2010]. D'altra parte analoghi esperimenti sono stati condotti utilizzando come fonte di induzione cellule mesenchimali del primordiale dente embrionale. Mentre è chiara la loro possibilità di mantenere in vitro le capacità di risposta all'induzione epiteliale dopo numerosi cicli di coltura, non è ancora stata definita la loro capacità di mantenere in vitro un proprio potenziale di induzione odontogenetica. ADPSCs potrebbero rappresentare una possibile e più agevole fonte sostitutiva di cellule staminali mesenchimali. Anch'esse infatti derivano dalla cresta neurale e mantengono numerosi markers genetici in comune con cellule staminali embrionali derivanti da essa. La ricerca potrebbe indirizzarsi nell'analisi identificativa di quei fattori genetici espressi dalle cellule embrionali responsabili della loro capacità di induzione per verificare se essi siano comuni alle ADPSCs. Infatti ad oggi non è ancora stata dimostrata una capacità induttiva o responsiva di queste ultime per l'odontogenesi (Volponi A.A., 2010). Ad oggi è stata constatata la possibilità da parte di differenti cellule ottenute da differenti tessuti dentali embrionali ed inserite in scaffolds di dare nuovamente luogo ad odontogenesi. Simili esperimenti sul topo hanno dato luogo alla formazione di piccoli denti non risemblanti la struttura tridimensionale dello scaffold utilizzato (Fig. 23) (Volponi A.A., 2010).



*TRENDS in Cell Biology*

**Fig. 23:** rappresentazione della rigenerazione dentale mediante ricombinazione di epitelio e mesenchima e trapianto nel cavo orale. Nella seconda immagine si nota come i denti ottenuti con questo sistema abbiano dimensioni molto ridotte rispetto al dente naturale



La rigenerazione dell'intero dente appare un obiettivo ancora lontano nonostante incoraggianti risultati iniziali. Il problema più imminente risiede nell'identificazione di popolazioni epiteliali e mesenchimali in grado di mantenere le proprie capacità di induzione o risposta ed essere coltivate nelle ampie popolazioni necessarie per formare un dente. Resta poi una certa discrepanza tra il modello sperimentale animale e l'uomo, dato che l'odontogenesi umana è approssimativamente otto volte più lenta. Mentre la crescita, l'impianto e l'eruzione di un dente nel topo richiede alcune settimane, l'equivalente per ottenere un dente umano funzionale potrebbe essere stimato nell'arco di mesi od anni, aumentando ipoteticamente i possibili fallimenti procedurali ed i costi.

## **TERAPIA MULTIDISCIPLINARE**

Le manifestazioni patologiche legate alle EDs sono molteplici e spesso notevolmente variabili: alcune di esse, come l'ipotiroidismo o l'immunodeficienza, possono avere conseguenze gravi se non trattate tempestivamente da specialisti. In questa sezione ci limiteremo a trattare la terapia delle manifestazioni di più comune riscontro tra le diverse sindromi. Ricordiamo inoltre come l'ipertermia resti una tra le manifestazioni più gravi nelle forme ipoidrotiche, con un potenziale rischio di morte o danni cerebrali permanenti. Episodi di ipertermia possono insorgere durante malattie, eccessiva attività fisica, temperatura ambientale elevata o semplicemente quando vengono indossati abiti troppo pesanti (Hichey A.J., 2001). Col tempo il paziente ed i genitori imparano a mantenere un corretto controllo ambientale della temperatura. L'utilizzo di aria condizionata, l'adeguata assunzione di liquidi ed il ricorso ad un vestiario leggero o all'uso di magliette bagnate possono essere utili durante la stagione calda in associazione ad una limitazione dell'attività fisica (Wright J.T., 2009). Singoli episodi di ipertermia possono essere alleviati ricorrendo all'esposizione ad aria ventilata od a bagni e spugnature tiepidi (Hichey A.J., 2001).

### **Terapia dermatologica**

Di frequente riscontro è la presenza di cute secca, fragile e desquamata per cui è molto importante provvedere ad una corretta idratazione. L'uso di lozioni, ricche in acqua e povere di olii, contribuisce all'esacerbazione della xerosi incrementando l'evaporazione cutanea. Ergo, l'utilizzo di creme quali Eucerin o Nutraderm (con basso contenuto

d'acqua) o di unguenti ad esclusiva componente oleosa come la Vaseline o l'Aquaphor è più indicato per mantenere la cute idratata. L'applicazione quotidiana di questi presidi dopo il bagno, quando la pelle è ben idratata, riduce il rischio di episodi eczemicici e riduce inoltre il ricorso ai corticosteroidi topici qualora essi siano già in atto. È bene ricordare che la frequenza di episodi eczemicici è altresì correlata a fattori esacerbanti quali bagni eccessivi, scarsa umidità ambientale, stress emozionale, surriscaldamento della pelle ed esposizione a solventi e detersivi. La terapia dell'eczema si avvale come detto di creme od unguenti a base di Idrocortisone in basse percentuali (dall'1 al 2,5%). L'uso di unguenti corticosteroidi a più alta potenza, come il Fluocinolone allo 0,025% può essere preso in considerazione qualora vi sia una difficoltà nel controllo dell'infiammazione. Queste preparazioni dovrebbero essere utilizzate per periodi limitati di circa dieci giorni, per poi passare ad altre di minor potenza fino alla completa risoluzione del quadro (Weston W.L., 2011). La preparazione in unguento è utile a mantenere un certo grado di idratazione cutanea, data la tendenza dei corticosteroidi topici a provocare atrofia della pelle. Per questa ragione il loro uso dovrebbe essere quanto più possibile limitato sul volto e sul collo. In casi più severi è possibile ricorrere a glucocorticoidi sistemici come il Prednisone. Inibitori topici della calcineurina come il Tacrolimus si sono rivelati efficaci nel trattamento dell'eczema atopico e, non causando atrofia della pelle, possono essere utilizzati nelle pieghe cutanee, sul collo, sul volto, nelle lesioni palpebrali recidivanti. Il Tacrolimus può essere utilizzato nel bambino due volte al giorno in concentrazione dello 0,03%. Effetti collaterali come il prurito ed il bruciore possono essere notevolmente ridotti utilizzando il Pimecrolimus all'1% in sua sostituzione. Non è ancora stabilita la loro sicurezza nel lungo termine; la US Food and Drug Administration (FDA) ha infatti inserito l'avvertenza di un loro potenziale effetto cancerogeno relativamente a tumori cutanei e linfomi. Essi sono pertanto da considerare una terapia di seconda scelta. In lesioni ricorrenti e refrattarie alla terapia si può ricorrere a sedute di fototerapia con raggi UV, anch'essi legati ad una potenziale cancerogenicità nell'uso continuativo (Weston W.L., 2011). Infezioni batteriche (*Staphylococcus aureus*), virali (*Herpes simplex*) o funginee (*Malessezia*) possono verificarsi in associazione opportunistica all'eczema e richiedono terapia specifica, previo esame colturale dalle lesioni. L'ipotricosi si accompagna a capelli sottili e fragili; talvolta

si riscontra la presenza di pili torti. Si consiglia l'uso di shampoo delicati che forniscano un film proteico protettivo (Masse J.F., 1994).

### **Terapia otorinolaringoiatrica**

Come detto in precedenza le manifestazioni otoriniche più comuni sono legate ad una alterazione nella produzione del cerume il quale spesso costituisce dei tappi. Il trattamento sintomatico consiste in irrigazione con Perossido d'Idrogeno ed alla somministrazione topica di gocce lubrificanti a base di glicerina od olio minerale. Nel bambino con diagnosi di Displasia Ectodermica questi trattamenti dovrebbero essere precoci per evitare che i tappi di cerume compromettano l'udito conduttivo portando a possibili problemi del linguaggio nella prima infanzia. Per verificare la funzionalità uditiva di questi pazienti è raccomandabile uno screening audiometrico (Daniel E., 2002). Un ricorrente problema è anche l'ostruzione cronica nasale per la presenza di tenaci incrostazioni di muco precipitato. La rimozione meccanica delle croste è raccomandata ed è particolarmente importante nella prima infanzia quando il bambino è un respiratore nasale obbligato. Nei casi di ostruzione più severi può essere necessario il ricorso alla pulizia nasale sotto anestesia che consente anche irrigazioni saline. L'alta osmolarità della soluzione salina ipertonica attrae l'acqua dall'aria inspirata per ristabilire la componente acquosa dello strato mucoso. Essendo la sintomatologia principalmente deputata alla scarsità di ghiandole mucipare il paziente beneficerà di un più alto tasso di umidificazione dell'aria nell'ambiente quotidiano. L'uso di antibiotici è contemplato qualora necessario per la risoluzione di riniti, sinusiti ed otiti medie. Le gocce di Gentamicina si sono dimostrate un valido presidio nell'alleviare la cacosmia. L'epistassi può essere controllata con l'uso di unguenti, talvolta si è resa necessaria la cauterizzazione (Daniel E., 2002). L'ispessimento del muco e la diminuita clearance ciliare può altresì portare a ricorrenti infezioni tracheobronchiali e polmonari. Le singole manifestazioni acute trovano risoluzione con la terapia antibiotica e talora con la pulizia sotto la guida della broncoscopia (Daniel E., 2002). Di utilità è anche la fisioterapia toracica per la mobilizzazione delle secrezioni mucose; a questo proposito potrebbe essere considerata l'opzione di istruire i genitori ai quotidiani esercizi di fisioterapia toracica comunemente usati per la fibrosi cistica. Nonostante non esistano studi controllati sull'efficacia di queste misure applicate alle EDs è ragionevole che possano

migliorare la funzione respiratoria. Con la crescita i pazienti possono venire istruiti a compiere autonomamente questi esercizi o possono avvalersi di un abbigliamento appositamente studiato per i pazienti con fibrosi cistica in grado di svolgere automaticamente questa fisioterapia. Qualora ricorrenti laringiti, favorite dalla secchezza delle mucose, portassero alla formazione di noduli delle corde vocali è consigliato ricorrere alla terapia logopedistica.

## **Terapia oculistica**

Manifestazioni oculari sono caratteristiche di queste sindromi e sono spesso determinate da un'insufficiente o da assente funzione delle ghiandole Meibomiane. Talvolta sono determinate da un difetto primario di tessuti ectodermici come la cornea o la congiuntiva. Nella sindrome Displasia Ectodermica-anchiloblefaron-palatoschisi può essere presente fusione palpebrale alla nascita, blefarofimosi, entropion, anchiloblefaron, cisti bilaterali alle palpebre e dacriocisti. Il ridotto film lipidico lacrimale conseguenza di una ipo od aplasia delle ghiandole del Meibomio comporta un maggior grado di evaporazione delle lacrime cui consegue una persistente secchezza oculare. Il risultato è la ricorrenza di cheratocongiuntiviti secche, erosioni corneali, vascolarizzazione corneale e perforazioni. Un utile presidio è l'utilizzo quotidiano di lacrime artificiali più volte al giorno. La vitamina A può essere utilizzata al bisogno per alleviare la secchezza e ripristinare il film lipidico. Questo trattamento non ha controindicazioni, tuttavia preparazioni di vitamina A, olii vegetali o corticosteroidi contengono solamente lipidi non polari, incapaci dunque di legare lo stato acqueo lacrimale. Pertanto il loro effetto risulta limitato e richiede frequenti applicazioni. Un unguento di Ofloxacin allo 0,3% si è dimostrato utile sia nell'idratazione (contiene infatti sia lipidi polari che apolari) sia anche nel trattamento delle infezioni della congiuntiva. Il suo uso dovrebbe essere limitato agli episodi acuti per evitare alterazioni della flora microbica o lo sviluppo di resistenze batteriche (Ota Y., 2008). La sua applicazione ideale consiste nella deposizione di un sottile strato lungo il margine palpebrale inferiore con un sottile applicatore per consentirne una distribuzione uniforme su tutta la superficie oculare. Recenti case reports hanno evidenziato la presenza di autoanticorpi anti membrana basale nelle congiuntiviti cicatrizzanti in pazienti affetti da EEC. La congiuntivite cicatrizzante può dare esito a lesioni simili al

pemfigoide benigno delle mucose; biopsie congiuntivali e buccali sono state sottoposte ad immunofluorescenza diretta per la ricerca di autoanticorpi contro BP180. Questa proteina, componente degli emidesmosomi, è implicata nella eziogenesi autoimmune del pemfigoide. Ulteriori analisi sono state i test sierologici per autoanticorpi antimembrana circolanti e l'immunoblotting per la reattività ad una serie di proteine incluse BP180 e la Laminina. Su un totale di sei pazienti sottoposti a questi test quattro hanno dato una risposta positiva [Saw et al., 2008]. Uno di essi ha dimostrato una deposizione lineare di IgA lungo la membrana basale all'immunofluorescenza diretta; in un altro paziente sono risultate deposizioni di IgG ed IgM nella congiuntiva e nella mucosa orale; altri due pazienti erano positivi per il test sierologico per autoanticorpi BP180. Tutti i pazienti hanno ricevuto una terapia topica con gocce di clorexidina allo 0,02%, steroidi ed antibiotici scelti sulla base di colture della flora congiuntivale e palpebrale. Il trattamento si è protratto per otto settimane e qualora non efficace si è ricorso a corticosteroidi per os (Prednisone) od altri agenti immunosoppressivi (Ciclofosfamide) per quattro/sei settimane. La terapia immunosoppressiva ed antibiotica si è rivelata efficace in cinque pazienti su sei sebbene sia stato sempre necessario il ricorso ad una combinazione di due o più farmaci. Nonostante queste osservazioni siano state condotte su un limitato numero di pazienti esse potrebbero fornire nuovi spunti sulla patogenesi delle lesioni oculari nelle EDs. Questa può essere simile a quella del pemfigoide, con una reazione autoimmune ed un carattere progressivo. Uno stato infiammatorio congiuntivale cronico o ricorrente potrebbe avere la funzione di trigger ed innescare una patologia autoimmune simil-pemfigoide (Saw V.P., 2008).

## CAP II – TERAPIA ODONTOIATRICA

*Il giovane paziente affetto da EDs necessita di un intervento multidisciplinare che coinvolge più specialisti in grado di affrontare su diversi fronti la sindrome. Nel trattamento di questi pazienti, infatti, entrano in gioco un "team" medico composto da un genetista, un pediatra, un dermatologo, un otorinolaringoiatra, ed un "team" odontoiatrico composto da un pedodontista, un protesista, un ortodontista, un chirurgo maxillo-facciale, sono inoltre necessari uno psicologo ed un logopedista, i quali interagiscono tra loro affrontando i diversi aspetti della patologia, dalla fase iniziale dell'inquadramento diagnostico, alla terapia in età evolutiva, fino alla riabilitazione definitiva, ciascuno nell'ambito delle specifiche competenze e con l'obiettivo comune di promuovere la salute orale e psicofisica del paziente.*

Bambini e adolescenti affetti da Eds richiedono trattamenti complessi, a causa sia dei notevoli deficit di sviluppo scheletrico e della ridotta salivazione (che comportano un'estrema difficoltà di ritenzione della protesi), sia della giovane età del paziente (che può essere responsabile di scarsa collaborazione). Ulteriori problematiche derivano dalla crescita e sviluppo delle basi scheletriche e dalla possibile eruzione di alcuni elementi dentali. L'EDs può essere pericolosamente complicata dall'assenza o dal ridotto sviluppo delle ghiandole sudoripare, il che impone una particolare attenzione, nel corso del trattamento, al fine di evitare fenomeni di ipertermia che potrebbero essere provocati dall'agitazione del bambino e da eventuali crisi di pianto. È bene, quindi, metter in atto tutta una serie di misure precauzionali quali utilizzo di abiti molto leggeri, ambiente ventilato, impacchi di acqua fredda, "contenzione dolce" da parte di un genitore e sospensione del trattamento in caso di intense reazioni di pianto.

Diversi Autori sostengono che il trattamento di pazienti pediatrici con EDs richieda una buona conoscenza da parte del clinico riguardo la crescita e lo sviluppo, le tecniche di fabbricazione delle protesi e la possibilità di modificare i denti conoidi presenti in arcata. Deve, inoltre, essere in grado di motivare paziente e genitori all'uso delle protesi e alla necessità di un continuo follow-up, per la modificazione o sostituzione delle stesse. Se l'odontoiatra non è a conoscenza di uno o più di tali aspetti, dovrebbe consultarsi con degli specialisti oppure affidare a questi il trattamento (Nowak, 1988). È importante,

inoltre, la conoscenza delle modalità di comportamento e di approccio con il paziente pediatrico, secondo alcuni Autori sarebbe utile la sedazione dei bambini particolarmente problematici in caso di sedute lunghe e complesse. Altri, invece, sono contrari a questa tecnica, poiché sostengono che il confezionamento di una protesi corretta debba implicare la collaborazione da parte del piccolo paziente durante le registrazioni richieste, per cui preferiscono un approccio di tipo “tell-show-do”, benché sia più impegnativo. Per ottenere la collaborazione e la fiducia del paziente, infatti, possono essere necessarie diverse sedute di “*avvicinamento*”, introduttive alla terapia, durante le quali vengono applicate, oltre alla tecnica sopra citata, anche quella della desensibilizzazione e del rinforzo positivo. I genitori possono facilitare oppure impedire il successo di questa fase; solo nei casi in cui sono di ostacolo e peggiorano la compliance del bambino, devono essere allontanati. Quando il trattamento comincia, è molto importante che il bambino ed i genitori comprendano ogni procedura ed i suoi risultati, che abbiano un’idea di come la protesi finita apparirà, di come può giovare al paziente, di come prendersene cura e dei suoi limiti; il paziente deve sempre essere coinvolto ed avere un ruolo attivo nelle decisioni. In ogni caso, dopo la consegna della protesi è necessario programmare richiami periodici ad intervalli regolari per aggiornare i manufatti in base alla crescita scheletrica, effettuare i necessari aggiustamenti, monitorare l’igiene orale, ispezionare le mucose (Sarvan I., 2000) ed eventualmente effettuare applicazioni topiche professionali di gel fluorato. I genitori vengono comunque istruiti a presentarsi dall’odontoiatra ogni volta che il bambino lamenta un qualunque discomfort.

I problemi più frequenti che possono verificarsi sono la perdita di ritenzione della protesi, le modificazioni occlusali, a causa dell’eruzione dentale o dello sviluppo delle basi ossee (Lo Muzio L., 2005). Bambino e genitori devono quindi essere a conoscenza di questi cambiamenti e del fatto che l’iter riabilitativo è, di conseguenza, molto lungo e può comprendere numerose soluzioni protesiche provvisorie prima di arrivare a quella definitiva. È inoltre, molto importante che il bambino venga istruito a portare sempre le protesi durante la giornata, tranne quando va a dormire, e a maneggiarle con cura. Grande attenzione deve essere posta al mantenimento dell’igiene orale del bambino per poter usufruire a lungo dei benefici della protesi; i genitori dovrebbero attentamente monitorare lo spazzolamento dei denti e le abitudini dietetiche, cercando di ridurre il più

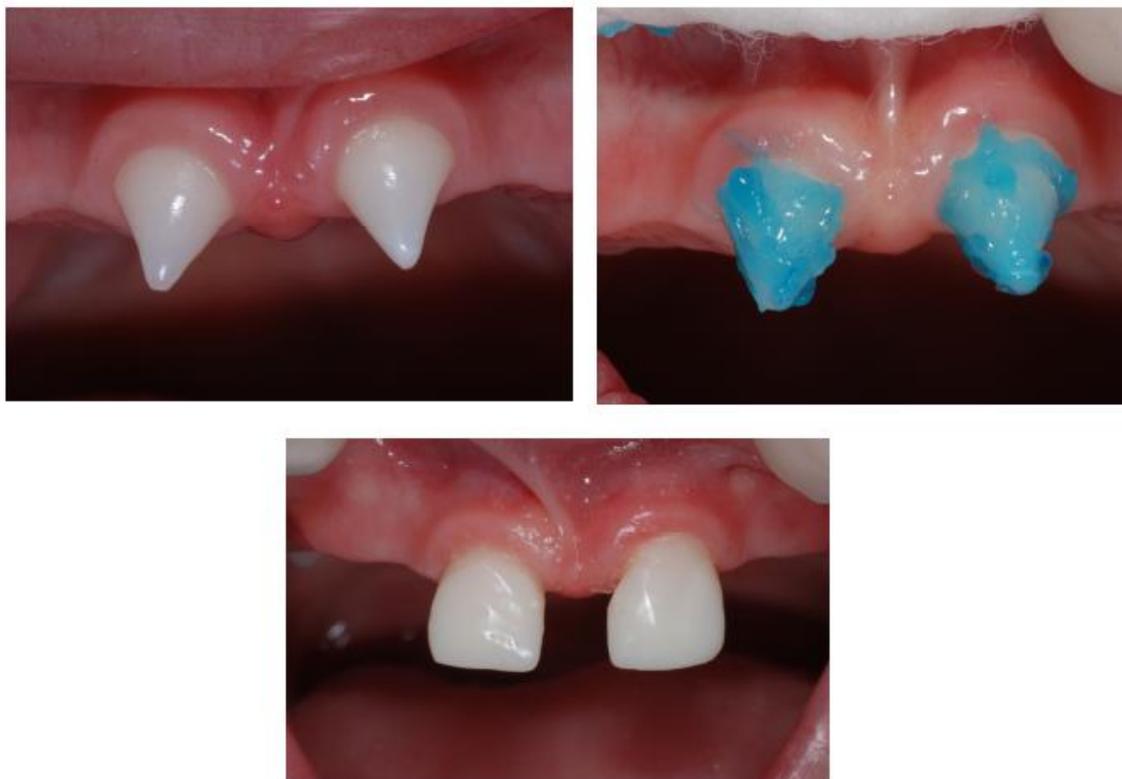
possibile, nel figlio, l'ingestione di dolcetti e snacks tra i pasti. Se necessario, i pazienti dovrebbero quotidianamente assumere compresse fluorate in relazione al peso corporeo e all'età (Pipa-Vallejo, 2008), oppure effettuare applicazioni topiche domiciliari di fluoro per evitare l'insorgenza di lesioni cariose a livello degli elementi presenti, che devono essere conservati il più a lungo possibile, data la loro importanza nella ritenzione della protesi e nel mantenimento dell'osso alveolare. A seconda della severità del quadro (morfologia e dimensione dei denti, quantità di osso disponibile) ed in base all'età (Imirzalioglu, 2002), il trattamento dei pazienti con Displasia Ectodermica si può avvalere di diverse tecniche: protesi parziale fissa (*provvisoria*) o rimovibile, protesi totale a supporto mucoso in caso di edentulismo totale (o a copertura dei denti presenti quando questi sono in fase di eruzione) oppure protesi supportata da impianti (Centiner, 2001). I denti artificiali utilizzati possono essere in resina, composito oppure ceramica. Nuove tecniche, quali quelle adesive e nuovi materiali, come le resine composite, rappresentano oggi scelte molto valide per restaurare gli elementi conoidi allo scopo di ottenere un risultato estetico favorevole (Lo Muzio L., 2005). Questi approcci, che possono essere utilizzati da soli o in combinazione tra loro per ottenere un risultato ottimale, risultano fondamentalmente analoghi a quelli applicati nella terapia degli adulti. A causa della precoce età di inizio della terapia e della necessità di modificare agevolmente le protesi durante il periodo di rapida crescita, diversi Autori consigliano, inizialmente, l'utilizzo di protesi rimovibili, parziali o totali a seconda delle necessità (Gardel, 1985) (Hickey, 2001) (Pigno, 1996), così da consentire al paziente di adattarsi alla nuova dimensione verticale di occlusione e avere un'idea di quello che sarà il risultato della riabilitazione definitiva. La riabilitazione provvisoria permette, inoltre, al clinico di capire se il paziente può tollerare tali cambiamenti, attraverso la valutazione dei possibili sintomi temporo-mandibolari e dolore muscolare. In ogni caso, il trattamento deve sempre essere valutato su base individuale, in considerazione del fatto che le caratteristiche maxillo-facciali variano da un soggetto all'altro e deve mirare ad ottenere una buona stabilità oclusale. Più tardi si potrà procedere con una protesi fissa provvisoria, fino a che la situazione non sia così stabile da rendere possibile il trattamento implantare (Sweeney, 2005) (Alcan, 2006) (Guler, 2005). Il posizionamento di impianti in pazienti in crescita non è raccomandato come pratica di routine, sia a causa della crescita scheletrica cui il bambino va incontro sia per l'insufficienza di osso

alveolare, che predispone ad un maggiore rischio di fallimento, se paragonato a trattamenti protesici più conservativi. Tuttavia, i dati riportati da diversi Autori (Bergendal , 1991) (Smith, 1993) (Cronin, 1994), suggeriscono che sia possibile posizionare con successo impianti in pazienti, maschi o femmine di differenti età, affetti da Displasia Ectodermica con ipo-anodonzia congenita, ma che sia necessaria una attenta valutazione individuale dell'osso disponibile. In genere, i bambini si adattano bene alle protesi e la riabilitazione migliora notevolmente specifici problemi legati all'agenesia dentale: l'aspetto estetico (che diventa più naturale e piacevole, creando un profilo muscolo-cutaneo più armonico) e, con esso, il quadro psicologico; la fonazione (difettosa in questi pazienti, a causa della difficoltà nell'articolazione di alcuni suoni); la masticazione (con conseguente sviluppo di normali abitudini dietetiche) (Tarian., 2005). Questo dato è molto importante, se si considera che la formazione di adeguate abitudini alimentari avvenga proprio durante l'infanzia. Una corretta e precoce riabilitazione orale stabilisce, inoltre, un migliore piano di occlusione, riduce le possibilità di riassorbimento e atrofia delle creste alveolari, migliora la relazione intermascellare sia sul piano sagittale sia verticale durante lo sviluppo craniofacciale (Tarian, 2005), fornisce supporto ai tessuti molli (Yavuz, 2006) ( Gardel, 1985) e migliora la dimensione verticale di occlusione. Dopo il trattamento, inoltre, i pazienti sembrano più motivati a mantenere una buona igiene orale. Un importante dato da sottolineare deriva dai risultati degli studi che alcuni Autori hanno effettuato su bambini affetti, per valutare le caratteristiche scheletriche prima e dopo la riabilitazione protesica; tali studi hanno enfatizzato una normalizzazione della crescita mediante il trattamento stesso. Infatti, la rotazione posteriore di mascella e mandibola, associata con lo spostamento verso il basso della mascella, compensa la retrusione e ipotrofia dell'arcata superiore, lo spostamento in direzione anteriore dell'arcata inferiore e la riduzione di altezza facciale (Ruhin 2001) (Franchi, 1998). Considerando, quindi, i notevoli vantaggi che la riabilitazione protesica comporta e quanto i bambini si adattino bene ad essa e siano soddisfatti dei risultati, il trattamento dovrebbe essere iniziato precocemente, già all'età di 2-3 anni per pazienti collaboranti.

## TERAPIA CON PROTESI FISSA

La protesi fissa raramente viene utilizzata come trattamento esclusivo in caso di Displasia Ectodermica, a causa del fatto che molti individui affetti presentano un numero minimo di denti in arcata. La protesi fissa, inoltre, dovrebbe essere evitata nei soggetti in fase di crescita attiva, poiché i connettori rigidi che la caratterizzano potrebbero interferire con la crescita delle ossa mascellari, “specialmente quando il dispositivo attraversa la linea mediana. Quando si utilizza una protesi fissa, quindi, questa dovrebbe essere separata in due segmenti a livello della linea mediana, per consentire il normale sviluppo scheletrico in senso trasversale. Questa protesi viene utilizzata in quei pazienti che presentano in arcata alcuni elementi dentali, anche di forma conoide che, generalmente, vengono restaurati (Fig.22 - 23). La difficoltà che si riscontra nel momento in cui viene eseguito un restauro mediante corona protesica deriva dal fatto che, frequentemente, la corona clinica risulta sottodimensionata, mentre la camera pulpare appare molto ampia. Le corone protesiche vengono confezionate singolarmente e possono essere utilizzate sui denti conoidi per stabilire un corretto sottosquadro. Attualmente i restauri diretti in materiale composito rappresentano il metodo migliore per conferire una normale morfologia ai denti ipoplasici. Corone e restauri diretti in composito sono spesso utilizzati in combinazione con protesi parziali removibili nel trattamento protesico di pazienti displasici, in modo da poter utilizzare tali elementi restaurati come abutments per protesi parziali o per overdentures, favorendone l’ancoraggio e determinando, quindi, un miglioramento della funzione oltre che dell’estetica (Pigno, 1996) (Lo Muzio, 2005).

**Fig. 24:** Restaturi in composito a livello degli incisivi centrali. In alcuni casi è necessaria una terapia ortodontica per allineare gli elementi prima di procedere con la riabilitazione protesica.



## **TERAPIA CON PROTESI RIMOVIBILE**

La protesi rimovibile è la più frequente tipologia di restauro che viene effettuato nei pazienti affetti da Displasia Ectodermica. Dal momento che anodonzia o ipodonzia sono caratteristiche tipiche di questi soggetti, protesi totali, protesi parziali o overdentures fanno parte del trattamento contemplato. L'obiettivo è quello di migliorare l'estetica, la funzione masticatoria e la fonazione. Sebbene la protesi totale possa fornire risultati estetici e funzionali accettabili, lo scarso sviluppo delle creste alveolari edentule può compromettere la ritenzione e la stabilità della protesi stessa. Quando sono presenti elementi dentali sfruttabili per l'ancoraggio della protesi (quindi in caso di oligodonzia o ipodonzia), l'overdenture rappresenta l'opzione di prima scelta per questi pazienti. Le overdentures convenzionali presentano una serie di vantaggi in rapporto alle protesi totali ed uno di questi è rappresentato dalla capacità di preservare l'osso alveolare e di

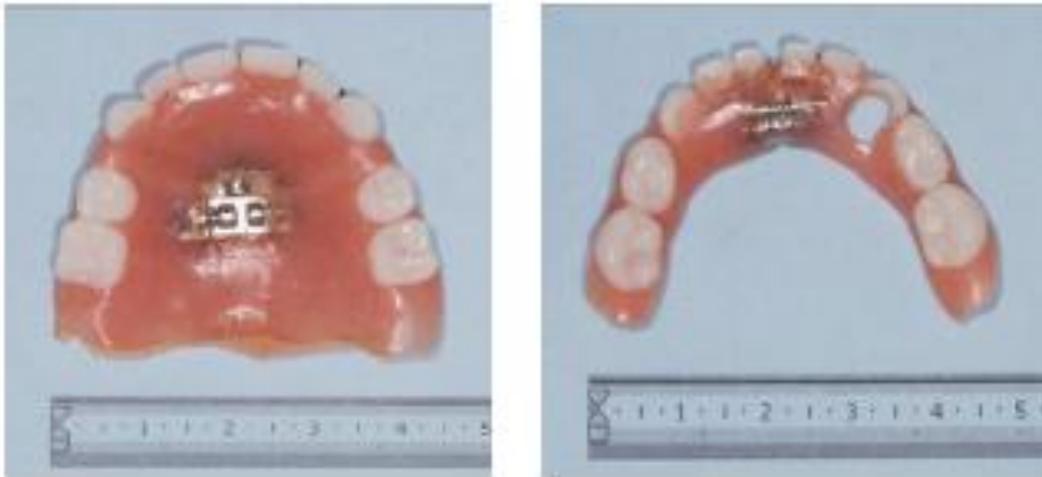
mantenere, quindi, un maggiore spessore ed altezza della cresta ossea (Pigno, 1996) (Alcam, 2006) fondamentale anche in previsione di una futura riabilitazione implantare. Se viene utilizzata una overdenture, la ritenzione può essere aumentata attraverso attacchi ancorati ai denti disponibili. Nei casi in cui, invece, non ci siano denti disponibili ed il supporto protesico risulti inadeguato, sono state considerate tecniche quali la vestibolo plastica ed il rialzo della cresta ossea per favorire la prognosi della riabilitazione protesica. Frequentemente, si utilizza un'occlusione lingualizzata per ridurre le forze laterali e creare un'area di contatti intercuspidali con libertà di movimento (Tarjan, 2005) le cuspidi linguali dei denti mascellari posteriori sono posizionate a contatto con le fosse dei denti mandibolari, per prevenire interferenze laterali. La protesi totale ha il vantaggio di poter essere utilizzata sia quando si è in una situazione di agenesia dentale completa sia in presenza di germi evidenziati radiograficamente; in questi casi, al momento dell'eruzione, la protesi viene adattata preparando un'apertura in corrispondenza del dente neoerotto. Un problema della protesi rimovibile è rappresentato dal fatto che il segmento supportato da mucosa può determinare la formazione di ulcere nella mucosa stessa; essa, tuttavia, non inibisce la crescita ossea, o per lo meno, non così come farebbe una protesi fissa, dal momento che questa viene indossata solo durante il giorno (Prager, 2006). Per facilitare l'adattamento del bambino, diversi studi riportano la necessità di consegnare una protesi alla volta, in particolare dovrebbe essere utilizzata per prima la protesi costruita per l'arcata con prognosi migliore, per poi integrarla con l'antagonista 2-4 mesi più tardi. Un fattore importante, necessario per l'adattamento del bambino alla nuova condizione del cavo orale e per la soddisfazione dei genitori, è la presenza di elementi dentali compatibili con l'età del paziente. Ciò è reso possibile grazie all'utilizzo di denti del commercio fabbricati appositamente per pazienti pediatrici (Fig.23), che abbiano forma e dimensioni analoghi ai denti decidui di bambini di età, sesso e corporatura analoga a quella del paziente e mediante opportune modificazioni eseguite, sia sui denti naturali presenti in arcata, sia su quelli artificiali, così da ottenere un'estetica appropriata all'età.

**Fig. 25:** Denti del commercio (a destra) e denti per riabilitazioni su pazienti pediatrici (a sinistra).



La posizione e l'occlusione dei denti della protesi vengono valutate intraoralmente. Con il passare degli anni, nelle nuove protesi verranno montati progressivamente i denti permanenti al posto dei decidui, simulando così la fisiologica permuta. Fondamentali sono poi i richiami periodici dei giovani pazienti per consentire correzioni o sostituzione delle protesi, in relazione ai continui cambiamenti morfologici del bambino legati a crescita e sviluppo; in tali sedute deve poi essere attentamente monitorata l'occlusione, che va incontro a continue modifiche a causa della crescita delle basi ossee o come conseguenza dell'eruzione di alcuni elementi, che possono creare precontatti. Il continuo rimaneggiamento delle basi ossee, infatti, costringe a ripetute ribasature delle protesi tanto che, per ovviare a questo problema, alcuni Autori suggeriscono di inserire nelle protesi delle viti centrali di espansione, a tre vie per l'arcata superiore, a due vie per l'inferiore (Fig.24), così da consentire un continuo aggiornamento. Non potendo prevedere il momento esatto e l'entità dei picchi di crescita, gli Autori suggeriscono di allargare le viti di un quarto di giro alla settimana; il diastema creato dall'apertura delle viti viene compensato ribasando le protesi con silicone ogni due mesi circa.

**Fig. 26:** Protesi rimovibili con viti centrali di espansione



L'adattamento del paziente alla nuova condizione dentata può determinare, nei giorni immediatamente successivi alla consegna, difficoltà nella masticazione, nell'articolazione di alcuni fonemi e la perdita della protesi stessa, a causa della sua instabilità; per questi motivi può essere consigliata, nelle fasi iniziali, l'adozione di una dieta soffice e l'utilizzo di paste adesive. Un ulteriore inconveniente può essere dato dal fatto che la lingua non ha esperienza dei limiti dettati dalle arcate dentarie e deve pertanto essere abituata alla nuova posizione più retrusa, mediante un apposito accorgimento che consiste nel costruire una rilevatezza a livello della papilla interincisiva che ne modifica la postura (Fig.27).

**Fig. 27:** Rilevatezza costruita a livello della papilla interincisiva per modificare la postura della lingua.



Le tecniche di costruzione delle protesi removibili sono sovrapponibili a quelle utilizzate per gli adulti e gli ancoraggi, quando presenti, sono costituiti da ganci a filo (Fig.27). Questa tecnica rappresenta un metodo piuttosto semplice, rapido e ben accettato per riabilitare un bambino, parzialmente o totalmente edentulo, sia dal punto di vista estetico che funzionale (Papa-Valleyo, 2008).

**Fig. 28:** Protesi parziali removibili con ganci a filo



## TERAPIA ORTODONTICA

L'ortodonzia nei pazienti affetti da Displasia Ectodermica ha lo scopo di allineare i denti per migliorare l'estetica e determinare una distribuzione pre-protetica ideale degli elementi disponibili (Fig.28); mira, inoltre, al ripristino dei corretti rapporti verticali e sagittali, spesso alterati a causa dell'oligodonzia o anodonzia, del prognatismo mandibolare e retrognatismo mascellare (frequentemente riscontrati in questi pazienti), che portano l'occlusione verso una terza classe di Angle. L'uso di apparecchi ortodontici funzionali è quindi molto importante per influenzare positivamente lo sviluppo craniofacciale e ridurre le anomalie prima del termine della crescita (Crump, 1971). Si possono, inoltre, raggiungere risultati apprezzabili anche mediante l'utilizzo della maschera di Delaire. Inoltre i rapporti tra i molari, quando presenti, sono spesso in cross-bite e può, pertanto, essere necessaria una loro correzione. In caso di agenesia moderata, il trattamento può essere effettuato per chiudere diastemi o spazi, mentre in caso di agenesia severa, l'ortodonzia consente il mantenimento o l'incremento di spazio

per il successivo inserimento di impianti o protesi. Potrebbe potenzialmente essere possibile sfruttare il potere osteogenetico creato dalle trazioni ortodontiche.

**Fig. 29:** Bracketts ortodontici su elementi conoidi e su protesi parziale rimovibile.



L'ortodonzia, tuttavia, non è praticata molto frequentemente nei pazienti con displasia, a causa sia del ridotto numero di denti, sia dell'incremento di rischio di carie che un dispositivo fisso comporta in pazienti già di per sé suscettibili a tale patologia, come conseguenza della diminuita salivazione. Talvolta, la chirurgia ortognatica può essere proposta a pazienti che presentano una grave alterazione dei rapporti intermascellari. In particolare, è stato supposto che l'osteotomia tipo "Le Fort 1", che ristabilisce una normale relazione tra le arcate, possa stimolare la crescita mascellare. Si tratta, tuttavia, di un intervento piuttosto aggressivo in un paziente in crescita. In letteratura non esistono numerosi studi relativi alla chirurgia ortognatica in pazienti affetti da Displasia Ectodermica.

## **RIABILITAZIONE IMPLANTARE**

La riabilitazione orale mediante protesi rimovibili viene in genere eseguita durante il periodo in cui il paziente è in fase di crescita, mentre gli impianti rappresentano il trattamento di elezione quando la crescita è terminata (Guckes A.D., 1991). Il trattamento protesico dei pazienti con severa ipodonzia presenta notevoli problemi (Ekstrand & Thomsson, 1988). La distribuzione irregolare e la morfologia conica degli elementi dentari associata alla presenza di creste alveolari notevolmente riassorbite

riduce la stabilità e la ritenzione della protesi convenzionale (Oesterle, 2000) (Kramer, 2007). Data l'assenza del legamento parodontale, gli impianti posizionati in soggetti in età evolutiva non seguono la crescita delle basi craniche e delle ossa mascellari, comportandosi come elementi dentari anchilosati e determinando di conseguenza problematiche funzionali ed estetiche (Sennerby, 1993) (Oesterle, 2000) (OpHeji, 2000). La letteratura dimostra che, negli ultimi decenni in particolare, gli impianti endossei sono stati estesamente utilizzati nel trattamento protesico di pazienti affetti da Displasia Ectodermica, nel corso di uno studio clinico effettuato per conto del National Institutes of Health, hanno riportato una percentuale di successo degli impianti del 90% in pazienti affetti da Displasia Ectodermica di età compresa tra i 13 e i 69 anni; questo valore si avvicina molto a quello del 95% riscontrato nello stesso studio per pazienti non displasici. Tuttavia uno studio, comparando la percentuale di successo implantare in pazienti in età evolutiva sani e affetti da Displasia Ectodermica, riporta un alte percentuali di fallimento in questi ultimi pazienti (Bergendal B., 2008). Il fallimento in bambini sani era solo leggermente superiore a quello riportato in pazienti adulti (6.1%), mentre in pazienti affetti da Displasia Ectodermica con anodonzia mandibolare mostravano valori molto più alti (64.3%). Questo dato potrebbe essere causato dall'utilizzo di impianti di diametro eccessivo rispetto alle strutture ossee che dovevano accoglierli oppure al fatto che questi impianti erano collegati tra di loro tramite una bassa impedendo la crescita mandibolare in zona posteriore e anteriore. Comunque il dato deve essere attentamente valutato considerando il fatto che nello studio solo 5 bambini con ED erano stati trattati per cui è necessario un campione più rappresentativo. Le piccole dimensioni della mandibola e la qualità ossea che a volte può essere scarsa sono considerate le principali cause di fallimento implantare in pazienti con ED (Bergendal B., 2008). Il principale problema menzionato era l'angolazione labiale degli impianti, a causa dell'esiguo spessore della cresta alveolare. In seguito, diversi altri Autori hanno evidenziato situazioni in cui impianti endossei sono stati utilizzati con successo nella riabilitazione della Displasia Ectodermica. Gli articoli presenti in Letteratura che prendono in esame il posizionamento di 2 o più impianti in mandibola anteriore riportano la connessione degli impianti tra loro con una barra fusa per migliorare la loro stabilità sotto le forze masticatorie (Smith, 1993). Non si conoscono gli effetti del carico masticatorio su impianti singoli utilizzati a supporto di protesi totali

inferiori. Questo tipo di protesizzazione rappresenta oggi l'obiettivo da raggiungere; molti studi, infatti, indicano un significativo miglioramento funzionale (poiché aumenta la stabilità e la ritenzione della protesi) ed un maggiore benessere psicologico, quindi un miglioramento della qualità di vita, in pazienti adulti riabilitati con una protesi supportata da impianti, rispetto alla loro condizione prima del posizionamento implantare o se paragonati ad un gruppo di controllo portatore di protesi totale (Pigno, 1996) (Van Waas, 1993). Un'altra ragione importante per la quale considerare gli impianti dentali nel trattamento della patologia è l'impatto positivo che possono avere sulla preservazione dell'osso alveolare. Alcuni Autori sostengono che gli impianti, oltre a conservare l'osso alveolare, generano un'attiva osteogenesi, grazie al fatto che determinano una trasmissione delle forze masticatorie alle strutture ossee mascellari più corretta (Ruhin, 2001) (Wan Wowern, 1993). Come già affermato precedentemente, le creste alveolari di questi pazienti sono sottosviluppate, ma, nonostante questo, hanno l'importante compito di supportare una protesi per tutta la vita. Per tali motivi, quando possibile, è bene attuare tutte le misure volte a limitare il riassorbimento osseo e promuoverne la neoformazione, soprattutto nei pazienti con totale anodonzia. Se la ridotta funzione masticatoria secondaria alla perdita dei denti è un fattore determinante nella dismorfosi del massiccio facciale, si può ipotizzare che pazienti in età evolutiva affetti da ED riabilitati con protesi impiantare dovrebbero mostrare dei valori cefalometrici simili a quelli della popolazione sana. Il corretto carico masticatorio indotto da una riabilitazione implantoprotesica sembra, in lieve misura, normalizzare la crescita facciale (Johnson E.L., 2002). Dato che la crescita cranio-facciale è per lo più completata nella tarda adolescenza, è stato ipotizzato che gli impianti debbano essere inseriti precocemente per permettere loro di modulare e normalizzare la crescita per effetto di un miglioramento del carico masticatorio.

### **Accrescimento mandibolare**

La mandibola è costituita da osso basale (corpo, ramo e sinfisi) ed osso alveolare; inoltre sono presenti tre processi: il condilo, il processo coronoideo, l'angolo. Björg & Skieller (1972) hanno dimostrato che la crescita della mandibola presenta una componente di rotazione in avanti che corrisponde a circa 6 gradi e che è dovuta all'accrescimento del condilo e del ramo mandibolare. L'influenza dell'edentulismo sulla crescita mandibolare

non è ancora ben conosciuto, tuttavia è evidente la mancanza o la riduzione del processo alveolare per l'assenza di germi dentali in eruzione (Sarnas, 1983). La presenza di agenesie multiple influenza notevolmente la crescita cranio-facciale e l'estetica del viso del soggetto. Una normale funzione masticatoria potrebbe aiutare al mantenimento ed alla formazione di osso a livello dei mascellari superiore ed inferiore (Graber, 1994) (Jonhson, 2002). Durante la crescita della mandibola i denti compensano la rotazione erompendo e inclinandosi, ma questo processo non può essere messo in atto dagli impianti che si comportano come denti anchilosati. Il risultato è che a distanza di anni dal loro inserimento gli impianti posizionati in mandibola anteriore si possono trovare inclinati verso la lingua (Becktor, 2001). La crescita verticale della mandibola, dovuta all'eruzione di elementi dentari presenti, e la rotazione in avanti sembrano essere i fattori limitanti all'inserimento di impianti in soggetti in crescita. Nei pazienti edentuli non sussiste, tuttavia, il problema degli elementi in eruzione e la variazione dell'inclinazione degli impianti può essere facilmente risolta durante il follow-up modificando la protesi. Il rimodellamento della mandibola non sembra avere un effetto negativo sugli impianti perché l'apposizione di nuovo osso avviene a livello del condilo, della parte posteriore del ramo e della faccia inferiore della sinfisi, mentre il processo di riassorbimento si verifica a livello dell'angolo e della superficie e anteriore linguale del ramo (Krarup, 2005).

### **Accrescimento del mascellare**

La crescita mascellare è molto più complessa della crescita mandibolare ed il risultato finale degli impianti è difficile da prevedere.

Le variazioni a carico del mascellare si possono suddividere in una fase di avanzamento e di una fase di allargamento. L'avanzamento passivo è dovuta alla crescita in avanti e in basso della base cranica e delle

suture del terzo medio del viso (Björk, 1977). L'espansione, invece, si suddivide in una componente verticale, sagittale e trasversale: Espansione verticale: è dovuta all'eruzione di elementi dentari eventualmente presenti in arcata, che determinano la crescita del processo alveolare. Si verifica, inoltre, un rimodellamento del palato con riassorbimento della superficie superiore e l'apposizione di nuovo osso su quella inferiore che determina un allargamento delle cavità nasali.

- Espansione sagittale: la crescita della mascella verso l'osso palatino sembra essere dovuta all'apposizione di osso a livello delle tuberosità.
- Espansione trasversale: si verifica a livello della sutura palatina mediana per apposizione di nuovo osso; per questo ogni connessione rigida che supera la linea mediana deve essere assolutamente evitata (Björk, 1977).

### **Età per inserimento implantare**

Il posizionamento di impianti in pazienti in età evolutiva affetti da Displasia Ectodermica richiede l'intervento di un team composto da chirurgo, pedodontista, protesista e ortodontista. Non esistono linee guida riguardo l'età ideale di inserimento degli impianti (Jonhson E.L., 2002). La maggior parte degli articoli in Letteratura che si occupano di riabilitazione implantare è costituito da case reports. Alcuni Autori (Guckes A.D., 1991) raccomandano di posporre l'inserimento di tali dispositivi dopo i 13 anni, a causa della migrazione degli stessi prima di questa età, dovuto alla crescita delle basi ossee. Nel 1989, la "Consensus Conference on Implantology" ha concluso che gli impianti non dovrebbero essere posizionati prima che sia avvenuta la massima crescita mandibolare (attorno ai 15 anni). Altri studi sono concordi con il criterio di attesa della massima crescita delle basi scheletriche, ma propongono una differenziazione secondo il sesso del paziente: 14-15 anni per le femmine e un anno più tardi per i maschi e raccomandano, in ogni caso, di studiare la curva di crescita individuale prima di procedere con la terapia implantare (Pigno, 1996). Dopo i 20 anni le differenze legate al sesso diminuiscono gradualmente. Alcuni studi dimostrano che gli impianti posizionati nelle ossa mascellari di maiali in crescita non si comportano come i denti normali, ma vengono presto sommersi dall'osso; da questo si può desumere che gli impianti in pazienti pediatriche dovrebbero comportarsi in maniera simile. C'è una correlazione tra la crescita della faccia e la crescita staturale. Tuttavia, mentre la crescita staturale si interrompe, la crescita della faccia in altezza sembra continuare dopo la pubertà (Fudalej, 2007). Ulteriori ricerche giungono alla conclusione che gli impianti non dovrebbero essere posizionati prima che la dentizione permanente sia completamente erotta; altri concordano con questo concetto, ma non escludono la possibilità di inserire impianti, anteriormente ai canini, nei bambini con totale o parziale anodonzia. Alcuni Autori valutano le possibili conseguenze che il posizionamento implantare precoce può avere e

alla fine sottolineano che, quando l'inserimento viene effettuato al termine della crescita o comunque nel periodo post-puberale, le probabilità di successo sono maggiori, concludendo, quindi, che queste procedure dovrebbero essere effettuate dopo i 15 anni per le femmine ed i 18 anni per i maschi per avere una maggiore prevedibilità di prognosi. Le possibili conseguenze di un posizionamento implantare precoce includono: la sommersione dell'impianto nell'osso a causa della crescita dei mascellari, l'esposizione dell'impianto a causa dell'assorbimento osseo associato ai mutamenti tridimensionali delle basi scheletriche in crescita, il movimento implantare e la limitazione della crescita mascellare e mandibolare se gli impianti sono connessi da una protesi rigida che attraversa la linea mediana. Nonostante questi possibili problemi, sono molti a sostenere la riabilitazione implantare in giovani pazienti parzialmente o totalmente edentuli, sottolineando che non è l'età cronologica del paziente, ma la maturità dento-scheletrica ad essere importante per evitare conseguenze spiacevoli. Dalla ricerca bibliografica si evince, quindi, che non esiste un'età precisa in cui sia corretto inserire gli impianti, ma che un'attenta valutazione è necessaria nel caso debba essere riabilitato un paziente giovane, per via delle possibili complicanze che derivano, oltre che dalla crescita scheletrica, anche dalla scarsa qualità dell'osso e dalle difficoltà tecniche conseguenti all'atrofia crestale. Sono necessarie ulteriori ricerche per determinare sia delle linee guida, sia la reale efficacia del concetto di "implantologia preventiva" nel mantenimento dell'osso alveolare. Non è quindi l'età anagrafica a determinare il momento in cui possono essere inseriti gli impianti, ma la maturità dento-scheletrica. Anche se la maggioranza degli studi sottolinea la pericolosità di un piano di trattamento implantare in soggetti in crescita, la necessità funzionale e psico-sociale di assicurare a questi giovani pazienti protesi stabili e confortevoli, ha spinto i ricercatori ad analizzare meglio il problema. Esistono in Letteratura casi di impianti posizionati molto precocemente, con l'obiettivo di favorire la crescita ossea innescata dal nuovo carico occlusale e aumentare la stabilità e la ritenzione della protesi (Tarjan, 2005). Becktor et al (2001) riportano il caso di 4 impianti mascellari e 4 mandibolari applicati ad un bambino di 8 anni, mentre sconsigliano la riabilitazione implantare prima dei 6 anni, a causa delle condizioni sfavorevoli (età troppo bassa, osso alveolare estremamente sottile). Un dato molto positivo deriva da uno studio in cui è stato misurato lo spostamento osseo e degli impianti in esso inseriti, in una fascia di età compresa tra i 9

ed i 20 anni, che dimostra come gli impianti posizionati precocemente seguano la crescita ossea, spostandosi parallelamente. Kearns et al.,(1999) riportano che gli impianti posizionati in mandibola anteriore avanzano seguendo la direzione di crescita e mantenendo la loro relazione originale con l'osso alveolare sul piano sagittale e trasversale, questo perché la crescita mandibolare avviene prevalentemente a livello dei condili e del ramo. Gli impianti posizionati nel mascellare superiore rimangono nella stessa posizione sul piano sagittale e trasversale durante la crescita del paziente.

L'altezza e lo spessore osseo, tuttavia, possono risultare insufficienti al posizionamento degli impianti; verificare un cambio nella loro angolazione questo è un problema che molto spesso affligge i pazienti affetti da Displasia Ectodermica e che ha reso necessario lo studio di metodiche alternative, allo scopo di evitare interventi chirurgici particolarmente complessi. Una di queste tecniche è rappresentata dall'utilizzo di impianti transzigomatici, che devono essere integrati da almeno 2 impianti tradizionali posti nel settore anteriore (Pennarocha-Diago, 2004). Il loro utilizzo permette di evitare interventi di rialzo di seno con innesti ossei dalla cresta iliaca, che sono ben più invasivi e che richiedono ricovero ospedaliero. Altra metodica utilizzata oggi abbastanza frequentemente per ovviare al problema dello spessore osseo insufficiente, è l'osteodistrazione alveolare. Si tratta, quindi, di tecniche che offrono un'alternativa alla protesi rimovibile in tutti i casi in cui l'implantologia tradizionale non è praticabile, soprattutto nei casi di ipodonzia severa.

### **Problematiche legate all'inserimento implantare precoce**

Il posizionamento implantare troppo precoce:

- Può portare alla migrazione degli impianti a causa della crescita delle basi ossee e dei mascellari determinando una loro infraocclusione oppure una loro esposizione (Sennerby, 1993). Il riassorbimento del mascellare superiore, del pavimento nasale e della premaxilla può determinare la dislocazione degli impianti in senso anteroposteriore e verticale (Oesterle, 2000). Kearns et al. riportano, invece, casi in cui il problema del dislocamento nel mascellare superiore non è stato incontrato, probabilmente perché, l'assenza di elementi dentari in eruzione riduce notevolmente la crescita del processo alveolare col risultato che la posizione implantare è influenzata solamente dalla crescita della sutura palatina;

- Può interferire con la posizione e l'eruzione dei germi di denti eventualmente presenti in zone limitrofe (Rossi & Andreasen, 2003) (Thilander, 1992);
- Può portare alla infraocclusione dell'impianto a causa della crescita dei mascellari sul piano sagittale e trasversale (Kramer, 2007) (Thilander, 1992). Questo fenomeno è più critico nelle zone estetiche e nelle zone limitrofe a denti in eruzione per effetto della crescita del processo alveolare (Becktor, 2001)
- Può provocare l'incarceramento del mascellare superiore e inferiore se gli impianti vengono collegati tra loro con una barra e superano la linea mediana. Questo fenomeno si verifica perché viene impedita la crescita trasversale a livello della sinfisi e della sutura palatina. Nella mandibola, tuttavia, la crescita trasversale e i cambiamenti alveolo-dentali sono meno drammatici rispetto al mascellare superiore. L'uso di protesi che connettono tra loro gli impianti mascellari superando la linea mediana può, quindi, alterare o bloccare la crescita trasversale. Per evitare questo problema tutte le protesi superiori presentano una barra separata a livello della linea mediana e gli impianti vengono inseriti nella premaxilla per permettere la crescita a livello della sutura palatina. La crescita trasversale a livello della sinfisi sembra essere meno rilevante perché questo centro di crescita ha già svolto la maggior parte della sua funzione entro i primi 6 mesi di vita o comunque durante le prime fasi dell'infanzia. Nella mandibola posteriore la crescita avviene principalmente nella tarda infanzia in senso antero-posteriore, trasversale e verticale (Enlow, 1990). Inoltre è presente una crescita di tipo rotazionale della mandibola che comporta modifiche verticali. Nella zona anteriore di una mandibola edentula la crescita alveolare appare ridotta (Oesterle, 2000). Principalmente la crescita trasversale della mandibola si verifica precocemente durante l'infanzia e la crescita antero-posteriore si verifica soprattutto in mandibola posteriore. La regione mandibolare anteriore rappresenta la sede più idonea al posizionamento impiantare in pazienti in età evolutiva affetti da Displasia Ectodermica. Il trattamento con impianti in mandibola anteriore non interrompe la normale crescita cranio facciale (Johnson, 2002). Tuttavia a lungo termine gli impianti potrebbero essere influenzati dalla crescita rotazionale della mandibola e si potrebbe verificare un cambio nella loro angolazione (Becktor, 2001).

## Raccomandazioni

- 1) In questi pazienti gli impianti possono essere utilizzati, protesizzati e caricati con successo fornendo una adeguata ritenzione della riabilitazione sovrastante;
- 2) Gli impianti, una volta inseriti si comportano come denti anchilosati quindi non seguono l'eruzione di denti contigui eventualmente presenti e potrebbero quindi essere sommersi dall'osso alveolare in crescita;
- 3) L'inserimento di impianti in soggetti in età evolutiva può richiedere procedure chirurgiche aggiuntive come innesti d'osso, rialzo di seno mascellare rendendo più difficoltoso l'intervento e aumentando la morbidità.
- 4) Sulla base degli studi di Bjork e Skieller è prudente dividere la protesi superiore a livello della linea mediana per consentire la crescita a livello della premaxilla e della sutura palatina. In mandibola è, invece, consigliato l'inserimento di impianti nella zona anteriore per evitare di interferire con la crescita trasversale;
- 5) Le protesi devono essere attentamente monitorate e modificate nel tempo a causa dell'eruzione di elementi dentari eventualmente presenti e della crescita dei mascellari.

## CAP III – MATERIALI E METODI

*La riabilitazione tradizionale con protesi mobile totale che comunemente viene utilizzata nei giovani pazienti affetti da EDs, permette di ottenere un sensibile miglioramento della funzione masticatoria e fonetica con netti vantaggi estetici. Tuttavia le protesi mobili, ed in particolare quella inferiore, possono rappresentare fonte di discomfort a causa della ridotta stabilità e ritenzione dovuta alla presenza di “creste ossee lamellari”. Presso il nostro Servizio si è creato un protocollo operativo sperimentale che ha lo scopo di riabilitare i pazienti in età evolutiva con anodontia o oligodontia (non più di 5 elementi dentari) con overdentures utilizzando impianti di diametro 3.8mm per aumentare la stabilità delle protesi inferiori dove gli spessori ossei estremamente ridotti, riducono notevolmente la stabilità e la ritenzione delle protesi tradizionali. Si è inoltre valutato l'eventuale variazione della posizione degli impianti, dovuta alla crescita, per mezzo di tracciati cefalo metrici e misurazioni eseguite su OPT, TLL e lastre occlusali.*

### PROTOCOLLO DI RICERCA (2008)

*“Utilizzo di impianti a diametro ridotto per la riabilitazione di pazienti in età evolutivo affetti da Displasia Ectodermica”.*

Il protocollo operativo sperimentale ha ottenuto l'accettazione da parte del Comitato Etico del *Policlinico Sant'Orsola-Malpighi* e dal Comitato Etico dell'*Azienda Ausl di Bologna*.

#### **Focus**

L'aumento della stabilità protesica prodotto dagli impianti permette un miglior approccio psicologico del paziente, garantendogli il miglioramento della qualità della vita ed una facilitata integrazione sociale.

Inoltre, si ipotizza l'utilizzo degli impianti anche a scopo ortopedico, per favorire lo sviluppo dei mascellari migliorando i carichi masticatori e quindi andando a guidare la crescita delle basi craniche e dei mascellari come suggerito da alcuni autori. (Jonhson E.L., 2002).

Gli impianti vengono inseriti in zona 33 e 43, la Letteratura propone queste zone come quelle meno soggetta alla crescita mandibolare e capaci di fornire una buona stabilità implantare e protesica con buone percentuali di successo (90%). (Guckes A.D., 1991).

### **Promotore della Ricerca**

Sperimentazione finalizzata al miglioramento della pratica clinica che non ha finalità di lucro. Lo studio indipendente è promosso dal Prof. Claudio Marchetti dell'Unità Operativa di Chirurgia Maxillo-Facciale Policlinico Sant'Orsola Malpighi in collaborazione con la Prof.ssa Gabriela Piana responsabile del Servizio di Assistenza Odontoiatrica per Disabili del DIBINEM.

### **Sede della sperimentazione**

Lo studio viene condotto presso il Reparto di Chirurgia Orale e Maxillo-Facciale del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi e presso il Servizio di Assistenza Odontoiatrica per Disabili del DIBINEM.

L'arruolamento dei pazienti, la raccolta dei dati anamnestici medici ed odontoiatrici, lo studio del caso e la conseguente diagnosi e raccolta di tutti i dati post-operatori verranno eseguiti presso il Servizio di Assistenza Odontoiatrica per Disabili del DIBINEM. Mentre tutte le terapie di chirurgia (intervento di posizionamento degli impianti, scopertura impianti) presso il Reparto di Chirurgia Orale e Maxillo-Facciale del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi.

### **Disegno dello studio**

Studio clinico di coorte. Sono stati reclutati un totale di 5 pazienti dal 2008 a tutt'oggi, affetti da Displasia Ectodermica con oligo-anodonzia (non più di 5 elementi dentari) di età compresa tra 9 e 17 anni presso il Servizio di Assistenza Odontoiatrica per Disabili del DIBINEM,

### **Descrizione impianti**

Gli impianti utilizzati per il protocollo sono i Genesis (*Keystone dental Inc. - Burlington, MA USA*) di diametro 3.8 mm, questi impianti possiedono una superficie nanotecnologica (BioSpark®) arricchita di ioni calcio e fosfato che favorisce la formazione di cristalli di idrossiapatite sulla superficie di titanio in grado di migliorare il contatto osso-impianto (Giavaresi G., 2008) (Grecchi F., 2009) (Park S.E., 2007) velocizzando così il processo di osteointegrazione.

### **Numero di casi**

Dal 2008 a tutto il 2013, sono stati arruolati presso il Servizio di Assistenza Odontoiatrica per Disabili del DIBINEM, 5 pazienti di età compresa tra 9 e 11 anni, affetti da Displasia Ectodermica, con ipo/anodonzia e con riassorbimento osseo marcato, che necessitano di riabilitazione protesica supportata da impianti per migliorare funzione masticatoria, fonetica ed estetica delle aree edentule.

#### **Durata dello studio**

Lo studio ha un periodo di arruolamento di 18 mesi circa. La durata complessiva dello studio è di 5 anni (2008-2013).

#### **Criteri di inclusione dei pazienti:**

- *Almeno 9 anni di età, fino ai 17 anni compiuti*
- *Diagnosi di EDs con anodonzia o oligodonzia (non più di 5 elementi dentari)*
- *Quantità di osso sufficiente a garantire l'inserimento degli impianti di diametro ridotto documentata da misurazioni cliniche e radiologiche*
- *Consenso firmato allo studio e garanzia a partecipare per tutta la durata del progetto da parte di entrambi i genitori e del ragazzo se di età > a 12 anni*

#### **Criteri di esclusione dei pazienti:**

- *Presenza di patologie sistemiche associate*
- *Quantità di osso insufficiente a garantire l'inserimento degli impianti di diametro ridotto documentata*

#### **Registrazione del paziente**

I genitori dei pazienti che soddisfano i criteri di inclusione, sono informati sullo studio ed i suoi obiettivi, inoltre essi ricevono poi, tutte le informazioni facenti parte del consenso informato scritto.

#### **Documentazione preoperatoria**

- *Anamnesi medica*
- *Anamnesi odontoiatrica*
- *Valutazione radiografica dei mascellari (OPT, TLL, TC con 3D Accuitomo)*
- *Valutazione degli spessori ossei*
- *Documentazione fotografica*
- *Modelli di studio pre-operatori*
- *Modello stereolitografico*
- *Cartella del follow-up.*

## **Valutazione spessore della cresta ossea**

Per valutare lo spessore osseo di ogni paziente si utilizza una:

### *Tecnica clinica:*

Dopo l'esecuzione di anestesia topica e locale, tramite un calibro chirurgico, si eseguono misurazioni a 0,4, 0,9 cm dalla cresta clinica; superiormente le prime misurazioni nella zona corrispondente alla parte esterna dell'ala del naso (individuate con calibro) e le seconde distalmente a 0,5 cm dalle prime (posizione 13-15, 23-25); inferiormente misurazioni verranno effettuate mesialmente al forame mentoniero (individuato con sonda bottonuta).

### *Tecnica radiologica:*

Il paziente viene sottoposto ad una serie di indagini strumentali radiologiche che comprendono:

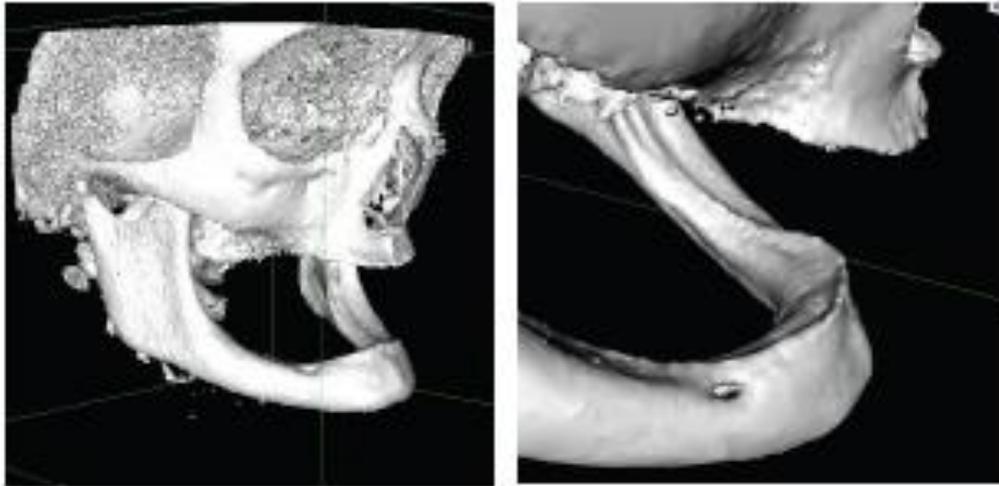
- TC con 3D Accuitomo;
- Ortopantomografia, radiografie endorali occlusali, Teleradiografia del cranio in proiezione Latero-Laterale (*per valutare le proporzioni del massiccio facciale e l'eventuale modificazione della posizione degli impianti tramite tracciati e misurazioni*).

L'obiettivo è quello di valutare lo status dentario del paziente (compresi i germi dentari non ancora erotti) e gli spessori ossei disponibili in zona interforaminale per il posizionamento impianti.

## **Realizzazione del modello stereolitografico**

Dopo aver realizzato la TC con il 3D Accuitomo, i dati Dicom vengono elaborati tramite un software di grafica tridimensionale (OsiriX) con il quale è possibile riprodurre per mezzo (Fig.31) di una stampante stereolitografica il modello in resina della mandibola del paziente (Fig.32).

**Fig.30:** Ricostruzione tridimensionale del massiccio facciale e della mandibola del paziente



**Fig.31:** Realizzazione del modello stereolitografico della mandibola del paziente



### **Impronte in alginato e definitive**

Vengono rilevate impronte in alginato delle arcate mediante portaimpronte del commercio (i più piccoli disponibili) riprodotte in gesso ed ottenendo così i modelli di studio. I portaimpronte individuali sono utilizzati per prendere le impronte definitive in polisolfuro (Permlastic Regular, Kerr, Orange, CA, USA).

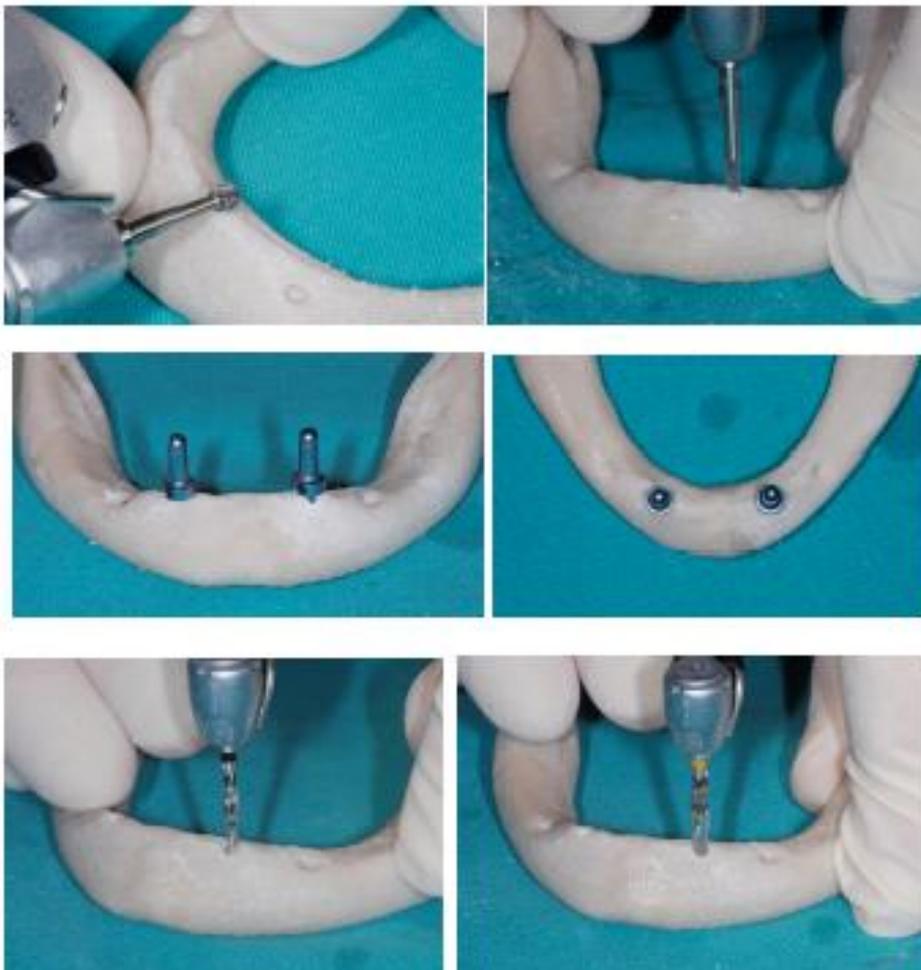
### **Simulazione dell'intervento su modello stereolitografico**

Sul modello stereotitografico viene simulato l'intervento di inserimento degli impianti allo scopo di valutare lunghezza implantare più adeguata al caso e per realizzare una mascherina operatoria perfettamente congrua alla struttura ossea del paziente.

La tecnica operatoria prevede:

- *Spianamento della cresta con fresa a rosetta montata su manipolo dritto (W&H, Austria)*
- *Utilizzo della fresa pilota di forma lanceolata per qualche millimetro*
- *Utilizzo della fresa da 2 mm per tutta la lunghezza implantare*
- *Utilizzo della fresa da 2.7 mm*
- *Utilizzo della fresa crestale*
- *Utilizzo della fresa finale conica*
- *Inserimento di due impianti prova nel modello stereolitografico della mandibola.*

**Fig.33:** Simulazione dell'intervento su modello stereolitografico.



Utilizzando il modello stereolitografico e l'impronta definitiva viene realizzata la mascherina chirurgica che guiderà ogni intervento (Fig.33).

**Fig.34:** Mascherina utilizzata per l'inserimento degli impianti su paziente

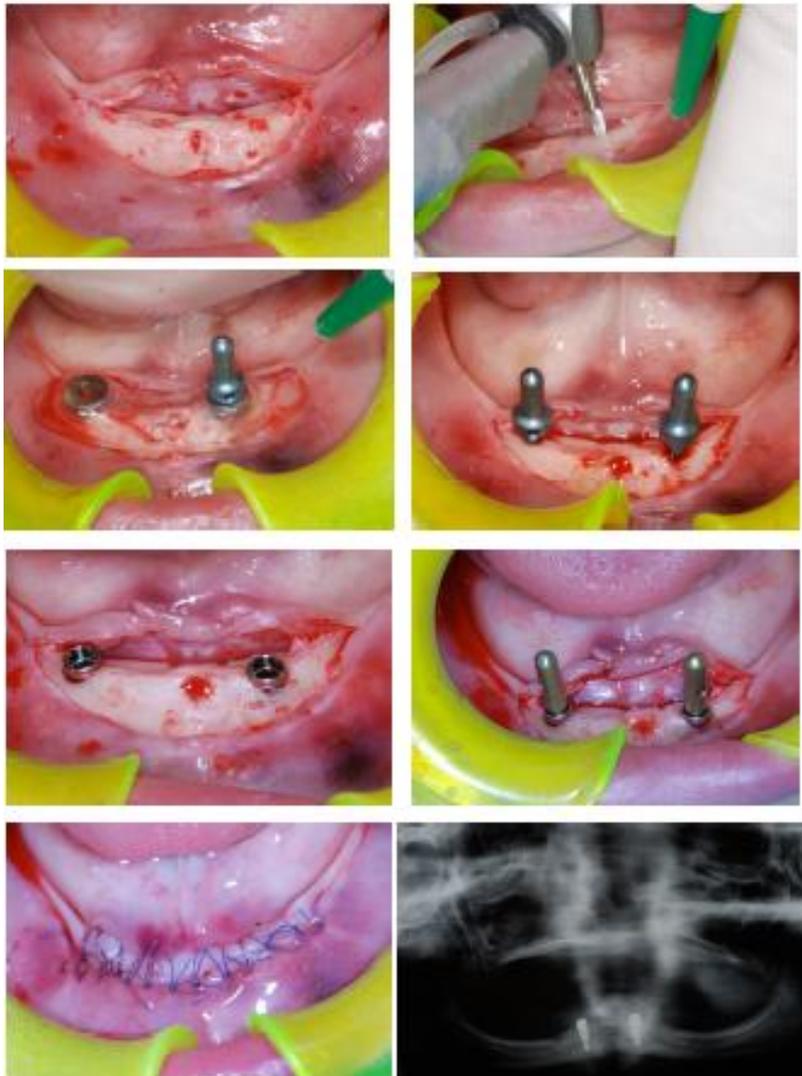


### **Tecnica operatoria**

Tecnica consigliata dalla casa produttrice degli impianti.

Anestesia plessica articaina con vasocostrittore adrenalina 1:100000 a livello del forame mentoniero. Apertura di un lembo a spessore totale e scheletrizzazione dell'osso sottostante con uno scollaperiostio. Data la presenza, generalmente, di una cresta alveolare a profilo lamellare è necessario livellarla e ridurla con una fresa a rosetta (800 giri/min) in modo da avere una superficie piana. Dopo aver fissato la mascherina chirurgica verrà utilizzata la fresa lanceolata per pochi mm (800 giri/min) e successivamente verrà utilizzata la fresa da 2 mm (800 giri/min) fino alla lunghezza dell'impianto. Verranno poi utilizzate in sequenza la fresa cilindrica da 2.7 mm (800 giri/min), la fresa crestale (800 giri/min) e la fresa finale finale conica. Genesis BioSpark® da 3.8 mm verrà inserito a 15 giri/min.

**Fig.35:** Sequenza operatoria di inserimento implantare in mandibola anteriore



Una volta inseriti gli impianti vengono avvitate le viti di guarigione ed i lembi vengono suturati con Vicryl 4.0, la guarigione è di tipo sommerso. Le superfici trattate degli impianti utilizzati nello studio consentono una riduzione dei tempi di guarigione (1-2 mesi) che altrimenti sarebbero di circa 4 mesi. Nel protocollo in esame si attenderà più tempo perché i dati della Letteratura consigliano tempi di rientro maggiori in questi pazienti (Bergendal B., 2008).

A tutti i pazienti viene somministrata Amoxicillina (dose in base al peso corporeo) a partire dal giorno dell'intervento e per i 6 giorni successivi; viene inoltre prescritto un analgesico non steroideo dopo l'intervento. Le istruzioni post operatorie includeranno una dieta morbida per 2 settimane associata ad un'igiene orale adeguata mediante 4

sciacqui al giorno di collutorio a base di clorexidina 0.2%. Le suture sono rimosse 7-10 giorni dopo l'intervento e durante tale periodo di guarigione della ferita chirurgica non viene utilizzata nessuna protesi rimovibile. Successivamente al paziente vengono fatte indossare protesi mobili fino alla scoperta degli impianti al termine del periodo di guarigione.

### **Scopertura degli impianti**

Dopo il periodo di guarigione sommersa, vengono scoperti gli impianti facendo una incisione a spessore parziale in modo tale da ridurre al minimo il rischio di riassorbimento dell'osso corticale e vengono inserite le viti di guarigione (Fig.36). Vengono quindi dati due punti di sutura Vicryl 4.0 per bloccare il lembo e favorire una guarigione stabile dei tessuti attorno agli impianti. Nella stessa giornata viene presa una impronta in alginato dell'arcata inferiore per poter realizzare i portaimpronte individuali che servono al successivo appuntamento per la presa dell'impronta definitiva con i transfer inseriti (Fig.37).

*Fig.36: Scopertura degli impianti e posizionamento delle viti di guarigione*



### **Presa delle impronte definitive**

Dopo due settimane circa dalla scopertura, quando cioè sono guariti i tessuti molli, vengono avvitati i transfer pick-up per l'impronta definitiva. Il portaimpronte individuale viene forato nella zona degli impianti e uno strato di cera morbida viene inserito dentro al foro. Il portaimpronte viene caricato con polietere (Impregum, 3M-ESPE, St. Paul, MN, USA), viene inserito in bocca in modo che la testa del transfer fuoriesca dai fori precedentemente realizzati sul portaimpronte. La vite del transfer viene poi svitata e si attende l'indurimento del materiale (5-6 min.). L'impronta viene successivamente sfilata dalla bocca del paziente e viene consegnata all'odontotecnico unitamente agli analoghi da gesso (Fig.38).

### **Ancoraggio della protesi pre-esistente**

Dopo circa 2 mesi e mezzo dal posizionamento implantare vengono avvitate a 25 N due sfere (ball attachment) di 1.8 mm di diametro con altezza di spalla pari a 2.5 mm (Keystone dental Inc. - Burlington, MA USA). Le protesi pre-esistenti vengono scaricate a livello degli attacchi a sfera e poi ribasate con una resina elastica (Flexacryl, Lang). In questo modo il paziente può beneficiare da subito di un migliore ancoraggio della protesi. (Fig.39).

### **Registrazione dei rapporti intermascellari**

Le basi in resina coi valli in cera vengono inserite nel cavo orale e si effettuano la registrazione dei rapporti intermascellari individuando la corretta dimensione verticale di occlusione (DVO), il parallelismo del piano occlusale col piano di Camper, la linea del sorriso, la regione canina e la linea mediana (Fig.40).

I valli verranno poi utilizzati dall'odontotecnico per determinare il posizionamento corretto degli elementi dentari in resina.

*Fig.40: Registrazione dei rapporti intermascellari*

### **Prova montaggio in cera**

Viene successivamente effettuata la prova del montaggio dei denti frontali e diatorici. I denti in resina montati considerando l'età del paziente e seguendo la sequenza eruttiva e la formula dentaria di pazienti dello stesso sesso, età e corporatura (Fig.41). Per una

migliore estetica e rendere meno visibile il manufatto protesico vengono simulati malposizionamenti, denti in eruzione o diastemi.

### **Realizzazione della protesi definitiva**

Dopo aver effettuato la prova del montaggio dei denti sui valli in cera, viene effettuata la prova della protesi definitiva. Vengono controllati i contatti occlusali in centrica e vengono effettuate le prove di disclusione in centrica e lateralità. Infine vengono effettuate le prove fonetiche facendo particolare attenzione alle consonanti labio-dentali (f, v) e fricative.

*Fig.37: Realizzazione delle protesi definitive*



### **Realizzazione della guida di espansione**

Per evitare l'incarceramento dei mascellari inferiore e favorirne la crescita sia sul piano sagittale che sul piano trasversale gli impianti non vengono collegati tra di loro mediante una barra rigida, ma viene creata e avvitata una guida capace di scorrere e di assecondare la crescita della mandibola (Fig.43). In questo modo la crescita dei mascellari non è in alcun modo ostacolata dal posizionamento degli impianti, ma al contrario può avvenire in completa libertà. La guida d'espansione è realizzata con monconi e barre calcinabili che consentono una costruzione semplice e rapida con costi molto contenuti. La guida presenta una porzione millimetrata che consente, durante il trattamento, di valutare l'entità di espansione della mandibola col crescere del massiccio

facciale del soggetto (Fig.44). La Letteratura riferisce che la crescita a livello della sinfisi termina nella prima infanzia (Cronin R.J., 1994) (Skieller V., 1984). Questa metodologia di riabilitazione permette di valutare, non solo gli effetti della crescita mandibolare sulla riabilitazione implantare, ma anche se realmente ci sia o meno crescita a livello della sinfisi e se la crescita in mandibola posteriore non influenzi la regione anteriore, la presenza della scala millimetrata permette di valutare anche l'entità di tale crescita.

**Fig.38:** Realizzazione della guida di espansione

Sulla guida di espansione sono inseriti degli attacchi a pallina che permettono alla protesi di agganciarsi alla sottostruttura fornendo una notevole ritenzione, che può essere modulata sostituendo le cappette in teflon inserite nella protesi.

**Fig.44:** Guida di espansione con scala millimetrata per valutare l'entità dell'espansione



Dopo aver realizzato la protesi in resina acrilica e la guida di espansione, viene realizzato il manufatto protesico definitivo inserendo la sottostruttura all'interno del manufatto protesico. (Fig.).

### **Follow-up**

Il paziente viene controllato ogni mese fino al termine dello studio (5 anni) per valutare lo stato di salute implantare ed individuare zone dolenti eventualmente presenti che devono essere scaricate. Particolare attenzione viene data all'occlusione che deve essere uniforme, con contatti distribuiti su tutti gli elementi dentari. Viene, se necessaria, eseguita la ribasatura della protesi per garantire sempre un totale appoggio mucoso ed impedire un sovraccarico sugli impianti. Oltre alla ortopantomografia (OPT) preoperatoria, vengono effettuate una OPT una TLL ed una lastra endorale occlusale a 2, 6, 12 e successivamente ad ogni anno dal posizionamento degli impianti fino al termine dello studio. Le indagini radiologiche servono per valutare il parallelismo tra il piano occlusale e la base cranica e la posizione tridimensionale degli impianti facendo particolare attenzione alla loro migrazione in rapporto alla crescita dei mascellari.

### **Valutazione della Sicurezza**

Le variabili di studio sulla sicurezza includono la valutazione di tutte le complicazioni/ reazioni avverse rilevabili durante l'intervento e nel decorso post-operatorio, per tutta la durata dello studio, sia che siano in relazione all'uso del dispositivo o meno.

### **Analisi dei dati**

I tracciati e le misurazione sono stati eseguiti tramite il software NemoCeph.

I risultati ottenuti nei due gruppi di trattamento, sono sottoposti ad analisi di tipo descrittivo ed analisi statistica, con valutazione dei parametri clinici e radiologici confrontando i valori di base con quelli ottenuti ai vari controlli.

## RISULTATI

Le Displasie Ectodermiche sono un gruppo eterogeneo di condizioni cliniche che derivanti da differenti interazioni molecolari, presentano una notevole variabilità nell'espressione fenotipiche. L'analisi di tutti i pazienti affetti da EDs seguiti presso il Servizio di Assistenza Odontoiatrica per Disabili del DIBINEM ha rilevato la presenza di caratteristiche fenotipiche comuni e peculiari della patologia nel 79% dei soggetti. Il fenotipo facciale più rappresentato è quello caratterizzato da: *capelli radi, sottili, fragili, ciglia e sopracciglia molto rade, iperpigmentazione perioculare, labbra protruse e riduzione di altezza del terzo inferiore del viso*. Seppur la presenza di fenotipi simili è stata associata alle forme di Displasia Ectodermica X-linked o autosomica per il coinvolgimento di geni che intervengono nelle medesime vie di sviluppo, non è stato possibile verificare queste relazioni, in quanto la maggior parte dei pazienti del gruppo di studio sono ancora in fase di accertamento genetico. L'analisi delle ortopantomografie ha evidenziato un significativo interessamento dell'apparato dentale, in particolare modo per quanto riguarda le anomalie di numero: il 5,3% dei pazienti presenta una condizione di *ipodonzia*, l'89,4% di *oligodonzia*, il restante 5,3% di *anodonzia*.

Questo dato è significativo, soprattutto se si considera che nella popolazione generale l'ipodonzia interessa tra il 2,6 e l'11,3% degli individui, mentre oligodonzia e anodonzia interessano una percentuale molto più bassa (Larmour C.J., 2005). L'agenesia dentale si accompagna quasi sempre ad atrofia ossea che, in genere, risparmia solamente le poche aree in cui i denti sono presenti. Nel nostro campione il numero medio di denti permanenti in agenesia (escluso M3) è 21.

Questo dato è in accordo con la letteratura (Lexner M.O., 2007) (Prager T., 2006), che riporta, per pazienti affetti da EDs, un numero di elementi agenetici compreso tra 14 e 23.

Gli elementi permanenti più frequentemente presenti sono i primi molari (sia mascellari che mandibolari), seguiti da incisivi centrali e canini mascellari, in accordo con i dati della letteratura (Lexner M.O., 2007) (Prager T., 2006) (Prager T., 2006)

A differenza di quanto riscontrato dagli stessi Autori, il campione esaminato mostra un numero basso di agenesie degli incisivi laterali superiori. Questa incongruenza potrebbe

essere dovuta al fatto che, essendo frequentemente elementi di forma conoide, sono facilmente confondibili con canini mesializzati.

Frequente anche la presenza degli incisivi inferiori (che vengono invece solitamente riportati come elementi assenti). In accordo con la Letteratura, gli elementi più frequentemente mancanti sono premolari e secondi molari e l'arcata mandibolare è quella maggiormente interessata dall'agenesia dentale (Lexner M.O., 2007) (Prager T., 2006).

L'incidenza degli elementi conoidi è molto elevata e interessa in modo particolare i canini superiori e inferiori, seguiti da incisivi laterali inferiori e centrali superiori. La presenza di elementi conoidi, associata alle caratteristiche facciali e soprattutto all'agenesia dentale, è stata spesso utile per indirizzare il sospetto diagnostico.

L'oligo-anodonzia porta ad un cambiamento della relazione tra i mascellari sul piano sagittale con tendenza allo sviluppo di una III classe. I pazienti affetti da EDs sviluppano infatti un profilo facciale convesso dove si assiste alla riduzione della lunghezza del mascellare (retrognatismo) e ad un aumento della proinclinazione degli incisivi (Bondarests N., 2002). La retrognazia mascellare sembra essere collegata al grado di ipodonzia (Bondarests N., 2002) (Johnson E.L., 2002). Per quanto riguarda la gravità di agenesia dentale in termini di ipo-, oligo- ed anodonzia, questa è associata in modo significativo alle principali misure lineari e angolari ed è, quindi, direttamente correlata alle caratteristiche cranio-facciali. L'analisi dei valori ottenuti per i singoli pazienti mostra, infatti, che i casi caratterizzati da oligo-anodonzia presentano una più accentuata retrusione e ipoplasia mascellare ed una maggiore riduzione della dimensione verticale del viso, in particolare del terzo inferiore, se paragonati ai pazienti con ipodonzia. I risultati ottenuti sono in accordo con quanto evidenziato da diversi lavori scientifici presenti in letteratura (Johnson et al., 2002; Bondarets et al., 2002; Lexner et al., 2007; Arslan et al., 2007).

Ruolo chiave nella gestione del paziente affetto da EDs è la riabilitazione orale. Essa, infatti, permette un corretto ripristino della funzione masticatoria e fonetica, la presenza delle viti di espansione nella riabilitazione con protesi mobili, e della guida di espansione in quella implantare, evita l'incarceramento delle ossa mascellari permettendone la crescita e favorendo così lo sviluppo di un profilo armonico. Il miglioramento della funzione masticatoria e la realizzazione di carichi masticatori

corretti sembra giocare un ruolo fondamentale nello sviluppo cranio-facciale. In particolare la riabilitazione protesica permette un corretto sviluppo in termini di divergenza e di assetto scheletrico intermascellare. Il loro impiego, pertanto, dovrebbe avvenire il più precocemente possibile, allo scopo di riabilitare le funzioni masticatoria e fonetica, di migliorare l'estetica e conseguentemente di favorire l'inserimento sociale del bambino, ma anche di normalizzare, sia in senso verticale che antero-posteriore, i rapporti tra le arcate, ostacolando la manifestazione clinica di una terza classe. Dato lo scarso sviluppo dei processi alveolari, a causa del quadro di agenesia dentale, particolare attenzione va riservata all'altezza delle protesi, con l'obiettivo di normalizzare la dimensione verticale del terzo inferiore del viso, mantenendo invariata l'inclinazione del piano oclusale, in quanto fondamentale per un corretto sviluppo. Il protocollo di riabilitazione protesica con overdenture su impianti (2008) oltre a preservare l'altezza dell'osso alveolare e a rappresentare un ancoraggio osseo per eventuali interventi ortopedici e funzionali, può permettere la realizzazione di manufatti protesici più complessi, senza un peggioramento della stabilità e ritenzione. Inoltre, l'incremento della funzione e la trasmissione di forze attraverso impianti dentali osteo-integrati può influenzare positivamente la crescita cranio-facciale e, al tempo stesso, migliorare l'estetica ed il comfort. La presenza della guida di espansione millimetrata permette inoltre di valutare l'eventuale crescita a livello della sinfisi fornendo utili informazioni sul possibile spostamento implantare.

## **SINTESI ATTIVITÀ DI RICERCA**

### **Italiano**

Le Displasie Ectodermiche (*EDs*) rappresentano un vasto ed eterogeneo gruppo di sindromi polimalformative caratterizzate da ipoplasia, aplasia o distrofia dei derivati ectodermici. L'oligo-anodonzia tipica delle *EDs*, comporta la mancata o ridotta formazione del processo alveolare tale per cui, nelle aree edentule, le creste alveolari risultano atrofiche, con conseguente riduzione di dimensione verticale del terzo inferiore del viso e tendenza alla terza classe scheletrica. L'oligo-anodonzia rappresenta, quindi, una grossa menomazione sia dal punto di vista funzionale che psicologico. La riabilitazione precoce di questi pazienti appare quindi molto importante. Presso il nostro

Servizio si messo a punto un protocollo operativo sperimentale che ha lo scopo di riabilitare questi pazienti con overdentures impianto-supportate dove gli spessori ossei estremamente ridotti riducono la ritenzione delle protesi tradizionali. Sono stati riabilitati 5 pazienti di età compresa fra i 9 e 11 anni. Prima dell'intervento chirurgico sono stati eseguiti tutti gli esami diagnostici necessari e creato un modello stereolitografico in resina su cui pianificare l'intervento. A 2 mesi dall'intervento si esegue la scopertura degli impianti e successivamente si inseriscono gli abutment e la barra d'espansione, in grado di dare stabilità protesica e nel contempo permettere l'accrescimento mandibolare. Su di essa successivamente viene inserita la nuova protesi rimovibile. A questo punto i pazienti verranno monitorati ogni mese, ed ad ogni anno vengono eseguiti gli esami radiologici per analizzare tramite i tracciati e le conseguenti misurazioni l'eventuale modifica di posizione degli impianti, inoltre, l'eventuale cambiamento di posizione può essere monitorata clinicamente tramite la scala millimetrata presente sulla guida.

Lo studio evidenzia come a distanza di circa 4,5 anni sul primo caso non ci siano variazioni di posizione degli impianti e come la variazione di rotazione mandibolare dovuta alla crescita non l'abbia influenzata in nessun modo.

## **Inglese**

Ectodermal Dysplasias syndrome (*EDs*) are a heterogeneous group of inherited disorders characterized by dysplasia of tissues of ectodermal origin. Complete or partial anodontia are the most frequent dental findings. Prosthetic rehabilitation is recommended from functional, esthetic, and psychological points of view. Because of the anatomical abnormalities of existing teeth and alveolar ridges, conventional prosthetic rehabilitation in young patient is often difficult. Five growing patients (age 9 to 11 years) with oligo- or anodontia were prosthetically rehabilitated. Panoramic film and Cone Beam Computerized Tomography were performed and a resin model of mandibular bone was made. Despite a remarkable multi-dimensional atrophy of the alveolar bone, the insertion of two tapered implants was possible. After a submerged healing period of 2 month, the implants were exposed and abutment connection was performed. Implants were connected with an expansion bar that permits mandibular growth and prosthetic retention. A removable prosthesis was constructed with ball attachments. Mandibular

growth was followed and evaluated using the expansion guide and cephalometric radiographs. Mandibular growth in sagittal and transverse direction had no adverse effects on implant position. The expansion bar permitted the undisturbed growth of the mandible. After 4.5 years of follow-up, this study showed that Implant-supported overdenture may improve oral function, phonesis and esthetics. The mandibular rotation accompanying growth had not caused a significant problem relative to the angulation and migration of the implants. Implants can be successfully placed, restored and loaded in growing EDs patients. The cephalometric analysis supported that EDs patients show midface hypoplasia with a class III tendency, which can be avoided by early rehabilitation. Thanks to the good stability and retention of the implant-supported overdenture, patients considered the prostheses as comparable to natural teeth.

## Bibliografia

1. Adaimy L., C. E. M. H. M. S. D. V. N. E. B. H. d. M. P. M. A., 2007. Mutation in WNT10A is associated with an autosomal recessive ectodermal dysplasia: the odonto-onycho dermal dysplasia.. *Am J Hum Genet*, Oct(81(4)), pp. 821-828.
2. Akhyani M., K. K., 2007. Ectodermal dysplasia with alopecia, onychodysplasia, hypohidrosis, keratoderma, abnormal teeth and deafness.. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, Volume 73, pp. 409-411.
3. Bal E., B. L. C. C. E. K. F.-., O. K. H.-R. S. B. C. M. A. C. G. S. A. S. A., 2008. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasias at the EDARADD locus. *Hum. Mutat.*, Volume 28, pp. 703-709.
4. Barberia E., S. D. A. M. M. M., 2006. Multiple agenesis and anhidrotic ectodermal dysplasia: a comparative longitudinal study of dental similarities and gentic differences in two groups of children. *Eur J Paediatr Dent*, Sep(7(3)), pp. 113-121.
5. Baskan Z., Y. I. U. R. K. S. Y. Y. B. G. A. O. O. T., 2006. Evaluation of ectodermal dysplasia. *Kaohsiung j. Med. Sci.*, Volume 22, pp. 171-176.
6. Bergendal B., E. A. N. P., 2008. Implant failure in young children with ectodermal dysplasia: a retrospective evaluation of use and outcome of dental implant treatment in children in Sweden. *Int J Oral Maxillofacial Implant 2008*, Issue 23, pp. 520-524.
7. Bergendal B., N. J. B. M. H. A., 2006. Signs and symptoms from ectodermal organs in young Swedish individuals with oligodontia. *Int J Paediatr Dent*, Issue 16, pp. 320-326.
8. Berlin AL., P. A. C. L., 2002. Incontinentia pigmenti: a review and update on the molecular basis of pathophysiology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Volume Aug 47(2), pp. 169-187.
9. Bianchi D.W., F. A. P. M. K. J. L. S., 1990. Isolation of fetal DNA From nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, May(87(9)), pp. 3279-3283.
10. Bondarest N., J. R. M. D. F., 2002. Analysis of facial growth in subjects with syndromic ectodermal dysplasia: a longitudinal analysis. *Orthod Craniofac Res*, May (5(2)), pp. 71-84.

11. Bondarests N., J. R. M. F., 2002. Analysis of facial growth in subjects with syndromic ectodermal dysplasia: a longitudinal analysis. *Orthod Craniofacail*, Volume 5, pp. 71-74.
12. Cai S., P. Y. H. B. S. T. S. Z. F. X., 2011. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transfected with ectodysplasin for regeneration of sweat glands. *Chin Med J*, Aug(124(15)), pp. 2260-2268.
13. Casagrande L., C. M. N. J., 2011. Dental pulp stem cell in regenerative dentistry. *Odontology*, Jan( 99(1)), pp. 1-7.
14. Cawood J.L., H. R., 1991. Reconstructive preprosthetic surgery, anatomical considerations. *Int J Oral Implant*, Volume 20, pp. 75-82.
15. Clarke A., P. D. B. R. H. P., 1987. Clinical aspects of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Arch dis Child*, Issue 62, pp. 989-996.
16. Clauss F., M. M. O. F. W. E. H.-R. S.-., B. C. A. Y. L. H. S. M., 2008. Dentocraniofacial phenotypes and underlying molecular mechanisms in hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED): a review.. *J. Dent. Res.*, Dec.(87(12)), pp. 1089-1899.
17. Cordeiro M.M., D. Z. K. T. Z. Z. M. M. S. S. A. N. J., 2008. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*, Aug(34(8)), pp. 962-969.
18. Courtois G., S. A., 2006. NF-kappaB-related genetic diseases. *Cell Differ.*, Volume 13, pp. 843-851.
19. Cronin R.J., O. L. R. D., 1994. Mandibular implants and the growing patient. *Int. J. Oral Maxillofac Implant*, Issue 9, pp. 55-62.
20. Cui C.Y., D. M. T. T. H. A. T. T. H. K. K. M. S. A. S. D., 2002. EDA targets revealed by skin gene expression profiles of wild-type, Tabby and Tabby EDA-A1 transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.*, Issue 11, pp. 1763-1773.
21. Cui C.Y., K. M. E. D. G. S. P. Y. N. S. S. D., 2007. Limphotoxin-beta regulates periderm differentiation during embryonic skin development. *Hum. Mol. Genet.*, Issue 16, pp. 2583-2590.
22. Cui C.Y., S. D., 2006. EDA signaling and skin appendage development. *Cell Cycle*, Issue 5, pp. 21-27.

23. Cui C-Y., S. J. S. D. C. C., 2005. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia disruption yields a mouse model for ocular surface disease and resultant blindness. *Am. J. Pathol.*, Issue 167, pp. 89-95.
24. Daniel E., M. E. S. V. M. W. J., 2002. Ectodermal dysplasia: otolaryngologic manifestations and management. *Laryngoscope*, Jun(112(6)), pp. 262-267.
25. Dodd A., C. P. W. L. L. D., 2000. Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Hum. Mol. Genet.*, Oct(9(16)), pp. 2443-2449.
26. Drogemuller C., D. O. L. T., 2003. 96 X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia (ED1) in men, mice, and cattle. *Genet Sel. Evol.*, Issue 35, pp. 137-145.
27. Dugoff L., T. G. H. J., 2001. First trimester prenatal diagnosis of chondroectodermal dysplasia (Elli-van Creveld Syndrome) with ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 17(1)(Jan), pp. 86-88.
28. Durmowicz M.C., C. C. S. D., 2002. The EDA gene is a target of, but does not regulate Wnt signaling. *Gene*, Volume 285, pp. 203-211.
29. Freire-Maia N., P. M., 1984. Ectodermal dysplasias: a clinical and genetic study. *Alan R. Liss.*, Volume New York.
30. Fusco F., P. A. B. E. G. A. P. M. L. M. D. M. R. S. B. C. B. J. M. A. M. M. S. A. U. M., 2008 . Alterations of the IKBKG locus and diseases: an Update and report of 13 novel mutations. *Hum. Mutat.*, Issue 29, pp. 595-604.
31. Gaide O., S. P., 2003. Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant EDA. *Nat Med*, May(9(5)), pp. 614-618.
32. Giavaresi G., C. R. F. M. S. E., 2008. Effect of a multiphasic anodic spark deposition coating on the improvement of implant osseointegration in the osteopenic trabecular bone of sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants*, Jul-Aug(23(4)), pp. 659-668.
33. Glavina D., M. M. L.-D. O. J. H., 2001. Hypohidrotic ectodermal dysplasia: dental features and carriers detection. *Coll Antropol*, June(25(1)), pp. 303-310.
34. Grecchi F., Z. I. P. A. m. G. P. A. C. F., 2009. One-step oral rehabilitation by means of implants'insertion, Le Fort I, grafts, and immediate loading. *J Craniofac Surg*, Nov(20(6)), pp. 2205-2210.

35. Gronthos S., M. M. B. J. R. P. S. S., 2000. Postnatal hum dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA*, Dec(97(25)), pp. 13625-13630.
36. Gros C.L., C. F. O. F. M. M. S. M., 2010. Quantification of taurodontism: interests in the early diagnosis of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Oral Dis*, Apr(16(3)), pp. 292-298.
37. Guckes A.D., B. J. M. G. R. S. C. L., 1991. Using Endosseous dental implants for patients with ectodermal dysplasia. *JADA*, Issue 122, pp. 59-62.
38. Guerrero-Fernandez J., G. V. J. G. D. M., 2003. Hyperpyrexia as guiding sign for the early diagnosis of x-linked hypohidrotic ectodermal dyplasia. *An Pediatr*, Jul(59(1)), pp. 122-123.
39. Haiden M.S., G. S., 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.*, Volume 18, pp. 2195-1224.
40. Hammewrschmidt B., S. T., 2007. Localization of Shh expression by Wnt and Eda affects axial polarity and shape of hairs. *Dev. Biol.*, May(305(1)), pp. 246-261.
41. Hickey A.J., V. T. J., 2001. Prosthetic tratment for patients with ecodermal dysplasia. *J. Prosthet Dent*, Oct(86(4)), pp. 364-368.
42. Itin PH., F. S., 2004. Ectodermal dysplasias. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.*, Volume 131 C, pp. 45-51.
43. Jhkson E.L., R. M. G. A., 2002. Analysis of craniofacial development in children with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J of Med Gen*, Issue 112, pp. 327-334.
44. Jonhson E.L., R. M. G. A.-D. B. L. P. C. W. J., 2002. Analysis of craniofacial development in children with hupohidrotic ectodermal dysplasia.. *Am. J. Med. Genet.*, Nov.(112(4)), pp. 327-334.
45. Kawaguchi H., H. A. H. N. I. T. H. H. S. H. T. T. K. Y. K. H., 2004. Enhancement of periodontal tissue regenaeration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodont*, Sep(75(9)), pp. 1281-1287.
46. Koppinen p., P. J. L. J. T. i. M. M., 2001. Signalling and subcellular localization of TNF receptor Edar. *Exp Cell Res*, October 1(269(2)), pp. 180-192.
47. Larmour C.J., M. P. T. B., 2005. Hupodontia a retrospective review of prevalence and etiology. *Quint Int*, Issue 36, pp. 263-270.

48. Levrero M., D. L. V. C. A. G. J. W. J. M. G., 2000. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell. Sci.*, May(113), pp. 1661-1670.
49. Lexner M.O., e. a., 2007. Anthropometric and cephalometric measurements in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Orthod Craniofacial Res*, Issue 10, pp. 203-207.
50. Lexner M.O., e. a., 2007. Anthropometric and cephalometric measurements in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Orthod Craniofacial Res*, Volume 10, pp. 203-207.
51. Li Z.Y., C. L. L. L. Y. L. S. T. W., 2007. Odontogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Oral Maxillofacial Surg*, Mar(65(3)), pp. 494-500.
52. Lo Muzio L., B. P. C. F. R. F. S. C. C. E. R. G., 2005. Prosthetic rehabilitation of a child affected from anhidrotic ectodermal dysplasia: a case report. *J. Contemp Dent Pract*, Issue 3, pp. 120-126.
53. Lo Y.M., C. N. C. P. R. V. S. I. R. C. W. J., 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, Aug(16), pp. 485-487.
54. Lopez-Granados E., K. J. K. M. L. H. J. N. M. C. Q. R. G. E. J. A., 2008. A novel mutation in NFKB1/IKBA results in a degradation-resistant N-truncated protein and is associated with ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Hum. Mutat.*, Jun(29(6)), pp. 861-868.
55. Mancini A-J-, L. L. U. G., 2008. X-Linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by NEMO mutation: early recognition and diagnosis. *Arch. Dermatol.*, Volume 44, pp. 342-346.
56. Masse J.F., P. R., 1994. Ectodermal Dysplasia. *Arch. Dis. Child.*, Volume 71, pp. 1-2.
57. Matalova E., T. A. S. P., 2004. Death in the life of a tooth. *J. Dent. Res.*, Volume 83, pp. 11-16.
58. Mauldin E.A., G. O. S. P. C. M., 2009. Neonatal treatment with recombinant ectodysplasin prevents respiratory disease in dogs with ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A*, Sep(149A(9)), pp. 2045-2049.
59. McGrath JA., H. p. C. A. N. M. J. M. J. A. G. D.-H. P. L. B. L. I. H. J. E. R., 1999. Skin fragility and hypohidrotic ectodermal dysplasia resulting from ablation of plakophilin 1. *Br. J. Dermatol*, Volume Feb 140(2), pp. 297-307.

60. Mikkola M.L., 2009. Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A.*, Sep.(149A(9)), pp. 2031-2036.
61. Mikkola M.L., M. S., 2006. The mammary bud as a skin appendage: unique and shared aspects of development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, Oct.(11(3-4)), pp. 187-203.
62. Miura M., G. S. Z. M. L. B. F. L. R. P. S. S., 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*, May(100(10)), pp. 5807-5812.
63. Montanari M., C. M. B. F. P. G., 2012. Oral rehabilitation of children with ectodermal dysplasia. *BMJ Case Report*.
64. Motil KJ., F. T. F. J. S. R. F. T. O. U. S. V., 2005. Growth characteristics of children with ectodermal dysplasia syndromes. *Pediatrics*, Volume Aug; 116(2), pp. 229-234.
65. Naito A., Y. H. N. E. S. M. A. S. Y. T. N. S. I. J., 2002. TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, Volume 99, pp. 8766-8771.
66. Neuhass S.C., S. L. S. A. Z. F. S. D. M. J. S. D. D. W., 1996. Mutations affecting craniofacial development in zebrafish. *Development*, Dec(123), pp. 357-367.
67. Nowak, 1988. Dental treatment for patients with ectodermal dysplasias. *Brth defects*, Issue 24, p. 243-252.
68. Ohazama A., M. S. M. I. S. P., 2004. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res*, Jul(83(7)), pp. 518-522.
69. Ota Y., M. Y. D. M. G. E. U. Y. E. K. T. K., 2008. Management of evaporative dry eye in ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome. *Optom Vis Sci*, Issue 85(9), pp. 795-801.
70. Paakkonen K., C. S. N. G. O. L. P. M. K. J. S. A., 2001. The mutation spectrum of the EDA gene in X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Hum. Mutat.*, Volume 17, p. 349.
71. Pappaccio G., G. A. d. R. G. M. P. G. M. D. D. R. A. C. F. L. G., 2006. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*, Aug(208(2)), pp. 319-325.
72. Park S.E., D. S. J. W. H. I.-N. S., 2007. Optical phenomenon of peri-implant soft tissue. Part I. Spectrophotometric assessment of natural tooth gingiva and peri-implant mucosa. *Clin Oral Implant Res*, Oct(18(5)), pp. 569-574.

73. Peng L., Y. L. Z. X., 2009. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci*, Mar(1(1)), pp. 6-12.
74. Pispa J., T. I., 2003. mechanisms of ectodermal organogenesis. *De. Biol.*, Volume 262, pp. 195-205.
75. Poon L.L., L. T. L. T. C. K. L. Y., 2002. Differential DNA methylation between fetus and mother as strategy for detecting fetal DNA In maternal plasma. *Clin Chem*, Jan(48(!)), pp. 195-205.
76. Prager T., F. C. M. R., 2006. Dental findings in patients with ectodermal dysplasia. *J Oralf Orthop*, Issue 67, pp. 347-355.
77. Prager T., F. C. M. R., 2006. Dental findings in patients with Ectodermal Dysplasia. *J. Orofac Orthop*, Volume 67, pp. 347-355.
78. Priolo M., 2009. Ectodermal dysplasia: an overview and update of clinical and molecular-functional mechanisms. *Am.J.Med.Gen.*, Volume 149 Part. A, pp. 2003-2013.
79. Priolo M., L. C., 2001. Ectodermal dysplasias: a new clinical-genetic classification. *J. Med. Genet.*, Volume 38, pp. 579-585.
80. Pummila M., F. I. J. R. J. M. L. J. S. P. T. I. M. M., 2007. Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development*, 117-125(134).
81. Richard, G., 2001. Human connexin disorders oh the skin. *Cell Commun. Adhes.*, Volume 8(4-6), pp. 401-407.
82. Rinne T., B. H. v. B. H., 2007. p63-associated disorders. *Cell Cycle*, Feb(6(3)), pp. 262-268.
83. Rodriguez N., E. D. G.-V. E. B. J., 2002. Bilateral panuveitis in a child with ectodermal dysplasia: further characterization. *Am J Ophthalm*, Sept(134(3)), pp. 443-445.
84. Rouse C., S. E. B. W. N. G., 2004. Hair ans sweat glands in families with hupohidrotic ectodermal dysplasia: further characterization. *Arch. Dermatol.*, Jul(140(7)), pp. 850-855.
85. Saksena S.S., B. D., 1990. Facial morphometrics in the identification of gene carriers of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia.. *Am. J. Med. Genet.* , Jan(35(1)), pp. 105-114.

86. Salinas C.F., M. G., 1988. Rapp-Hodgkin syndrome: observations on ten cases and characteristic hair changes (pili canaliculi).. *Birth. Defects Orig. Artic Ser*, Issue 24(2), pp. 149-168.
87. Salinas CF., J. R. W. J. D. G. J. F. M., 2009. International conference on ectodermal dysplasias classification: conference report.. *Am. J. Med. Genet. A.*, Volume Sep 149(A), pp. 1958-1969.
88. Sarvan I., N. S. N. E., 2000. Hypohidrotic ectodermal dysplasia: an unusual presentation and management in a 11-year-old Xhosa Boy. *SADJ*, Issue 55, pp. 34-37.
89. Saw V.P., D. J. S. C. Z. D., 2008. Cicatrising conjunctivitis with anti-basement membrane antibodies in ectodermal dysplasia. *Br. J. Ophthalmol*, Oct(92(10)), pp. 1403-1410.
90. Segurado Rodriguez M.A., O. D. f. F.-J.-, C. N. P. e. a., 2002. Hypohidrotic ectodermal dysplasia: a cause of fever of unknown origin.. *An Esp pediatr*, Volume 56, pp. 253-7.
91. Sekizawa A., P. T. M. R. K. K. O. S. F. A. S. H. O. T., 2007. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood.. *J. Obstet Gyneocol Res*, Dec.(33(6)), pp. 747-764.
92. Shimomura Y., W. M. S. L. C. A., 2008. P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development*, Feb(135(4)), pp. 743-753.
93. Shindo M., C. P., 2004. The ectodermal dysplasia receptor represses the Lef-1/beta-catenindependent transcription independent of NF-kappaB activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Issue 315, pp. 73-78.
94. Skieller V., B. A. L.-H. T., 1984. Prediction of mandibular growth rotation evaluated from a longitudinal implant sample.. *Journal of Orthodontics*, Issue 42, pp. 400-411.
95. Smahi A., C. G. R. S. D. R. B. C. M. A. C. J. I. A., 2002. The NF-kappaB signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum. Mol. Genet.*, Oct.(11(20)), pp. 2371-2375.
96. Srivastava A.K., D. M. H. A. H. J. O. L. D. D. C. C. S. D., 2001. Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice. *Hum Mol Genet*, Issue 10, pp. 2973-2981.

97. Tanikawa C., R. C. K. V. N. Y. M. K., 2010. Crosstalk of EDA-A2/XEDAR in the p53 signaling pathway. *Mol. Cancer Res.*, Jun(8(6)), pp. 855-863.
98. Tomar G.B., S. R. G. N. B. A. P. S. J. H. M. G. W. M., 2010. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun*, Mar(393(3)), pp. 377-383.
99. Van der Hout A.H., O. G. V. A. V. J. M. B. R. P. B. H. V. Y. V. E. A., 2008. Mutation screening of the Ectoysplasin-A receptor gene EDAR in Hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Hum Genet*, Jun(16(6)), pp. 673-679.
100. Venkat-Raman N., S. N. M. K. C. J. H. C., 2005. Increased first-trimester fetal nuchal translucency thickness in association with condroectodermal dysplasia (Ellis-Van Creveld Syndrome). *Ultrasound Obstet Gynecol*, Apr(25(4)), pp. 412-414.
101. Visinoni AF., L.-C. T. P. N. C. F.-M. E., 2009. Ectodermal displasias: clinical and molecular review.. *Am. J. Med. Genet.*, Volume 149 Part A, pp. 1980-2002.
102. Volponi A.A., P. T. S. P., 2010. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trend Cell Biol*, Dec(20(12)), pp. 715-722.
103. Weston W.L., H. W., 2011. Treatment of atopic dermatitis (eczema). *Source Update*, April(19).
104. Wright J.T., H. S. S. D. D. B. U. D. L. H., 2008. DLX3 c.561\_562delCT mutation causes attenuated phenotype of tricho-dento-osseus syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.*, Feb.(143(3)), pp. 343-349.
105. Wright J.T., G. D. R. M., 2009. Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia. *Genes Reviews*.
106. Yavuz I., B. Z. U. R. D. T. e. a., 2006. Ectodermal Dysplasia: retrospective study of fifteen cases. *Arch Med Res*, Volume 37, pp. 403-409.
107. Yelick P.C., S. T., 2002. molecular dissection of craniofacial development using zebrafish. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, Issue 13(4), pp. 308-322.
108. Zhang J., C. R. B. A. Z. G., 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J. Genet. Genomics*, Mar(38(3)), pp. 95-109.

