



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTÀ DI MEDICINA E ODONTOIATRIA

*Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e
Maxillo Facciali*

**DOTTORATO DI RICERCA IN
TECNOLOGIE INNOVATIVE NELLE
MALATTIE DELLO SCHELETRO, DELLA
CUTE E DEL DISTRETTO ORO-CRANIO-
FACCIALE**

**STUDIO GENETICO E MOLECOLARE SU PAZIENTI CON
ANOMALIE DENTARIE**

DOTTORANDO

Dott.ssa Gabriella Padalino

TUTOR

Prof.ssa Ersilia Barbato

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
2. BACKGROUND.....	6
2.1 Le anomalie dentali.....	6
2.1.1 Le agenesie degli elementi dentari	6
2.2 L'inclusione del canino mascellare	9
3. DEFINIZIONE DI miRNA	11
3.1 Ruolo dei microRNA nell'odontogenesi e nelle anomalie dentali.....	14
4. SCOPO DEL LAVORO	16
5. MATERIALI E METODI.....	17
5.1 Disegno dello studio	17
5.2 Campione e raccolta dati.....	17
5.3 Selezione dei miRNA associati alle anomalie di eruzione degli elementi dentali.....	19
5.4 Raccolta del DNA genomico da saliva	21
5.5 Estrazione del DNA genomico da saliva.....	23
5.6 Amplificazione e sequenziamento dei miRNA	24
5.7 Numerosità campionaria ed analisi statistica	26
6. RISULTATI.....	27
6.1 Risultati clinici.....	27
6.1.1 Caratteristiche dentali	27
6.1.2 Caratteristiche cefalometriche	27
6.1.3 Analisi su Cone Beam Computed Tomography	27
6.2 Risultati molecolari.....	29
6.3 Analisi statistica delle correlazioni	30
7. DISCUSSIONE	32

8. CONCLUSIONE	37
9. BIBLIOGRAFIA	38

1. INTRODUZIONE

L'influenza differenziale della genetica e dei fattori ambientali nell'eziologia delle malocclusioni è da sempre elemento di discussione. I meccanismi molecolari che regolano la morfogenesi embriologica cranio-facciale sono stati solo in parte caratterizzati e il loro effetto è modulato dalla componente ambientale, in un processo multifattoriale e progressivo nel tempo.

Le anomalie cranio-facciali e dento-facciali sono il risultato di alterazioni dei processi embriogenetici, causate da alterazioni del DNA e/o dall'espressione sia di geni codificanti che di elementi non-codificanti¹.

Poiché la formazione degli elementi dentari è un processo delicato e dinamico, le cause e le manifestazioni delle anomalie dentali sono molto complesse. Lo sviluppo degli elementi dentari è infatti un processo costituito da fasi di formazione ed eruzione, che prevede una serie reciproca di segnali induttivi tra l'epitelio e il mesenchima derivato dalla cresta neurale, riassorbimento dell'osso alveolare e formazione regolata dal follicolo dentale².

Durante queste fasi, la costante interazione dei segnali induttivi tra l'epitelio e il mesenchima danno origine a parti anatomiche e funzionali distinte del dente. Ogni strato di tessuto fornisce istruzioni per differenziarsi in modo specifico portando alla formazione di strutture altamente specializzate, quali incisivi, canini, premolari e molari, ciascuno dei quali deriva da diverse parti dell'epitelio orale.

Diversi studi volti a caratterizzare le basi molecolari dello sviluppo degli elementi dentari hanno individuato una serie di geni che agiscono nelle fasi specifiche della formazione e dell'eruzione dei denti e ne regolano il processo di modellazione e differenziazione.

La maggior parte dei geni coinvolti nello sviluppo degli elementi dentari comprende ligandi, recettori, fattori di trascrizione, cofattori e molecole di segnalazione intracellulare. Un equilibrio finemente sintonizzato tra i ligandi di segnalazione, i loro recettori, gli inibitori e i fattori di trascrizione regola i diversi aspetti dell'odontogenesi, tra cui la dimensione, il numero e la forma. Pertanto, alterazioni di questi percorsi portano a cambiamenti fondamentali nell'odontogenesi³ e alla comparsa di anomalie dentali. Mentre è stato chiarito il ruolo di alcuni geni nello sviluppo degli elementi dentari, così come gli esiti delle loro mutazioni nell'odontogenesi, alcuni aspetti legati alle basi molecolari delle fasi morfologiche di sviluppo dell'odontogenesi sono ancora sotto indagine¹.

L'importanza della comprensione delle basi biologiche e molecolari delle anomalie dentali è fortemente legata alle prospettive future in campo ortodontico al fine di garantire al clinico un miglioramento diagnostico, grazie alla rilevazione di fattori predittivi, e prognostico,

improntato sui concetti di ortodonzia personalizzata e sull'integrazione dei dati provenienti dalle scienze omiche e dal supporto dell'intelligenza artificiale.

Infatti la possibilità di poter disporre di fattori predittivi nei casi di anomalie dentarie, come l'inclusione del canino mascellare, permetterebbe al clinico di effettuare una diagnosi precoce, e di poter attuare un piano di trattamento il più possibile tempestivo e personalizzato, al fine di garantire una corretta occlusione tra le arcate dentarie.

2. BACKGROUND

2.1 LE ANOMALIE DENTALI

Si definisce anomalia dentaria un'alterazione dell'aspetto esterno, della struttura interna o della topografia di uno o più elementi dentari decidui o permanenti, derivante da un disturbo che può essere genetico, congenito o acquisito.

I disturbi della fase di sviluppo dei denti sono permanenti poiché i tessuti dentari, al contrario del tessuto osseo, non possiedono la capacità di rimodellarsi.

L'eziopatogenesi di un'anomalia dentaria dipende dal momento di sviluppo dell'elemento dentario in cui interviene la noxa patogena; ad esempio, se essa agisce nella fase della proliferazione iniziale, la conseguenza sarà un'alterazione nel numero degli ispessimenti ectodermici, quindi nel numero di denti che ne deriveranno. Pertanto, la mancanza di uno o più denti deriva da una carente proliferazione della lamina dentale con diminuzione del numero delle bozze dentali, mentre la presenza di un numero di denti maggiore deriva da un'eccessiva proliferazione della lamina stessa.

Se lo stimolo patogeno interferisce con la fase di differenziazione istologica e morfologica, invece, si avranno anomalie connesse con l'aspetto futuro dei tessuti differenziati, come le anomalie di volume e di forma.

Talvolta le anomalie possono essere associate tra loro: ad esempio, la presenza di anomalie di volume di alcuni denti, che si presentano più piccoli della norma, è di frequente riscontro in pazienti con agenesia.

2.1.1 Le agenesie degli elementi dentari

L'agenesia degli elementi dentari è una delle anomalie dentali più comuni, con una prevalenza, esclusi i terzi molari, che va tra lo 0,15% ed il 16,2%⁴. Tre termini diversi, ipodonzia, oligodonzia e anodonzia, sono generalmente utilizzati per descrivere tale fenomeno, in relazione al numero degli elementi dentari mancanti:

-ipodonzia: presenza di più della metà del numero fisiologico dei denti (decidui o permanenti).

-oligodonzia: presenza di meno della metà del numero fisiologico dei denti (decidui o permanenti).

-anodonzia: assenza di tutti i denti (decidui o permanenti) associata a grande deficit strutturale dei mascellari.

Numerosi studi hanno dimostrato l'associazione delle anomalie dentali con la presenza di agenesie dentarie. Baccetti⁵ ha dimostrato l'associazione tra riduzione delle dimensioni della corona e l'ipodonzia. Ahmad e coll.⁶ hanno riferito l'associazione dell'ipodonzia con anomalie dentarie come malformazioni, ipoplasie dello smalto, inclusione degli elementi dentari, ipocalcificazione e dentinogenesi imperfetta. Altre anomalie della dentizione, come il malposizionamento dei canini e l'eruzione ectopica dei primi molari permanenti, sembrano essere associate all'ipodonzia^{7,8}.

Nella maggior parte dei casi familiari di ipodonzia, con o senza associazione con altre anomalie dentarie, la modalità di trasmissione è autosomica dominante⁹. Esistono forme di agenesia dentali sporadiche e familiari; quest'ultima si presenta in forma isolata (non sindromica) o sindromica.

La forma sindromica ha un impatto maggiore sulla qualità della vita dei pazienti a causa dei disturbi di altri organi; nonostante le agenesie dentali siano causate da fattori ereditari, ambientali ed evolutivi, le forme sindromiche sono principalmente influenzate da fattori ereditari, tra cui la mutazione genetica e l'anomalia cromosomica¹⁰.

La diversità dell'eziologia crea vari modelli di malattia e le mutazioni nello stesso gene possono provocare agenesia sia isolata che sindromica¹¹.

Diversi studi hanno dimostrato che lo sviluppo dentale è sotto stretto controllo genetico ed influenza la forma, la posizione, il numero e le dimensioni degli elementi dentari¹².

Studi familiari mostrano che, l'ipodonzia e l'oligodonzia, come forma isolata, possono essere ereditate come tratto autosomico dominante con penetranza incompleta ed espressività variabile¹³, e sono correlate a mutazioni di geni appartenenti a vie di segnalazione coinvolte nello sviluppo e nel differenziamento cellulare, come BMP, FGF, SHH e WNT.

I recenti progressi nella ricerca genetica hanno reso possibile l'identificazione ed il sequenziamento dei geni coinvolti nella morfogenesi dentale e i meccanismi molecolari che determinano l'agenesia. Diversi sono i geni implicati nelle agenesie, ma le mutazioni che si verificano a carico di MSX1, PAX9, AXIN2 e EDA sono quelle maggiormente coinvolte nell'eziologia delle agenesie non sindromiche¹⁴.

-MSX1: Il gene MSX1 è co-espresso nel mesenchima insieme al PAX9; entrambi i geni codificano per la trascrizione dei fattori che giocano un ruolo importante nel mantenimento dell'espressione di BMP4 nel mesenchima. La corretta interazione tra questi tre fattori è essenziale per ottenere la progressione dell'odontogenesi dalla fase a gemma alla fase a cappuccio. MSX1 e MSX2 sono geni homeobox, ovvero geni che codificano per fattori di trascrizione che possono controllare l'espressione di altri geni. Questi geni codificano per

sessanta proteine in grado di legare specifiche sequenze di DNA. La proteina Msx1 inibisce la trascrizione del gene bersaglio attraverso la sua interazione con altri fattori di trascrizione come il DLX (DLX2 e DLX5), Lhx2, PAX3, PAX9, e anche con altri fattori di trascrizione complessi nel nucleo, tra cui il " TATA box ". La prima mutazione del gene MSX1 associata ad agenesia è stata descritta da Vastardis e coll. nel 1996¹⁵. Egli ha analizzato una famiglia affetta da una grave forma di oligodontia a trasmissione autosomica dominante che coinvolge i II premolari ed i III molari, rilevando la presenza di una mutazione situata sul cromosoma 4p sul locus MSX1. Questa mutazione missenso (sostituzione di una singola base del DNA con modifica dell'aminoacido codificato) determina la sostituzione di una arginina con una prolina che dà origine ad una proteina che possiede una stabilità termica inferiore a quella naturale. Gli esperimenti condotti da Hu e coll.¹⁶ hanno mostrato che la proteina mutata non possiede la capacità di interagire con il DNA o con altre proteine, e perde la sua funzione inibitoria sulla trascrizione. Pawlowska e coll. in uno studio del 2009¹⁷ hanno suggerito che due polimorfismi in due regioni non tradotte di MSX1 (rs8670 e rs12532), potrebbero essere coinvolti nell'agenesia dentaria di tipo sporadico e familiare. Questa evidenza supporta l'ipotesi che le regioni diverse del dominio legante il DNA possono essere correlate allo sviluppo degli elementi dentari.

-PAX9: il gene PAX9 è localizzato sul cromosoma 14 e, insieme al gene MSX1, è responsabile delle agenesie non sindromiche. Nakatomi e coll. hanno fornito prove¹⁸ dell'interazione di questi due geni nello sviluppo cranio-facciale e degli incisivi inferiori. I topi che presentano la mutazione omozigote del gene PAX9 muoiono poco dopo la nascita a causa delle numerose anomalie cranio-facciali e degli arti. Infatti, i topi mutanti presentano uno sviluppo degli elementi dentari che termina con lo stadio della gemma ed una palatoschisi secondaria. Al contrario, i topi con mutazioni eterozigote, non presentano anomalie evidenti¹⁹.

-AXIN2: il gene AXIN2 è localizzato nel cromosoma 17 e la sua mutazione sembrerebbe essere implicata, oltre che nelle agenesie, anche nel cancro del colon e del fegato. Lammi e coll.²⁰ hanno osservato quattro generazioni di una famiglia finlandese colpita da una forma di oligodontia autosomica dominante associata a cancro colon-rettale. La maggior parte dei membri della famiglia presentava l'agenesia di quasi o di tutti gli incisivi laterali superiori ed inferiori, dei premolari, dei molari e, in tre casi, anche dei canini.

-EDA: Le mutazioni nel gene EDA²¹ determinano la displasia ectodermica, difetto genetico dello sviluppo che colpisce le strutture ectodermiche (cute, capelli, denti e ghiandole sudoripare), con riduzione del numero degli elementi dentari. Tale sindrome comprende tre

sottotipi, non differenziabili clinicamente: sindrome di Christ-Siemens-Touraine (legata all'X), autosomica recessiva ed autosomica dominante. Il gene EDA occupa un segmento del braccio lungo del Cromosoma X (Xq12-13.1) e codifica per una proteina appartenente alla famiglia dei ligandi del fattore di necrosi tumorale (TNF). Diversi studi hanno riportato casi di ipodontia sporadica in famiglie colpite da mutazioni del gene^{22,23}. Il sesso maschile sembra essere maggiormente coinvolto, e tale mutazione sporadica si manifesta con la mancanza di elementi dentari ma senza gli altri sintomi propri della displasia ectodermica. Gli elementi dentari più comunemente mancanti sono i premolari ed i molari.

Negli ultimi 10 anni la letteratura scientifica ha ampiamente indagato l'incidenza delle agenesie di incisivi laterali (2,2%), secondi premolari (3,4%) e terzi molari (10-25%)^{9,24}.

Per quanto, invece, concerne le agenesie dei canini, in letteratura sono stati riportati alcuni casi di ricorrenza familiare di tale anomalia dentaria e casi sporadici²⁵⁻²⁷.

L'incidenza dell'agenesia singola del canino è maggiore dell'agenesia multipla ed è spesso associata ad altri tipi di anomalie dentali (agenesia di altri denti, microdonzia, eruzione ritardata dei denti permanenti, denti soprannumerari)²⁵.

E' stato riportato che l'agenesia monolaterale del canino permanente colpisce più frequentemente il lato sinistro²⁸ rispetto al destro; inoltre, la possibilità che ciò avvenga nell'arcata superiore è maggiore rispetto a quella inferiore²⁵; il rapporto uomo-donna risulta essere di 1:2.

2.2 L'inclusione del canino mascellare

Un'altra condizione frequente nella pratica ortodontica quotidiana, ma sulla quale ancora si conosce poco in merito alla caratterizzazione genetica dell'anomalia, è l'inclusione dei canini mascellari (1-3% della popolazione)²⁷, la quale si manifesta principalmente in individui di sesso femminile (rapporto uomo:donna di 1:2)²⁹ e principalmente in forma monolaterale³⁰.

Per quanto riguarda la sede, le inclusioni palatali sono le più frequenti. Peck e coll. hanno riportato un rapporto di 3:1 delle inclusioni palatali rispetto a quelle vestibolari³¹; Guarnieri e coll. hanno riferito che il 72% delle inclusioni si verifica in sede palatale, seguita dal 19% nell'area vestibolare e dal 9% in cresta³².

Numerosi sono i fattori eziologici generali o locali che possono determinare l'inclusione del canino superiore. In una revisione della letteratura del 2015³³, Becker ha individuato cinque possibili cause responsabili dell'inclusione del canino mascellare tra cui la presenza di

ostruzioni e patologie locali, la presenza di disturbi durante il tragitto eruttivo, la teoria della guida e la teoria genetica.

Secondo la teoria della guida, la superficie distale dell'incisivo laterale superiore funge da guida allo sviluppo del canino mascellare nella sua corretta posizione. Per tale motivo, un eccesso di spazio, dovuto alla mancanza o alla presenza di un incisivo laterale di ridotte dimensioni, può essere causa di inclusione^{34,35}.

Gli incisivi laterali possono andare incontro ad uno sviluppo variabile, rappresentando gli elementi dentari tra i più frequentemente agenesici. Possono inoltre presentare anomalie di forma e dimensione, mostrando una morfologia coronale conoide o di dimensioni ridotte (rispettivamente incisivi laterali conoidi e microdontici) a cui si associa spesso una radice formata solo per un terzo. Tali anomalie sembrerebbero rappresentare l'espressione meno severa dell'agenesia stessa.

All'età di 9 anni, il canino si trova normalmente nella parte distale della radice dell'incisivo laterale. Se l'incisivo laterale è agenesico, in ritardo eruttivo, o presenta un'anomalia di forma o dimensione, con la radice ancora in via di sviluppo, non potrà fungere da guida per l'eruzione del canino mascellare, che verrà spostato verso il basso in direzione palatale³⁶.

La teoria genetica si basa sull'osservazione che l'inclusione palatale del canino mascellare raramente si presenta come un sintomo isolato, ma è accompagnata da altre anomalie dentali di origine genetica come l'ipoplasia o l'agenesia dell'incisivo laterale, l'agenesia dei premolari, l'infraocclusione dei molari decidui o l'ipoplasia dello smalto^{37,38}.

La teoria genetica individua quindi, alla base del fenomeno di inclusione palatale del canino mascellare, un substrato genetico che controlla l'espressione dell'anomalia di eruzione del canino e di altre anomalie dentali che si associano ad essa³⁹.

La modalità di trasmissione è poligenica, secondo un'ereditarietà di tipo autosomico dominante, oppure legata al sesso³¹.

Solamente l'inclusione palatale del canino mascellare sembrerebbe avere un substrato genetico: al contrario l'inclusione vestibolare deriva da un deficit di spazio in arcata, che il più delle volte determina l'eruzione ectopica del canino.

Recentemente, grazie alle metodiche di Next Generation Sequencing (NGS), sono stati identificati diversi geni che, quando mutati, possono concorrere a determinare questo fenotipo⁴⁰⁻⁴⁴, ed in particolare, è stata riscontrata la presenza di varianti nei geni che codificano per proteine con un ruolo nella via di segnalazione WNT in soggetti che mostravano un fenotipo caratterizzato da inclusione del canino mascellare⁴⁰.

Sono state inoltre identificate alcune varianti a singolo nucleotide in porzioni non-codificanti del genoma, in particolare in sequenze di microRNA, piccoli RNA non-codificanti della lunghezza di circa 22 nucleotidi che, mediante appaiamento alle regioni 3'UTR dei trascritti, regolano l'espressione dei geni, agendo da modificatori del genotipo^{45,46}.

3. Definizione di miRNA

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole endogene di RNA non codificante a singolo filamento, che non codificano per nessuna proteina, ma con un ruolo nei processi di regolazione post-trascrizionale dei geni codificanti. Funzionano infatti da regolazione dell'espressione genica mediante legame complementare imperfetto dei filamenti del messaggero bersaglio (mRNA) e quindi, il loro squilibrio può facilmente servire come biomarcatore per diversi processi patologici.

Sono molecole in grado di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, legandosi alla regione 3'UTR (regione non tradotta), alla regione codificante ORF o alla regione 5'UTR del mRNA bersaglio^{47,48}.

La prima fase della sintesi dei miRNA consiste nella trascrizione di una breve sequenza genomica da parte di una RNA polimerasi II. Da tale trascritto originano i microRNA primari (pri-miRNA), che vengono riconosciuti da uno specifico enzima e trasformati in miRNA immaturi (pre-miRNA). Il pre-miRNA è trasportato nel citoplasma e riconosciuto da un altro enzima, che taglia la sequenza nucleotidica in più punti completando la maturazione dei miRNA nella forma finale di RNA a doppio filamento di circa 20-25 nucleotidi. A questo livello i miRNA possono andare in contro a due destini: se sono parzialmente complementari ai mRNA ne bloccano la traduzione in proteine, se invece la complementarità è perfetta procedono alla loro degradazione riducendo la quantità di miRNA e della proteina prodotta (Fig. 1).

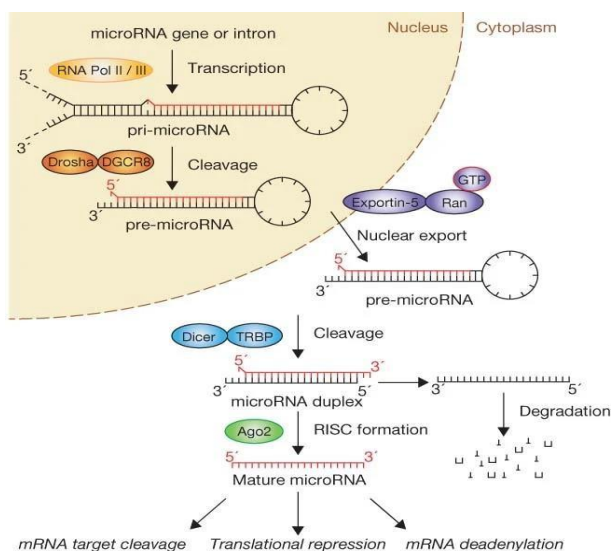


Fig. 1: Sintesi e maturazione dei miRNA⁴⁹.

La presenza, talvolta, di una complementarità non perfetta tra miRNA e mRNA target determina la presenza di miRNA in numero inferiore rispetto al numero degli mRNA e delle proteine, per cui un unico miRNA può regolare centinaia di messaggeri e, viceversa, un singolo mRNA può essere regolato da diversi miRNA⁵⁰.

L'elevato numero di geni bersaglio suggerisce che i miRNA siano coinvolti nel controllo di diversi processi biologici quali la proliferazione, la differenziazione, la migrazione, l'apoptosi, il controllo del ciclo cellulare, la repressione della replicazione del virus HBV, la regolazione del colesterolo e del metabolismo degli acidi grassi, il controllo della risposta immune innata e adattativa, e l'autofagia.

Poiché i microRNA controllano diversi processi fisiologici, le aberrazioni nella loro espressione sono correlate ad una varietà di patologie che vanno dai tumori alle malattie autoimmuni.

I miRNA possono comportarsi da oncosoppressori o da oncogeni, a seconda del mRNA bersaglio con cui si legano⁵¹: possono ridurre l'espressione di geni oncosoppressori, comportandosi come oncogeni, o agire su trascritti di mRNA oncogenici, comportandosi come oncosoppressori.

Durante la genesi del cancro, alcuni miRNA sono sovraregolati e altri sono sottoregolati, quindi qualsiasi cambiamento nell'espressione dei miRNA può causare la soppressione del tumore o agire come agente cancerogeno (Fig. 2)⁵².

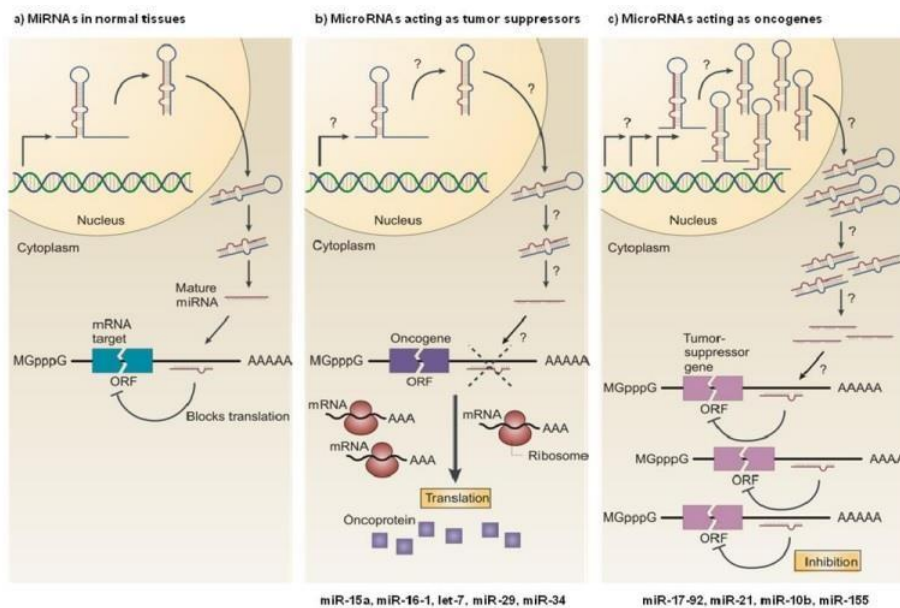


Fig 2: miRNA soppressori tumorali e miRNA oncogeni. a) Nel tessuto normale l'espressione dei miRNA influenza la crescita, la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare. b) La riduzione e/o la perdita di un miRNA che funziona da soppressore tumorale determina lo sviluppo del tumore mediante l'aumento di espressione della sua oncoproteina bersaglio. c) L'amplificazione di un miRNA oncogeno determina ridotti livelli di espressione del suo gene oncosoppressore bersaglio, permettendo alla cellula di acquisire caratteristiche neoplastiche⁵³.

I miRNA circolanti sono estremamente stabili in condizioni difficili, come temperatura elevata, pH estremo e in presenza di attività di RNA, suggerendo il loro potenziale ruolo come biomarcatori per la diagnosi del cancro⁵⁴.

Diversi studi hanno riportato un'alterata espressione dei miRNA nel sangue e dei miRNA salivari in diversi tipi di tumore, inclusi tumori del colon, del polmone, dell'ovaio e della mammella^{55,56}.

Cambiamenti di espressione di diversi miRNA sono stati documentati con fattori di rischio per il cancro orale, ad esempio un aumento dell'espressione di miR-31 e miR-138 ed una diminuzione dell'espressione di miR-10b, miR-92a, miR-200b, miR-372, miR-375, miR-378a e miR-145, con consumo di tabacco senza fumo⁵⁷.

Le prove della letteratura suggeriscono inoltre un'associazione dei miRNA, in particolare di miR-34a, con lo sviluppo del dente, il rimodellamento osseo e la differenziazione delle cellule staminali dentali^{58,59}.

3.1 Ruolo dei microRNA nell'odontogenesi e nelle anomalie dentali

Lo sviluppo del dente, noto anche come odontogenesi, è un processo complesso che prevede diversi passaggi, tra cui la formazione, l'eruzione e l'incorporamento del dente nei tessuti parodontali e nelle ossa mascellari, facilitato dalle interazioni reciproche tra l'epitelio dentale e il mesenchima⁶⁰.

Il processo inizia con l'ispessimento dell'epitelio orale, con conseguente formazione della lamina dentale. All'interno di questa struttura si formano più placodi dentali, ognuno dei quali avvia lo sviluppo di un germe del dente.

Ogni placode dentale inizia a germogliare nel mesenchima sottostante, inducendo la condensazione mesenchimale attorno al germoglio.

Nelle fasi successive, l'epitelio continua ad estendersi attorno al mesenchima dentale, formando inizialmente una forma a cappuccio e successivamente passando a una forma a campana. Quindi, inizia una fase di formazione della corona, durante la quale il dente in via di sviluppo inizia a staccarsi dall'epitelio della cavità orale.

Dopo questa fase, inizia la fase di formazione della radice, che stabilisce una connessione tra il dente, i nervi, i vasi sanguigni e fornisce l'attaccamento all'osso alveolare⁶⁰.

Una volta avviata la formazione della radice, il dente inizia a muoversi verticalmente, facilitandone l'eruzione.

In questo complesso scenario, diversi percorsi molecolari, che coinvolgono un gran numero di geni, giocano un ruolo chiave⁶¹.

Tra i percorsi evolutivi più conservati ci sono Wnt, BMP, FGF e Sonic Hedgehog (SHH) che sono strettamente regolati e interagiscono strettamente in tutte le fasi dello sviluppo del dente. In particolare, le vie Wnt e SHH regolano tutte le fasi di transizione dello sviluppo del dente rendendo queste due vie cruciali per l'intero processo di odontogenesi. In effetti, l'alterazione dei geni che agiscono in questi percorsi è stata riscontrata in diverse malattie umane caratterizzate da anomalie dentali che possono manifestarsi come isolate o come sintomo clinico nelle malattie sindromiche.

I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) sono un tipo di polimorfismo della sequenza del DNA causati dalla variazione in un singolo nucleotide a livello del genoma⁶².

Precedenti studi hanno dimostrato che gli SNP genomici sono associati con l'agenesia dentale. Ad esempio, Liu e coll.⁶³ hanno riscontrato un'associazione tra rs929387 di GLI3 e agenesia dentale non sindromica in una popolazione cinese; Gong e coll., in uno studio del 2015, hanno mostrato un'associazione tra rs17563 di BMP4 ed agenesia non sindromica⁶⁴, mentre Lu e coll. nel 2016 tra rs15705 e rs317250 di BMP2⁶⁵.

Negli ultimi anni, la relazione tra miRNA e le malattie umane è stata ampiamente studiata. Diversi studi hanno mostrato che la famiglia miR-200 è coinvolta nella regolazione delle cellule staminali epiteliali e che il miR-200c regola la formazione dello smalto dei denti influenzando il segnale di trasduzione tra gli ameloblasti⁶⁶. Il MiR-21 risulta invece associato all'osteogenesi dell'osso alveolare⁶⁷, mentre il miR-34a promuove la differenziazione odontogenica e osteogenica delle cellule staminali della papilla apicale (SCAP)⁵⁸. Questi studi mostrano collettivamente l'importante ruolo del miRNA nella crescita e nello sviluppo dentale.

Prove emergenti mostrano che i miRNA possono avere un ruolo importante anche nel movimento dentale e suggeriscono possibili ruoli di miRNA specifici, tra cui miR-29 nelle cellule staminali del legamento parodontale come modulatore dell'omeostasi extracellulare durante il movimento ortodontico del dente⁶⁸ e miR-31, coinvolto nel circuito regolatorio dell'eruzione e del movimento degli elementi dentari insieme a RUNX2 e SATB2⁶⁹.

I polimorfismi a singolo nucleotide nei geni dei miRNA possono alterare l'elaborazione o la maturazione del pre-miRNA e influenzare la loro specificità del bersaglio, con il risultato di differenze fenotipiche.

In particolare, SNP nei pre-miRNA possono influenzare l'espressione del miRNA maturo, mentre gli SNP intorno ai miRNA maturi o alle regioni a cui si legano i geni bersaglio possono influenzare il legame miRNA-mRNA⁷⁰.

Una delle precedenti situazioni potrebbe interferire con l'interazione dei geni bersaglio dei miRNA, influenzandone così l'insorgenza delle malattie.

4. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del seguente studio genetico e molecolare ha come obiettivo quello di indagare in merito alle basi molecolari delle inclusioni palatali del canino mascellare, sia in forma monolaterale che bilaterale, e in particolare di studiare il ruolo dei miRNA. Lo studio delle inclusioni del canino mascellare è stato effettuato attraverso l'estrazione del DNA in casi selezionati, al fine ultimo di:

- identificare il ruolo di elementi non codificanti (miRNA) nell'eziologia del fenotipo
- valutare eventuali correlazioni tra più anomalie dentali e scheletriche

5. MATERIALI E METODI

5.1 Disegno dello studio

Studio sperimentale interventistico senza farmaco

5.2 Campione e raccolta dati

Il campione dello studio è stato selezionato presso la UOC di Ortognatodonzia del Policlinico Universitario Umberto I di Roma. Il comitato etico del Policlinico Umberto I ha approvato la sperimentazione (RIF 6834). A ogni paziente (in caso di minore ad ogni genitore/tutore legale) sono stati somministrati due consensi informati, uno generico ed uno specifico genetico, ed un modulo di informativa e manifestazione del consenso al trattamento dei dati personali.

I criteri di inclusione dello studio sono stati i seguenti:

- Inclusione palatale del canino mascellare in forma monolaterale e bilaterale
- Possibile presenza di altre anomalie dentarie
- Disponibilità delle seguenti radiografie pre-trattamento: Ortopanoramica, Teleradiografia del cranio in proiezione latero-laterale, Cone Beam Computed Tomography (CBCT)
- Disponibilità dei modelli di studio pre-trattamento

I criteri di esclusione sono stati:

- Presenza di quadri sindromici cranio-facciali, palatoschisi o labioschisi o pregressi eventi traumatici

I pazienti selezionati sono stati sottoposti all'iter diagnostico confermato dalla letteratura internazionale:

- Anamnesi familiare³⁰.
- Esame clinico⁷¹: valutazione dell'assenza della bozza canina all'età di 9-10 anni, eventuale asimmetria d'eruzione, assenza del canino permanente in arcata, persistenza del canino deciduo oltre i limiti fisiologici, eventuale posizione anomala dell'incisivo laterale.
- Esami radiografici^{72,73}: l'esame di routine per la diagnosi di inclusione del canino mascellare è rappresentato dall'ortopantomografia; altri esami radiografici 2D (teleradiografia del cranio in proiezione latero-laterale) per la valutazione della classe scheletrica del soggetto, della divergenza e della presenza di concomitanti anomalie scheletriche (bridging della sella turcica, ponticulus posticus). Indagini radiografiche di secondo livello (CBCT) possono essere

necessarie per una valutazione più approfondita di eventuali rapporti di contiguità del canino con i denti adiacenti e le strutture contigue

La fase iniziale del processo di raccolta dati ha comportato l'elaborazione di un foglio di lavoro Excel comprendente le seguenti variabili:

- Generalità del paziente (nome, cognome, sesso, telefono, data di nascita, codice identificativo)
- Data di acquisizione del tampone salivare
- Inclusione canino (monolaterale o bilaterale)
- Canino incluso (destra, sinistra, entrambi)
- Presenza di agenesie dentali
- Anomalie dell'incisivo laterale (agenesico, conoide, microdontico)
- Anomalie di eruzione (altre inclusioni e trasposizioni)
- Odontomi e soprannumerari
- Valori cefalometrici (SNA, SNB, ANB, SN-GoMe)
- Ponticulus Posticus: anomalia vertebrale che si forma per ossificazione della membrana atlo-occipitale dell'arco posteriore di C1. Il Ponticulus posticus è stato classificato in:
 - Classe I (nessuna calcificazione)
 - Classe II (calcificazione incompleta)
 - Classe III (calcificazione completa) (Fig. 3)⁷⁴
- Bridging sella turcica: calcificazione del legamento interclinoideo che viene classificato in tre stadi:
 - Classe I (senza calcificazione): lunghezza della sella turcica $> 3/4$ del massimo diametro anteroposteriore della sella turcica.
 - Classe II (calcificazione parziale): lunghezza della sella turcica $\leq 3/4$ del massimo diametro anteroposteriore della sella turcica.
 - Classe III (Calcificazione completa): diaframma sella radiograficamente osservabile o identificabile. (Fig. 4)
- Riassorbimento radicolare a carico degli elementi dentari contigui: presente/assente
- Elementi interessati dal riassorbimento
- Sede del riassorbimento: terzo apicale, terzo medio, terzo cervicale

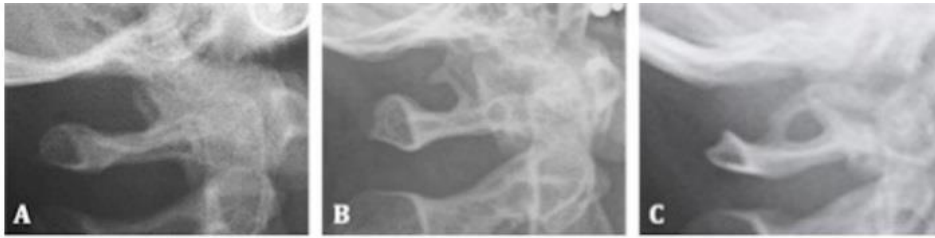


Figura 3: Classificazione del ponticulus posticus. A)Classe I: Nessuna calcificazione. B)Classe II: Calcificazione incompleta. C)Classe III: Calcificazione completa⁷⁵.

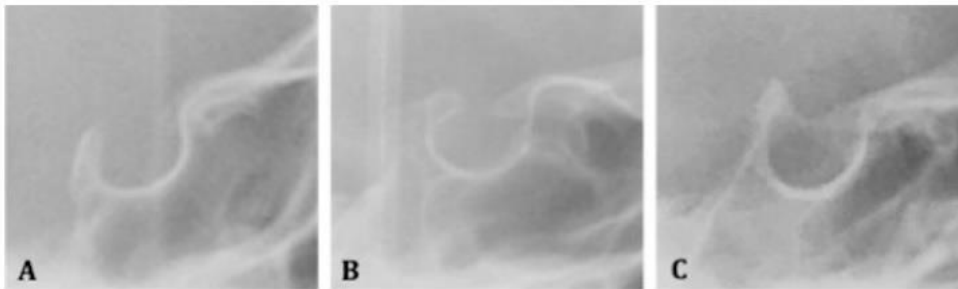


Figura 4: Classificazione del bridging della sella turcica. A)Classe I: Assenza di calcificazione. B)Classe II: Calcificazione parziale. C)Classe III: Calcificazione completa⁷⁵.

5.3 Selezione dei miRNA associati alle anomalie di eruzione dei denti

Per identificare i miRNA con un ruolo funzionale nei fenotipi isolati e sindromici, caratterizzati da anomalie eruttive degli elementi dentari, è stata condotta una ricerca bibliografica utilizzando PubMed come database di riferimento.

I termini di ricerca hanno incluso: “tooth agenesis”, “tooth impaction”, “tooth eruption” e “tooth movement”.

Tra i 38 articoli, abbiamo considerato i 20 articoli che riportano l'analisi dell'espressione dei miRNA in cellule e tessuti umani correlati all'odontogenesi (ad esempio cellule della polpa dentale, pre-ameloblasti e tessuto gengivale) eseguita utilizzando microarray, RT-qPCR o ibridazione in situ.

La nomenclatura dei miRNA è stata curata secondo miRBase v22 (ultima versione di miRBase, che cataloga, denomina e distribuisce i microRNA nelle sequenze geniche).

Abbiamo raccolto un elenco di 82 miRNA potenzialmente associati allo sviluppo e all'eruzione degli elementi dentari, sulla base dei dati della letteratura (Tab. 1).

Di questi 82 miRNA ne sono stati selezionati otto (miR181B2, miR138-1, miR146A, miR155, miR181B1, miR182, miR29B1, miR138-2), in quanto maggiormente coinvolti nelle anomalie di eruzione degli elementi dentari.

miRBase id	Fonte	PMID
hsa-let-7a-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-let-7c-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-101-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-103a-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-106b-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-1246	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-1260°	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-1260b	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-1297	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-130a-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-135a-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-135b-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-138-5p	Sehic et al., 2017 ¹ ; Wu et al., 2019 ⁷⁶	27725267;31312353
hsa-miR-141-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-142-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-143-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-145-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-146a-5p	Sehic et al., 2017 ¹ ; Jin et al., 2017 ⁷⁷	27725267
hsa-miR-150-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-150-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-155-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267;33760254
hsa-miR-15a-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-181b-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-182-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-185-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-195-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-199a-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-19b-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-200a-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-200b-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-203a-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-205-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-210-3p	Sehic et al., 2017 ¹ ; Wu et al., 2019 ⁷⁶	27725267;31312353
hsa-miR-214-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-21-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-218-5p	Sehic et al., 2017 ¹ ; Wu et al., 2019 ⁷⁶	27725267;31312353
hsa-miR-223-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-22-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-224-5p	Sehic et al., 2017 ¹ ; Jin et al., 2017 ⁷⁷	27725267;27835837
hsa-miR-23a-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-24-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-29b-3p	Sehic et al., 2017 ¹ ; Atsawasuwan et al., 2018 ⁷⁸	27725267;29518149
hsa-miR-301a-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267

hsa-miR-30a-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-30d-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-31-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-32-5p	Sehic et al., 2017 ¹ ; Jin et al., 2017 ⁷⁷	27725267;27835837
hsa-miR-34a-5p	Sehic et al., 2017 ¹ ; Jin et al., 2017 ⁷⁷	27725267;27835837
hsa-miR-379-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-3917	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-424-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-4328	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-433-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-451°	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-486-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-516a-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-520d-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-548a-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-584-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-586	Sehic et al., 2017 ¹ ; Jin et al., 2017 ⁷⁷	27725267;27835837
hsa-miR-7-5p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-766-3p	Sehic et al., 2017 ¹	27725267
hsa-miR-885-5p	Sehic et al., 2017 ¹ ; Jin et al., 2017 ⁷⁷	27725267;27835837
hsa-miR-125a-5p	He et al., 2021 ⁷⁹	33524878
hsa-miR-26a-5p	Zhang et al., 2021 ⁸⁰	34438336
hsa-miR-221-3p	Wu et al., 2019 ⁷⁶	31312353
hsa-miR-132-3p	Wu et al., 2019 ⁷⁶	31312353
hsa-miR-133a-3p	Wu et al., 2019 ⁷⁶	31312353
hsa-miR-145-3p	Wu et al., 2019 ⁷⁶	31312353
hsa-miR-143-5p	Wu et al., 2019 ⁷⁶	31312353
hsa-miR-486-3p	Wu et al., 2019 ⁷⁶	31312353
hsa-miR-503-5p	Liu et al., 2017 ⁸²	27862699
hsa-miR-3198	Kanzaki et al., 2019 ⁸¹	31041888
hsa-miR-29a-3p	Atsawasuwan et al., 2018 ⁷⁸	29518149
hsa-miR-29c-3p	Atsawasuwan et al., 2018 ⁷⁸	29518149
hsa-miR-27a-5p	Kulthanaamondhita et al., 2022 ⁸³	35271859
hsa-miR-675-5p	Kulthanaamondhita et al., 2022 ⁸³	35271859
hsa-miR-3065-5p	Kulthanaamondhita et al., 2022 ⁸³	35271859
hsa-miR-140-5p	Kulthanaamondhita et al., 2022 ⁸³	35271859
hsa-miR-508-5p	Kulthanaamondhita et al., 2022 ⁸³	35271859
hsa-miR-125a-3p	Kulthanaamondhita et al., 2022 ⁸³	35271859
hsa-miR-410-3p	Kulthanaamondhita et al., 2022 ⁸³	35271859

Tabella 1: Elenco di 82 miRNA potenzialmente associati allo sviluppo e all'eruzione degli elementi dentari, sulla base dei dati della letteratura. I termini di ricerca hanno incluso: “tooth agenesis”, “tooth impaction”, “tooth eruption” e “tooth movement”.

5.4 Raccolta del DNA genomico da saliva

Ai soggetti selezionati sono stati effettuati prelievi di saliva mediante appositi kit di raccolta e conservazione (Oracollect for Pediatrics Temp. Ambiente 1 confezione di OC-175 contiene n. 25 kit). (Fig. 5, Fig. 6).

ORACollect è un kit per il prelievo del DNA indolore e facile da usare che può essere utilizzato dai genitori o da professionisti qualificati.

La tracciabilità completa dei campioni è garantita dalla presenza di codici a barre integrati. ORACollect risulta quindi essere una valida alternativa affidabile ai metodi tradizionali di raccolta del DNA, offrendo diversi vantaggi:

- Indolore per il donatore (no prelievi di sangue).
- Protocollo di raccolta rapido: non è richiesto alcun tempo di asciugatura.
- Batteriostatico: il reagente stabilizzatore del DNA inibisce la crescita dei batteri dal momento della raccolta del campione fino al trattamento.
- Campione protetto: il DNA rimane stabile a temperatura ambiente (15-25 °C) per 1 anno.

Il prelievo di saliva è stato effettuato nella regione del fornice, sia nel lato destro che sinistro (Fig. 7), con un movimento di avanti e indietro ripetuto per 10 volte.

Dopo il prelievo, il tampone è stato capovolto all'interno della provetta per mescolarlo con il liquido reagente, ed agitato rigorosamente per dieci volte.



Figura 5: Kit per il prelievo salivare.



Figura 6: Tamponne salivare utilizzato per il prelievo di saliva.



Figura 7: Prelievo salivare nel fornice del cavo orale.

5.5 Estrazione del DNA genomico da saliva

Ai campioni di saliva raccolti è stato aggiunto 1/25 in volume di buffer PT-L2P rispetto al volume totale recuperato dal brush per precipitare le impurità.

Il campione è stato vortexato per 20 secondi, messo in ghiaccio per 10 minuti e centrifugato a 15000 rcf per 15 minuti.

È stato trasferito il sovrantante in una nuova eppendorf e misurato il suo volume in base al quale è stato aggiunto etanolo al 95-100% (1,2 volumi di EtOH rispetto al volume di campione).

Il campione è stato invertito lentamente per 10 volte, lasciato a temperatura ambiente per 10 minuti e centrifugato a 15000 rcf per 5 minuti.

Dopo averlo travasato per inversione in una nuova eppendorf, al sovrinatante sono stati aggiunti 1,2 volumi di etanolo al 70%.

Il campione è stato lasciato a temperatura ambiente per 1 minuto e centrifugato a 15000 rcf per 5 minuti.

Il sovrinatante è stato travasato per inversione in una nuova eppendorf e il pellet di DNA messo sotto cappa con flusso acceso.

Sono stati aggiunti 80 uL di Hydration solution per reidratare il DNA e il campione è stato posto in un bagnetto termostato per 1 ora a 50°C o incubato a temperatura ambiente overnight.

In seguito, i campioni di DNA sono stati quantificati tramite spettrofotometria con lo strumento NanoDrop (Thermo Scientific), effettuata una valutazione a 230, 260 e 280 nanometri (nm).

È stato possibile quindi calcolare la concentrazione del DNA, espressa in ng/ml, e il suo grado di purezza, espresso con i rapporti 260/280 nm e 260/230 nm.

Il DNA genomico (250 ng) è stato sottoposto a corsa elettroforetica a 80V per 1 ora e 20 minuti in un gel di agarosio allo 0.8% in modo da verificarne l'integrità.

5.6 Amplificazione e sequenziamento dei miRNA

Sono stati disegnati i primer per amplificare le regioni genomiche contenenti i trascritti primari dei seguenti miRNA: miR-181B1, miR-181B2, miR-138-1, miR-146A, miR-155, e miR-182.

Le reazioni di PCR sono state condotte in un volume finale di 25 ul contenente:

- *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase* in concentrazione finale pari a 0,03 U/μl;
- *10X PCR Buffer I* (contenente MgCl₂) in concentrazione finale pari a 1X;
- dNTP mix in concentrazione finale pari a 0,5 mM (0,125 mM ciascuno);
- *Primer forward e reverse* in concentrazione finale pari a 0,5 uM ciascuno (0,125 mM ciascuno);
- DNA: sono stati aggiunti 1,2 μl per ogni campione;
- ddH₂O in quantità diversa per ogni mix in modo da portare a volume la reazione.

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite mediante i seguenti cicli di temperatura. La denaturazione iniziale è condotta a 95°C per 10 min. I tre passaggi successivi di denaturazione, *annealing* ed estensione, sono stati ripetuti per 35 cicli:

- Denaturazione: 95°C per 15 sec;
- *Annealing*: 60°C per 30 sec;
- Estensione: 72°C per 24 sec;

La fase di estensione finale è stata condotta a 72°C per 5 min.

Per purificare i prodotti della PCR è stato utilizzato il kit *CleanSweep™ PCR Purification* (ThermoFisher) che idrolizza l'eccesso di primers e defosforila i dNTP non incorporati che potrebbero interferire con le applicazioni successive.

Sono stati quindi aggiunti 2 μ l di *CleanSweep™ reagent* ai 5 μ l di PCR. Il termociclatore è stato impostato come segue: prima incubazione a 37°C per 15 minuti e seconda incubazione a 80°C per 15 minuti.

Per tutti gli amplificati è stata eseguita la reazione di sequenza in un volume finale di 20 μ l nelle seguenti condizioni:

- *BigDye Terminator 3.1 Ready Reaction Mix* in concentrazione finale pari a 0.5X;
- *BigDye Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer* in concentrazione finale pari a 2 μ l;
- *Primer (forward o reverse)* in concentrazione finale pari a 0,16 μ M;
- *DMSO* concentrato al 5%;
- DNA: sono stati caricati 3 μ l di purificato;
- ddH₂O in quantità diversa per ogni mix in modo da portare a volume la reazione.

Tutte le reazioni di sequenza sono state eseguite utilizzando le condizioni termiche riportate di seguito:

- Denaturazione del purificato di PCR: 97°C per 5 min;
- Denaturazione iniziale: 96°C per 1 min;

I tre passaggi di denaturazione, *annealing* ed estensione si ripetono per 25 cicli:

- Denaturazione a 96°C per 10 sec;
- *Annealing* a 55°C per 5 sec;
- Estensione a 60°C per 4 min.

Le sequenze sono state purificate utilizzando il kit *MSB® Spin PCRapace* (Invitex). Alle reazioni di sequenza sono stati aggiunti 500 μ l di *Binding Buffer*.

I campioni sono stati trasferiti in provette contenenti lo *Spin Filter* e centrifugate a temperatura ambiente per 4 minuti a 14000 rpm. Le provette sono state svuotate del contenuto e centrifugate a secco per 1 minuto a 14000 rpm.

Lo *Spin Filter* di ogni campione è stato trasferito in altre provette per l'eluizione finale.

Sono stati quindi aggiunti 15 μ l di *Elution Buffer* direttamente al centro dello *Spin Filter*. Si attendono 2 minuti prima di centrifugare a 11000 rpm per 1 minuto.

Per il caricamento su piastra sono stati aggiunti in ogni pozzetto 3 μ l di purificato in media e 20 μ l di formammide.

I campioni sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su sequenziatori capillari automatici: *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* e *3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Le sequenze degli elettroferogrammi sono state analizzate mediante il software *ChromasPro V.1.7.5 (Technelysium Pty Ltd)*.

5.7 Numerosità campionaria ed analisi statistica

Si tratta di uno studio pilota per il quale non è previsto un calcolo formale della dimensione campionaria. Sulla base della casistica ad oggi disponibile presso la UOC di Ortognatodonzia del Policlinico Umberto I, il progetto coinvolge 25 pazienti. I dati sono stati valutati utilizzando un software dedicato di analisi statistica (MedCalc ® Statistical Software version 22.014,). Un database è stato creato con Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA), con opportuni controlli per identificare possibili errori. L'analisi descrittiva dei dati era comprensiva di valori medi e delle deviazioni standard. Il Test chi-quadro di Pearson è stato eseguito per valutare la presenza di eventuali correlazioni con le seguenti variabili: agenesie, anomalie dell'incisivo laterale, anomalie di eruzione (altre inclusioni, trasposizioni), odontomi e soprannumerari, classe scheletrica, divergenza, anomalie del Ponticulus Posticus, bridging della sella turcica, riassorbimento. Per ogni test la significatività statistica è stata dichiarata con un $p \leq 0,05$.

6. RISULTATI

6.1 Risultati clinici

6.1.1 Caratteristiche dentali

- **Inclusione del canino:** 40% bilaterale, 60% monolaterale;
- **Canino incluso:** 16% monolaterale destro, 44% monolaterale sinistro, 40% bilaterale;
- **Agenesie:** 52% assenti, 48% presenti (20% III molari, 20% incisivi laterali, 8% premolari);
- **Anomalie incisivo laterale:** 40% assenti, 60% presenti (20% agenesico, 40% microdontico);
- **Anomalie di eruzione:** 80% assenti, 20% presenti (16% altre inclusioni, 4% trasposizioni);
- **Odontomi e soprannumerari:** 80% assenti, 20% presenti (12% odontomi, 8% soprannumerari) (Tab. 2);

6.1.2 Caratteristiche cefalometriche

Il campione preso in esame presentava i seguenti valori medi:

- **SNA:** $83,72^\circ \pm 4$;
- **SNB:** $79,32^\circ \pm 4$;
- **ANB:** $4,4^\circ \pm 2,25$;

Il 48% del campione presentava una I classe scheletrica; il 52% del campione presentava una classe scheletrica diversa dalla I classe (48% II classe, 4% III classe).

- **SN[^]GoMe:** il valore medio della divergenza è risultato essere di $28,84^\circ \pm 4,49$;

Il 48% del campione presentava valori normali di divergenza ($32^\circ \pm 5$); il 52% del campione presentava una variazione della divergenza (44% ipodivergente, 8% iperdivergente)

- **Ponticulus Posticus:** Il 48% del campione presentava anomalie del ponticulus posticus così distribuite: 52% Classe I, 20% Classe II, 28% Classe III;
- **Bridging sella turcica:** Il 60% del campione presentava il bridging della sella turcica (40% Classe I, 52% Classe II, 8% Classe III) (Tab. 3);

6.1.3 Analisi su CBCT

- **Riassorbimento di altri elementi dentari:** 72% assente, 28% presente;
- **Elementi dentari interessati dal riassorbimento:** 14,29% incisivo laterale destro, 57,13 % incisivo laterale sinistro, 14,29% primo premolare superiore di destra, 14,29 % primo premolare superiore di sinistra;
- **Sede del riassorbimento:** 28% del campione distribuito come segue: 71,4 % terzo apicale, 14,3 % terzo medio, 14,3 % terzo cervicale (Tab. 4).

CARATTERISTICHE DENTALI			
Canino incluso	Bilaterale: 40%	Monolaterale dx: 19%	Monolaterale sx: 44%
Agenesie	Assenti: 52%	Presenti: 48%	
Anomalie incisivo laterale	Assenti: 40%	Presenti: 60%	
Anomalie di eruzione	Assenti: 80%	Presenti: 20%	
Odontomi e soprannumerari	Assenti: 80%	Presenti: 20%	

Tabella 2: Analisi del campione sulla base delle caratteristiche dentali.

CARATTERISTICHE CEFALOMETRICHE	
SNA	83,72° ± 4
SNB	79,32° ± 4
ANB	4,4° ± 2,25
SN^GoMe	28,84° ± 4,49
Ponticulus Posticus	Classe I: 52%, Classe II: 20%, Classe III: 28%
Bridging sella turcica	Classe I: 40%, Classe II: 52%, Classe III: 8%

Tabella 3: Analisi del campione sulla base delle caratteristiche cefalometriche, comprensiva dei valori medi degli angoli SNA, SNB, SN^GoMe.

ANALISI SU CBCT	
Riassorbimento di altri elementi dentari	Assente: 72%, presente: 28%
Elementi dentari interessati dal riassorbimento:	Incisivo laterale dx: 14,29%, incisivo laterale sx: 57,13%, primo premolare di dx: 14,29%, primo premolare di sx: 14,29%
Sede del riassorbimento	Apicale: 71,4, terzo medio: 14,3%, terzo cervicale: 14,3

Tabella 4: Caratteristiche del campione sulla base dell'analisi eseguita su CBCT.

6.2 Risultati molecolari

E' stato estratto il DNA genomico di tutti i 25 campioni. Tramite spettrofotometria (NanoDrop) è stato possibile quantificare i campioni di DNA genomico e determinarne il grado di purezza. Per ogni campione è stata quindi calcolata la concentrazione, espressa in ng/ μ l, e calcolato il grado di purezza, espresso con i rapporti di assorbanza a 260/280 nm e 260/230 nm. I rapporti di assorbanza a 260/280 nm erano compresi in un range di valori di 1.70-1.80, indici di DNA considerati sufficientemente puri, mentre i rapporti di assorbanza a 260/230 nm risultavano molto più bassi (in media 0.80-0.90) a indicare la presenza di contaminanti co-purificati (proteine e fenoli).

Mediante corsa su gel di agarosio allo 0.8% è stata valutata l'integrità del DNA, ritenuta elevata per tutti i campioni a eccezione di due nei quali il DNA risultava parzialmente degradato. Sono stati quindi analizzati gli elettroferogrammi dei vari campioni mediante *ChromasPro* V.1.7.5.

Sono state identificate 3 varianti per i seguenti miRNA: una per il miR-146A (rs2910164) e due per il miR-182 (rs76481776 e rs4541843).

La variante rs2910164 si localizza nella sequenza seed del miR-146A (le prime 8 basi del miRNA maturo) all'estremità 3'. Questa sequenza è particolarmente importante perché è la sequenza con cui il miRNA si appaia a un mRNA.

Lo score di MiRLog associato a questa variante è a 0.27, indicando quindi che questa variante non sembra essere deleteria.

MiRLog è lo score che assegna un potenziale effetto funzionale di quella variante e valuta l'impatto della variante sul miRNA. Questo sistema è stato allenato su delle varianti che si sapeva avessero un effetto deleterio ed è stato creato questo sistema di conteggio che associa uno score di effetto deleterio nel caso in cui ci sia qualcosa di simile a quelle varianti.

La variante è stata riscontrata nel 64% del campione.

Il miRNA in cui questa variante si localizza è molto analizzato in letteratura, soprattutto in associazione a patologie tumorali. E' stato selezionato nel presente studio perché risulta overespresso nelle patologie parodontali¹ ed è stato ipotizzato che possa regolare l'espressione di geni che regolano l'eruzione dei denti⁷⁷.

La variante rs76481776 (C>T) si localizza nella sequenza del miR-182 all'estremità 3' del miRNA. Lo score di MiRLog associato a questa variante, risulta essere molto basso, pari a 0.04, indicando quindi che questa variante è predetta essere neutrale.

Tale variante è stata riscontrata nel 4% del campione preso in esame. Il miRNA in cui questa variante si localizza è stato molto analizzato in letteratura, in associazione a patologie tumorali

e oculari. E' stato selezionato perché è riportato essere overespresso durante le infiammazioni parodontali nel pathway NF-KB, e sembra avere un ruolo funzionale nella differenziazione osteogenica nelle cellule del legamento parodontale⁷⁷.

La variante rs4541843 si localizza al di fuori dello stem loop del miR-182, 28bp a valle del miRNA maturo, nella regione fiancheggiante al miRNA. Sebbene non sia disponibile lo score di MiRLog (poiché la variante si localizza fuori dal miRNA maturo descritto in miRBase), lo score del CADD (Combined Annotation Dependent Depletion, uno strumento utile a valutare quanto sia deleteria una variante a singolo nucleotide) è piuttosto basso (5.9). Vista la frequenza allelica e lo score di CADD trovato, è presumibile che la variante non abbia un effetto deleterio. In questo caso, il miRNA coinvolto è il miR-182 descritto precedentemente. Questa variante è stata riscontrata nel 28% del campione.

6.3 Analisi statistica delle correlazioni

E' stata valutata la presenza di correlazioni tra i due miRNA risultati variati [miR-146A (rs2910164) e miR-182 (rs76481776 e rs4541843)] e le variabili cliniche, cefalometriche e su CBCT prese in esame. E' stata riscontrata un'associazione statisticamente significativa tra il miR-146A e le seguenti variabili:

- Anomalie incisivo laterale: $p = 0,0455$
- Ponticulus Posticus: $p = 0,0285$
- Bridging della sella turcica: $p = 0,0455$

Al contrario, non sono state riscontrate associazioni statisticamente significative del miR-146A con il resto delle variabili:

- Agenesie: $p = 0,2807$
- Anomalie di eruzione: $p = 0,4142$
- Odontomi e soprannumerari: $p = 0,8383$
- Classe scheletrica: $p = 0,5784$
- Divergenza: $p = 0,1698$
- Riassorbimento: $p = 0,6364$

Non è stata riscontrata alcuna associazione statisticamente significativa tra il miR-182 e le variabili prese in esame:

- Agenesie: $p = 0,6846$

- Anomalie incisivo laterale: $p = 0,1227$
- Anomalie di eruzione: $p = 0,6744$
- Odontomi e soprannumerari: $p = 0,1415$
- Classe scheletrica: $p = 0,893$
- Divergenza: $p = 0,893$
- Ponticulus posticus: $p = 0,0996$
- Bridging della sella turcica: $p = 0,1218$
- Riassorbimento: $p = 0,477$

7. DISCUSSIONE

Il presente studio genetico e molecolare ha avuto come obiettivo quello di indagare in merito alle basi molecolari delle inclusioni palatali del canino mascellare, ed in particolare di studiare il ruolo dei miRNA nell'eziologia del fenotipo e di valutare eventuali correlazioni tra più anomalie dentali e scheletriche.

Ai 25 pazienti selezionati sono stati effettuati prelievi di saliva mediante appositi kit di raccolta e conservazione e, successivamente, il DNA raccolto dalla saliva è stato estratto, amplificato e sequenziato.

Sebbene negli ultimi anni alcuni studi della letteratura abbiano iniziato ad esaminare il ruolo dei miRNA nelle anomalie dentali, nessuno studio ha indagato l'associazione dei miRNA con l'inclusione del canino.

Al contrario, nel presente studio, è stata riscontrata un'associazione tra inclusione del canino mascellare e diverse varianti; in particolare, la variante rs2910164 per il miR-146A e le varianti rs76481776 e rs4541843 per il miR-182.

La variante rs2910164 del miR-146A è stata riscontrata nel 64% del campione, e questo è un dato in linea con lo studio di Yang e coll., che hanno indagato la presenza di quattro polimorfismi a singolo nucleotide (rs2910164, rs11614913, rs2043556, e rs2682818) in associazione ad una maggiore suscettibilità di denti soprannumerari, riscontrando che miR-146A/rs2910164 e miR-618/rs2682818 sono associati ad un rischio maggiore di denti soprannumerari⁸⁴.

E' nota infatti dalla letteratura l'associazione del canino incluso con altre anomalie dentarie⁸⁵, tra cui la presenza di elementi soprannumerari⁸⁶.

In una revisione recente della letteratura⁸⁷ è stato riscontrato infatti che le anomalie dentali sono significativamente più frequenti (>50%) nei pazienti con canini inclusi rispetto ai pazienti senza canini inclusi (20%), tra cui la presenza di elementi dentari soprannumerari.

Il miRNA in cui si localizza la variante rs2910164 riscontrata nel presente studio è stato molto analizzato in letteratura, soprattutto in associazione a patologie tumorali.

È stato selezionato da noi come miRNA poiché risulta essere over-espresso nelle patologie parodontali¹, con una relazione positiva tra i livelli di miR-146A ed i parametri clinici, inclusi il livello di attacco clinico e la profondità di tasca⁸⁸, che suggerisce un potenziale ruolo fisiopatologico di miR-146A nella malattia parodontale, rappresentando un indicatore della gravità della malattia.

E' stato inoltre ipotizzato che miR-146A possa regolare l'espressione di geni che controllano l'eruzione dei denti, come RUNX2⁷⁷ e TRAF6.

E' stato dimostrato che quando il miR-146A viene sovraespresso o inibito, l'espressione di RUNX2 è significativamente alterata⁸⁹.

La sovra-espressione di TRAF6 è responsabile dell'attivazione della via di segnalazione NF-KB, associata all'insorgenza di agenesia dentale non sindromica⁹⁰; negli ultimi anni è emerso che il miR-146 induce l'apoptosi dei condrociti agendo proprio sulla via di segnalazione mediata da TRAF6⁹¹.

Il miR-182 è un altro miRNA selezionato nel presente studio, in cui sono state riscontrate due varianti associate all'inclusione del canino mascellare.

Il miRNA è stato molto analizzato in letteratura, in associazione a patologie tumorali e a patologie oculari ed è stato da noi selezionato poiché risulta over-espresso durante le infiammazioni parodontali nel pathway NF-KB, per cui è stato suggerito che possa svolgere un ruolo funzionale nella differenziazione osteogenica delle cellule del legamento parodontale⁷⁷.

Le due varianti riscontrate (rs76481776 e rs4541843) non sono state associate in letteratura ad anomalie dentali; infatti la variante rs76481776 di miR-182 è stata riportata in letteratura in associazione al glaucoma ad angolo aperto primario⁹² e alla malattia di Behçet⁹³, mentre la variante rs4541843 si localizza nel pri-miR-182 ed è stata riportata in associazione ad una incrementata suscettibilità al tumore al seno⁹⁴ e all'insorgenza della sclerosi multipla⁹⁵.

Nonostante non siano presenti studi che indaghino l'associazione tra il ruolo dei miRNA e l'inclusione del canino mascellare, un recente studio pone attenzione sul ruolo dei miRNA nel rischio di agenesia del canino⁴⁵.

Nello specifico, è stato raccolto un campione di pazienti con un totale di 625 elementi dentali colpiti da agenesia non sindromica, e sono stati selezionate quattro varianti comuni nei geni miRNA; dai risultati dello studio è emerso che il polimorfismo rs2043556 del pre-miR-605 risulta essere associato al rischio di agenesia dentale non sindromica, in particolare con il rischio di agenesia del canino superiore e, in misura inferiore, con il rischio di agenesia degli incisivi laterali superiori e inferiori. Questo lavoro risulta essere molto importante in quanto è il primo che indaga la presenza di varianti genetiche di miRNA che contribuiscono alla suscettibilità di agenesia del canino.

I risultati del presente studio e l'analisi della letteratura mostrano come i miRNA possano essere coinvolti nella variazione di espressione di un determinato fenotipo, concorrendo all'insorgenza di inclusione del canino mascellare. E' noto che i miRNA siano implicati nella regolazione dell'espressione dei geni, agendo da modificatori del genotipo, per cui una loro

variante potrebbe determinare una differente regolazione di geni codificanti, con conseguente differente espressione del gene.

Infatti già precedenti studi hanno mostrato un'associazione tra varianti di alcuni geni e agenesia dentale non sindromica. Ad esempio, Liu e coll. hanno riscontrato un'associazione tra rs929387 di GLI3 e agenesia dentale non sindromica in una popolazione cinese⁶³; Gong e coll., in uno studio del 2015, hanno mostrato un'associazione tra rs17563 di BMP4 ed agenesia non sindromica⁶⁴, mentre Lu e coll. nel 2016 tra rs15705 e rs317250 di BMP2⁶⁵.

Lu e coll. hanno sottolineato come gli alleli mutanti di rs15705 e rs317250 aumentino la capacità di legame dei miRNA, con conseguente diminuzione dell'espressione di BMP2, ponendo già alla luce l'influenza dei miRNA come modificatori del genotipo⁶⁵.

Negli ultimi anni presso la UOC di Ortognatodonzia del Policlinico Umberto I è stato condotto uno studio in cui sono state indagate le basi molecolari di una famiglia che presentava anomalie di eruzione del canino (agenesia, inclusione, eruzione ectopica)⁴⁰, i cui risultati hanno messo in luce il ruolo delle vie segnaletiche WNT ed EDA nello sviluppo dentale e nella possibile anomalia di eruzione del canino mascellare.

Sembra probabile che le anomalie di eruzione del canino potrebbero rappresentare una diversa manifestazione del disordine, oppure potrebbero condividere una base molecolare.

In particolare, nel presente studio abbiamo scelto di studiare nello specifico il fenotipo caratterizzato da inclusione palatale del canino mascellare in quanto, contrariamente all'agenesia, che risulta essere una caratteristica clinica non modificabile, l'inclusione, se individuata nei tempi giusti, può garantire un riposizionamento dell'elemento dentario in arcata e la risoluzione del problema di natura sia estetica che funzionale. Per tale motivo il timing, nella diagnosi di inclusione del canino, risulta di fondamentale importanza.

Inoltre, questa problematica risulta essere molto frequente nella UOC di Ortognatodonzia del Policlinico Umberto I rispetto alla popolazione generale²⁷.

Il secondo obiettivo del presente lavoro è stato quello di indagare eventuali correlazioni dei miRNA con anomalie dentali e scheletriche.

In accordo con Mercuri e coll., l'inclusione palatale del canino infatti raramente si presenta come un sintomo isolato, ma è accompagnato da anomalie dentali geneticamente determinate, come anomalie a carico degli incisivi laterali mascellari (microdonzia, incisivi laterali conoidi o agenesici)⁸⁵, dovute a disturbi di sviluppo della lamina dentale³⁹.

Anche nel presente studio è stata riscontrata un'associazione tra il campione di pazienti che presentavano la variante rs2910164 del miR-146A e le anomalie dell'incisivo laterale ($p = 0,0455$).

Negli ultimi anni presso la UOC di Ortognatodonzia del Policlinico Umberto I è stato analizzato un vasto campione di pazienti con anomalie del canino mascellare mettendo in luce risultati da un punto di vista diagnostico predittivo, prognostico e terapeutico^{29,75,96-98}.

In particolare, sono state riscontrate alcune variabili cliniche e radiografiche associate in modo statisticamente significativo all'inclusione palatale del canino, come la presenza di anomalie scheletriche (ponticulus posticus e bridging della sella turcica), di anomalie morfologiche a carico dell'incisivo laterale, ed il sesso femminile, rappresentando quindi un segno predittivo e tempestivo della possibile inclusione del canino mascellare che permette al medico di adottare misure preventive adeguate e mirate⁷⁵.

L'associazione tra canino incluso in sede palatale ed anomalie scheletriche (ponticulus posticus, bridging della sella turcica) risulta essere in linea con studi precedenti^{74,99-101}, che mostrano come le anomalie scheletriche visibili radiograficamente sono associate non solo con le malformazioni dei mascellari e con sindromi craniofacciali, ma anche con anomalie dentali come l'inclusione del canino mascellare^{74,102-104}.

Anche nel presente studio è stata riscontrata un'associazione tra il campione di pazienti che presentavano la variante rs2910164 del miR-146A e la presenza del ponticulus posticus ($p = 0,0285$) e del bridging della sella turcica ($p = 0,0455$), in linea con i risultati già riscontrati nel precedente studio condotto presso la UOC di Ortognatodonzia del Policlinico Umberto I⁷⁵.

Questa correlazione sembra essere dovuta al coinvolgimento delle cellule della cresta neurale e/o dei geni homeobox durante le prime fasi di sviluppo e formazione della sella turcica e degli elementi dentari¹⁰⁵.

Allo stesso modo viene influenzato lo sviluppo del collo e delle spalle: una mutazione del gene homeobox potrebbe essere responsabile di un'anomalia congenita delle vertebre cervicali¹⁰⁶.

Poiché gli elementi dentari, il cranio e la parte cervicale della colonna vertebrale sono influenzati nel loro sviluppo dalle cellule della cresta neurale, possono subire l'influenza di un disturbo che si verifica a carico di queste cellule.

Bisogna considerare che questi elementi clinici (anomalie a carico dell'incisivo laterale) e radiografici (bridging della sella turcica e ponticulus posticus) sono immutabili e rilevabili in giovane età, per cui uno di questi elementi può rappresentare un segno predittivo della possibile inclusione del canino mascellare, permettendo al medico di adottare misure preventive adeguate e mirate.

Nel presente studio non è stata invece riscontrata nessuna associazione statisticamente significativa tra il miR-182 e le variabili prese in esame; questo dato potrebbe essere dovuto alla presenza di una numerosità campionaria ridotta, ma allo stesso tempo risulta in linea con

quanto presente in letteratura, in quanto nessuno studio fino ad ora ha riscontrato un'associazione tra il miR-182 e anomalie dentali, nonostante questo miRNA risulti espresso, secondo i dati della letteratura, in cellule e tessuti umani correlati all'odontogenesi¹.

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse sui miRNA come potenziali biomarcatori per la diagnosi, la prognosi, e la valutazione dell'efficacia del trattamento di diverse malattie. Diversi studi hanno infatti mostrato la presenza dei miRNA nella saliva, la cui composizione è molto complessa ed include enzimi, anticorpi, ormoni, elementi antimicrobici e citochine¹⁰⁷.

Nel presente studio abbiamo scelto di utilizzare la saliva per l'analisi dei miRNA poiché possiede molti vantaggi rispetto al prelievo del sangue, in quanto permette una raccolta facile, sicura, non invasiva, economica¹⁰⁸.

La possibilità di un campionamento ripetuto e l'utilizzo in popolazioni di grandi dimensioni ha permesso infatti ai biomarcatori salivari di svilupparsi rapidamente come potente strumento diagnostico^{109,110}, per cui, la rilevazione dei miRNA nella saliva, potrebbe essere utilizzato come strumento rapido e non invasivo che può concorrere alla diagnosi di inclusione del canino mascellare, soprattutto se associato alla presenza di altre anomalie dentali e scheletriche.

Il limite della presente ricerca è sicuramente la presenza di una numerosità campionaria ridotta; si tratta infatti di uno studio pilota, per cui sarebbe auspicabile analizzare il ruolo dei miRNA nell'eziologia del fenotipo caratterizzato da inclusione del canino mascellare all'interno di un campione più ampio.

Come prospettiva futura, sarebbe inoltre interessante studiare il ruolo dei miRNA anche nei pazienti che presentano il canino incluso in posizione vestibolare. E' infatti noto dalla letteratura che i canini inclusi in sede vestibolare sono, per la maggior parte dei casi, dovuti ad una carenza di spazio in arcata¹¹¹, per cui, un'analisi genetica in questi pazienti potrebbe mettere alla luce in maniera più chiara le basi molecolari di questa anomalia dentaria.

8. CONCLUSIONI

I risultati del presente studio mettono in evidenza il ruolo dei miRNA nelle vie di sviluppo che regolano l'eruzione degli elementi dentari, mirando principalmente all'espressione di geni cardine di questi processi, in un meccanismo complesso e integrato di regolazione delle reti di segnalazione cellulare.

Di conseguenza, i miRNA sembrerebbero avere un ruolo importante nello sviluppo delle anomalie dentarie, con potenziale impatto sulla gestione clinica di questi pazienti.

Infatti l'utilizzo di un semplice prelievo salivare, in associazione ad una valutazione clinica per la contestuale presenza di anomalie dentali a carico dell'incisivo laterale e radiografica per la presenza di anomalie scheletriche, sembrerebbe avere un valore predittivo in quanto permetterebbe una diagnosi precoce della problematica di inclusione del canino mascellare.

Sono tuttavia necessari ulteriori studi, con una numerosità campionaria più ampia, condotti attraverso analisi dell'espressione genica, screening di sequenziamento e approcci funzionali in vitro, al fine di valutare il potenziale ruolo dei miRNA nell'inclusione del canino mascellare e valutare come una loro modifica, in termini di espressione, biogenesi e targeting potrebbe essere alla base di questa anomalia dentaria.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Sehic A, Tulek A, Khuu C, Nirvani M, Sand LP, Utheim TP. Regulatory roles of microRNAs in human dental tissues. *Gene*. 2017 Jan 5;596:9-18. doi: 10.1016/j.gene.2016.10.009.
2. Cahill DR, Marks SC Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol*. 1980 Jul;9(4):189-200. doi: 10.1111/j.1600-0714.1980.tb00377.x. PMID: 6777476.
3. Bei M. Molecular genetics of tooth development. *Curr Opin Genet Dev*. 2009 Oct;19(5):504-10. doi:10.1016/j.gde.2009.09.002.
4. Rakhshan V. Congenitally missing teeth (hypodontia): A review of the literature concerning the etiology, prevalence, risk factors, patterns and treatment. *Dent Res J (Isfahan)*. 2015 Jan-Feb;12(1):1-13. doi: 10.4103/1735-3327.150286. PMID: 25709668; PMCID: PMC4336964.
5. Baccetti T. A clinical and statistical study of etiologic aspects related to associated tooth anomalies in number, size, and position. *Minerva Stomatol*. 1998 Dec;47(12):655-63. PMID: 10207301.
6. Ahmad W, Brancolini V, ul Faiyaz MF, et al. A locus for autosomal recessive hypodontia with associated dental anomalies maps to chromosome 16q12.1. *Am J Hum Genet*. 1998 Apr;62(4):987-91. doi: 10.1086/301799. PMID: 9529357; PMCID: PMC1377039.
7. Svinhufvud E, Myllärniemi S, Norio R. Dominant inheritance of tooth malpositions and their association to hypodontia. *Clin Genet*. 1988 Dec;34(6):373-81. doi:10.1111/j.1399-0004.1988.tb02895.
8. Bjerklin K, Kurol J, Valentin J. Ectopic eruption of maxillary first permanent molars and association with other tooth and developmental disturbances. *Eur J Orthod*. 1992 Oct;14(5):369-75.
9. De Muynck S, Schollen E, Matthijs G, Verdonck A, Devriendt K, Carels C. A novel MSX1 mutation in hypodontia. *Am J Med Genet A*. 2004 Aug 1;128A(4):401-3. doi: 10.1002/ajmg.a.30181. PMID: 15264286.
10. Yin W, Bian Z. The Gene Network Underlying Hypodontia. *J Dent Res*. 2015 Jul;94(7):878-85. doi: 10.1177/0022034515583999. Epub 2015 Apr 24. PMID: 25910507.
11. Zhou M, Zhang H, Camhi H, et al. Analyses of oligodontia phenotypes and genetic etiologies. *Int J Oral Sci*. 2021 Sep 30;13(1):32. doi: 10.1038/s41368-021-00135-3.
12. Kapadia H, Mues G, D'Souza R. Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod Craniofac Res*. 2007 Aug;10(3):105-13. doi: 10.1111/j.1601-6343.2007.00395.x. Erratum in: *Orthod*

- Craniofac Res. 2007 Nov;10(4):236. Corrected and republished in: Orthod Craniofac Res. 2007 Nov;10(4):237-44. PMID: 17651126.
13. Burzynski NJ, Escobar VH. Classification and genetics of numeric anomalies of dentition. Birth Defects Orig Artic Ser. 1983;19(1):95-106. PMID: 6362744.
 14. Nieminen P, Arte S, Pirinen S, Peltonen L, Thesleff I. Gene defect in hypodontia: exclusion of MSX1 and MSX2 as candidate genes. Hum Genet. 1995 Sep;96(3):305-8. doi: 10.1007/BF00210412. PMID: 7649547.
 15. Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. Nat Genet. 1996 Aug;13(4):417-21. doi: 10.1038/ng0896-417. PMID: 8696335.
 16. Hu G, Vastardis H, Bendall AJ, et al. Haploinsufficiency of MSX1: a mechanism for selective tooth agenesis. Mol Cell Biol. 1998 Oct;18(10):6044-51. doi: 10.1128/MCB.18.10.6044. PMID: 9742121; PMCID: PMC109190.
 17. Pawlowska E, Janik-Papis K, Wisniewska-Jarosinska M, Szczepanska J, Blasiak J. Mutations in the human homeobox MSX1 gene in the congenital lack of permanent teeth. Tohoku J Exp Med. 2009 Apr;217(4):307-12. doi: 10.1620/tjem.217.307. PMID: 19346736.
 18. Nakatomi M, Wang XP, Key D, et al. Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. Dev Biol. 2010 Apr 15;340(2):438-49. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.01.031. Epub 2010 Feb 1. PMID: 20123092.
 19. Peters H, Neubüser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. Genes Dev. 1998 Sep 1;12(17):2735-47. doi: 10.1101/gad.12.17.2735. PMID: 9732271; PMCID: PMC317134.
 20. Lammi L, Arte S, Somer M, et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. Am J Hum Genet. 2004 May;74(5):1043-50. doi: 10.1086/386293. Epub 2004 Mar 23. PMID: 15042511; PMCID: PMC1181967.
 21. Naeem M, Muhammad D, Ahmad W. Novel mutations in the EDAR gene in two Pakistani consanguineous families with autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia. Br J Dermatol. 2005 Jul;153(1):46-50. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06642.x. PMID: 16029325.
 22. Rasool M, Schuster J, Aslam M, et al. A novel missense mutation in the EDA gene associated with X-linked recessive isolated hypodontia. J Hum Genet. 2008;53(10):894-898. doi: 10.1007/s10038-008-0323-x. Epub 2008 Aug 9. PMID: 18688569.

23. Mues GI, Griggs R, Hartung AJ, et al. From ectodermal dysplasia to selective tooth agenesis. *Am J Med Genet A*. 2009 Sep;149A(9):2037-41. doi: 10.1002/ajmg.a.32801. PMID: 19504606.
24. Mostowska A, Kobiela A, Trzeciak WH. Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of MSX1 and PAX9 reflect their role in patterning human dentition. *Eur J Oral Sci*. 2003 Oct;111(5):365-70. doi: 10.1034/j.1600-0722.2003.00069.x. PMID: 12974677.
25. Fukuta Y, Totsuka M, Takeda Y, Yamamoto H. Congenital absence of the permanent canines: a clinico-statistical study. *J Oral Sci*. 2004 Dec;46(4):247-52. doi: 10.2334/josnusd.46.247. PMID: 15901070.
26. Leong P, Calache H. Bilateral congenitally missing maxillary canines. A case report. *Aust Dent J*. 1999 Dec;44(4):279-82. doi: 10.1111/j.1834-7819.1999.tb00233.x. PMID: 10687238.
27. Sajnani AK. Permanent maxillary canines - review of eruption pattern and local etiological factors leading to impaction. *J Investig Clin Dent*. 2015 Feb;6(1):1-7. doi: 10.1111/jicd.12067. Epub 2013 Dec 20. PMID: 24357555.
28. Rózsa N, Nagy K, Vajó Z, et al. Prevalence and distribution of permanent canine agenesis in dental paediatric and orthodontic patients in Hungary. *Eur J Orthod*. 2009 Aug;31(4):374-9. doi: 10.1093/ejo/cjp018. Epub 2009 May 27. PMID: 19474230.
29. Cassetta M, Guarnieri R, Altieri F, Brandetti G, Padalino G, Di Giorgio R, Barbato E. Relationship between upper lateral incisors anomalies and palatal displaced canine: a case-control retrospective study. *Minerva Stomatol*. 2020 Jun;69(3):159-164. doi: 10.23736/S0026-4970.19.04299-7. PMID: 32610724.
30. Bishara SE. Impacted maxillary canines: a review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1992 Feb;101(2):159-71. doi: 10.1016/0889-5406(92)70008-X. PMID: 1739070.
31. Peck S, Peck L, Kataja M. The palatally displaced canine as a dental anomaly of genetic origin. *Angle Orthod*. 1994;64(4):249-56. doi: 10.1043/0003-3219(1994)064<0249:WNID>2.0.CO;2. PMID: 7978519.
32. Guarnieri R, Cavallini C, Vernucci R, Vichi M, Leonardi R, Barbato E. Impacted maxillary canines and root resorption of adjacent teeth: A retrospective observational study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016 Nov 1;21(6):e743-e750. doi: 10.4317/medoral.21337. PMID: 27694788; PMCID: PMC5116117.

33. Becker A, Chaushu S. Etiology of maxillary canine impaction: a review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015 Oct;148(4):557-67. doi: 10.1016/j.ajodo.2015.06.013. PMID: 26432311.
34. Becker A, Sharabi S, Chaushu S. Maxillary tooth size variation in dentitions with palatal canine displacement. *Eur J Orthod.* 2002 Jun;24(3):313-8. doi: 10.1093/ejo/24.3.313. PMID: 12143095.
35. Chaushu S, Sharabi S, Becker A. Dental morphologic characteristics of normal versus delayed developing dentitions with palatally displaced canines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002 Apr;121(4):339-46. doi: 10.1067/mod.2002.121559. PMID: 11997757.
36. Becker A, Smith P, Behar R. The incidence of anomalous maxillary lateral incisors in relation to palatally-displaced cuspids. *Angle Orthod.* 1981 Jan;51(1):24-9. doi: 10.1043/0003-3219(1981)051<0024:TIOAML>2.0.CO;2. PMID: 6939351.
37. Baccetti T. A controlled study of associated dental anomalies. *Angle Orthod.* 1998 Jun;68(3):267-74. doi: 10.1043/0003-3219(1998)068<0267:ACSOAD>2.3.CO;2. PMID: 9622764.
38. Sacerdoti R, Baccetti T. Dentoskeletal features associated with unilateral or bilateral palatal displacement of maxillary canines. *Angle Orthod.* 2004 Dec;74(6):725-32. doi: 10.1043/0003-3219(2004)074<0725:DFAWUO>2.0.CO;2. PMID: 15673132.
39. Peck S, Peck L, Kataja M. Prevalence of tooth agenesis and peg-shaped maxillary lateral incisor associated with palatally displaced canine (PDC) anomaly. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996 Oct;110(4):441-3. doi: 10.1016/s0889-5406(96)70048-3. PMID: 8876497.
40. Barbato E, Traversa A, Guarnieri R, et al. Whole exome sequencing in an Italian family with isolated maxillary canine agenesis and canine eruption anomalies. *Arch Oral Biol.* 2018 Jul;91:96-102. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.04.011. Epub 2018 Apr 21. PMID: 29705498.
41. Prasad MK, Geoffroy V, Vicaire S, et al. A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement. *J Med Genet.* 2016;53(2):98-110. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103302. Epub 2015 Oct 26. PMID: 26502894; PMCID: PMC4752661.
42. Ockeloen CW, Khandelwal KD, Dreesen K, et al. Novel mutations in LRP6 highlight the role of WNT signaling in tooth agenesis. *Genet Med.* 2016;18(11):1158-1162. doi:10.1038/gim.2016.10. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26963285; PMCID: PMC5018235.
43. Salvi A, Giacomuzzi E, Bardellini E, et al. Mutation analysis by direct and whole exome sequencing in familial and sporadic tooth agenesis. *Int J Mol Med.* 2016;38(5):1338-1348.

- doi:10.3892/ijmm.2016.2742. Epub 2016 Sep 19. PMID: 27665865; PMCID: PMC5065298.
44. Massink MP, Créton MA, Spanevello F, et al. Loss-of-Function Mutations in the WNT Co-receptor LRP6 Cause Autosomal-Dominant Oligodontia. *Am J Hum Genet.* 2015;97(4):621-626. doi:10.1016/j.ajhg.2015.08.014. Epub 2015 Sep 17. PMID: 26387593; PMCID: PMC4596913.
 45. Gu M, Yu X, Fan L, Zhu G, Yang F, Lou S, Ma L, Pan Y, Wang L. Genetic Variants in miRNAs Are Associated With Risk of Non-syndromic Tooth Agenesis. *Front Physiol.* 2020 Aug 21;11:1052. doi: 10.3389/fphys.2020.01052. PMID: 32973563; PMCID: PMC7472694.
 46. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Jan;20(1):21-37. doi: 10.1038/s41580-018-0045-7. PMID: 30108335; PMCID: PMC6546304.
 47. Grassia V, Lombardi A, Kawasaki H, et al. Salivary microRNAs as new molecular markers in cleft lip and palate: a new frontier in molecular medicine. *Oncotarget.* 2018 Apr 10;9(27):18929-18938. doi: 10.18632/oncotarget.24838. PMID: 29721173; PMCID: PMC5922367.
 48. Klein Y, Fleissig O, Polak D, Barenholz Y, Mandelboim O, Chaushu S. Immunorthodontics: in vivo gene expression of orthodontic tooth movement. *Sci Rep.* 2020 May 18;10(1):8172. doi: 10.1038/s41598-020-65089-8. PMID: 32424121; PMCID: PMC7235241.
 49. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009 Mar;11(3):228-34. doi: 10.1038/ncb0309-228. PMID: 19255566.
 50. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012 Apr 18;13(5):358-69. doi: 10.1038/nrg3198. PMID: 22510765; PMCID: PMC4517822.
 51. Samantarrai D, Dash S, Chhetri B, Mallick B. Genomic and epigenomic cross-talks in the regulatory landscape of miRNAs in breast cancer. *Mol Cancer Res.* 2013 Apr;11(4):315-28. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0649. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23360796.
 52. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010 Nov;56(11):1733-41. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20847327; PMCID: PMC4846276.
 53. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Apr;6(4):259-69. doi: 10.1038/nrc1840. PMID: 16557279.

54. Detassis S, Grasso M, Del Vescovo V, Denti MA. microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine. *Front Cell Dev Biol.* 2017 Sep 22;5:86. doi: 10.3389/fcell.2017.00086. PMID: 29018797; PMCID: PMC5614923.
55. Giannopoulou L, Zavridou M, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES. Liquid biopsy in ovarian cancer: the potential of circulating miRNAs and exosomes. *Transl Res.* 2019 Mar;205:77-91. doi: 10.1016/j.trsl.2018.10.003. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30391474.
56. Cayrefourcq L, Alix-Panabières C. Clinical relevance of liquid biopsy in breast cancer: update in 2020. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020 Sep;20(9):913-919. doi: 10.1080/14737159.2020.1816828. Epub 2020 Sep 3. PMID: 32856493.
57. Yete S, Saranath D. MicroRNAs in oral cancer: Biomarkers with clinical potential. *Oral Oncol.* 2020 Nov;110:105002. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.105002. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32949853.
58. Sun F, Wan M, Xu X, et al. Crosstalk between miR-34a and Notch Signaling Promotes Differentiation in Apical Papilla Stem Cells (SCAPs). *J Dent Res.* 2014 Jun;93(6):589-95. doi: 10.1177/0022034514531146. Epub 2014 Apr 7. PMID: 24710391.
59. Zhang B, Yang L, Zheng W, Lin T. MicroRNA-34 expression in gingival crevicular fluid correlated with orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2020 Sep 1;90(5):702-706. doi: 10.2319/090219-574.1. PMID: 33378474; PMCID: PMC8032257.
60. Kwon HE, Jiang R. 2018. Development of teeth. In: Carlson BM, editor. Reference module in biomedical sciences. Amsterdam (Netherlands): Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64113-2.
61. Hermans F, Hemeryck L, Lambrichts I, Bronckaers A, Vankelecom H. Intertwined Signaling Pathways Governing Tooth Development: A Give-and-Take Between Canonical Wnt and Shh. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Oct 29;9:758203. doi: 10.3389/fcell.2021.758203. PMID: 34778267; PMCID: PMC8586510.
62. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:228-37. doi: 10.1038/ng1090. PMID: 12610532.
63. Liu H, Han D, Wong S, Nan X, Zhao H, Feng H. rs929387 of GLI3 is involved in tooth agenesis in Chinese Han population. *PLoS One.* 2013 Nov 20;8(11):e80860. doi: 10.1371/journal.pone.0080860. PMID: 24278334; PMCID: PMC3835326.
64. Gong M, Qian YJ, Gu Net al. Association of BMP4 polymorphisms with isolated tooth agenesis in a Chinese Han population: a case-control study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015 Jun;19(12):2188-94. PMID: 26166641.

65. Lu Y, Qian Y, Zhang J, et al. Genetic Variants of BMP2 and Their Association with the Risk of Non-Syndromic Tooth Agenesis. *PLoS One*. 2016 Jun 30;11(6):e0158273. doi: 10.1371/journal.pone.0158273. PMID: 27362534; PMCID: PMC4928851.
66. Peng C, Li N, Ng YK, et al. A unilateral negative feedback loop between miR-200 microRNAs and Sox2/E2F3 controls neural progenitor cell-cycle exit and differentiation. *J Neurosci*. 2012 Sep 19;32(38):13292-308. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2124-12.2012. PMID: 22993445; PMCID: PMC3752087.
67. Liu W, Konermann A, Guo T, Jäger A, Zhang L, Jin Y. Canonical Wnt signaling differently modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and from periodontal ligament under inflammatory conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar;1840(3):1125-34. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.11.003. Epub 2013 Nov 12. Erratum in: *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2021 Jan;1865(1):129764. PMID: 24231680.
68. Chen Y, Mohammed A, Oubaidin M, et al. Cyclic stretch and compression forces alter microRNA-29 expression of human periodontal ligament cells. *Gene*. 2015 Jul 15;566(1):13-7. doi: 10.1016/j.gene.2015.03.055. Epub 2015 Mar 28. PMID: 25827718.
69. Ge J, Guo S, Fu Y, et al. Dental Follicle Cells Participate in Tooth Eruption via the RUNX2-MiR-31-SATB2 Loop. *J Dent Res*. 2015 Jul;94(7):936-44. doi: 10.1177/0022034515578908. Epub 2015 Mar 27. PMID: 25818585.
70. Króliczewski J, Sobolewska A, Lejnowski D, Collawn JF, Bartoszewski R. microRNA single polynucleotide polymorphism influences on microRNA biogenesis and mRNA target specificity. *Gene*. 2018 Jan 15;640:66-72. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.021. Epub 2017 Oct 13. PMID: 29032146.
71. Ericson S, Kurol J. Radiographic assessment of maxillary canine eruption in children with clinical signs of eruption disturbance. *Eur J Orthod*. 1986 Aug;8(3):133-40. doi: 10.1093/ejo/8.3.133. PMID: 3464436.
72. Ericson S, Kurol J. Radiographic examination of ectopically erupting maxillary canines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1987 Jun;91(6):483-92. doi: 10.1016/0889-5406(87)90005-9. PMID: 3473928.
73. Kapila S, Conley RS, Harrell WE Jr. The current status of cone beam computed tomography imaging in orthodontics. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011 Jan;40(1):24-34. doi: 10.1259/dmfr/12615645. PMID: 21159912; PMCID: PMC3611465.
74. Leonardi R, Barbato E, Vichi M, Caltabiano M. Skeletal anomalies and normal variants in patients with palatally displaced canines. *Angle Orthod*. 2009 Jul;79(4):727-32. doi: 10.2319/082408-448.1. PMID: 19537879.

75. Guarnieri R, Germanò F, Altieri F, Cassetta M, Grenga C, Padalino G, Di Giorgio R, Barbato E. Predictive Analysis of Maxillary Canine Impaction through Sella Turcica Bridging, Ponticulus Posticus Calcification, and Lateral Incisor Anomalies: A Retrospective Observational Study. *Methods Protoc.* 2022 Nov 21;5(6):91. doi: 10.3390/mps5060091. PMID: 36412813; PMCID: PMC9680360.
76. Wu Y, Ou Y, Liao C, Liang S, Wang Y. High-throughput sequencing analysis of the expression profile of microRNAs and target genes in mechanical force-induced osteoblastic/cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Am J Transl Res.* 2019 Jun 15;11(6):3398-3411. PMID: 31312353; PMCID: PMC6614645.
77. Jin Y, Wang C, Cheng S, Zhao Z, Li J. MicroRNA control of tooth formation and eruption. *Arch Oral Biol.* 2017 Jan;73:302-310. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.08.026. Epub 2016 Aug 27. PMID: 27835837.
78. Atsawasuwan P, Lazari P, Chen Y, Zhou X, Viana G, Evans CA. Secretory microRNA-29 expression in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194238. doi:10.1371/journal.pone.0194238. PMID: 29518149; PMCID: PMC5843286.
79. He W, Zhang N, Lin Z. MicroRNA-125a-5p modulates macrophage polarization by targeting E26 transformation-specific variant 6 gene during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2021 Apr;124:105060. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105060. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33524878.
80. Zhang X, Li Z, Zhao Z, Chen Y, Sun Y, Cai Q. Runx1/miR-26a/Jagged1 signaling axis controls osteoclastogenesis and alleviates orthodontically induced inflammatory root resorption. *Int Immunopharmacol.* 2021 Nov;100:107991. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107991. Epub 2021 Aug 23. PMID: 34438336.
81. Kanzaki H, Wada S, Yamaguchi Y, et al. Compression and tension variably alter Osteoprotegerin expression via miR-3198 in periodontal ligament cells. *BMC Mol Cell Biol.* 2019 Apr 4;20(1):6. doi: 10.1186/s12860-019-0187-2. PMID: 31041888; PMCID: PMC6449962.
82. Liu L, Liu M, Li R, et al. MicroRNA-503-5p inhibits stretch-induced osteogenic differentiation and bone formation. *Cell Biol Int.* 2017;41(2):112-123. doi:10.1002/cbin.10704.
83. Kulthanaamondhita P, Kornsutthisopon C, Photichailert S, Manokawinchoke J, Limraksasin P, Osathanon T. Specific microRNAs Regulate Dental Pulp Stem Cell Behavior. *J Endod.*

- 2022 Jun;48(6):688-698. doi: 10.1016/j.joen.2022.02.012. Epub 2022 Mar 7. PMID: 35271859.
84. Yang F, Yu X, Fan L, Xu Z, Kan S, Zhu G, Gu M, Lou S, Li D, Ma L, Zhang W, Wang L, Pan Y. Associations of the microRNA gene polymorphisms with the risk of non-syndromic supernumerary teeth in a Chinese population. *Arch Oral Biol.* 2020 Sep;117:104771. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104771. Epub 2020 May 20. PMID: 32562900.
85. Mercuri E, Cassetta M, Cavallini C, Vicari D, Leonardi R, Barbato E. Dental anomalies and clinical features in patients with maxillary canine impaction. *Angle Orthod.* 2013;83(1):22-28. doi:10.2319/021712-149.1.
86. Sajnani AK, King NM. Dental anomalies associated with buccally- and palatally-impacted maxillary canines. *J Investig Clin Dent.* 2014;5(3):208-213. doi:10.1111/jicd.12035.
87. Stabryła J, Zadurska M, Plakwicz P, Kukuła KT, Czochrowska EM. Comparisons of Dental Anomalies in Orthodontic Patients with Impacted Maxillary and Mandibular Canines. *Diagnostics (Basel).* 2023 Aug 25;13(17):2766. doi: 10.3390/diagnostics13172766. PMID: 37685304; PMCID: PMC10487134.
88. Motedayyen H, Ghotloo S, Saffari M, Sattari M, Amid R. Evaluation of MicroRNA-146a and Its Targets in Gingival Tissues of Patients With Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 2015 Dec;86(12):1380-5. doi: 10.1902/jop.2015.150319. Epub 2015 Aug 27. PMID: 26313020.
89. Chen P, Wei D, Xie B, Ni J, Xuan D, Zhang J. Effect and possible mechanism of network between microRNAs and RUNX2 gene on human dental follicle cells. *J Cell Biochem.* 2014 Feb;115(2):340-8. doi: 10.1002/jcb.24668. PMID: 24038414.
90. Yu M, Wong SW, Han D, Cai T. Genetic analysis: Wnt and other pathways in nonsyndromic tooth agenesis. *Oral Dis.* 2019 Apr;25(3):646-651. doi: 10.1111/odi.12931. Epub 2018 Jul 23. PMID: 29969831; PMCID: PMC6318069.
91. Shao J, Ding Z, Peng J, et al. MiR-146a-5p promotes IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis through the TRAF6-mediated NF- κ B pathway. *Inflamm Res.* 2020;69(6):619-630. doi:10.1007/s00011-020-01346-w.
92. Moschos MM, Dettoraki M, Karekla A, et al. Polymorphism analysis of miR182 and CDKN2B genes in Greek patients with primary open angle glaucoma. *PLoS One.* 2020 Jun 3;15(6):e0233692. doi: 10.1371/journal.pone.0233692. PMID: 32492046; PMCID: PMC7269255.

93. Yu H, Liu Y, Bai L, Kijlstra A, Yang P. Predisposition to Behçet's disease and VKH syndrome by genetic variants of miR-182. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Sep;92(9):961-7. doi: 10.1007/s00109-014-1159-9. Epub 2014 May 8. PMID: 24801147.
94. Morales S, De Mayo T, Gulppi FA, et al. Genetic Variants in pre-miR-146a, pre-miR-499, pre-miR-125a, pre-miR-605, and pri-miR-182 Are Associated with Breast Cancer Susceptibility in a South American Population. *Genes (Basel)*. 2018 Aug 22;9(9):427. doi: 10.3390/genes9090427. PMID: 30135399; PMCID: PMC6162394.
95. Najafi N, Peymani M. A genetic variant of pri-miR-182 may impact the risk for the onset of multiple sclerosis in the Iranian population. *Am J Hum Biol*. 2020 Nov;32(6):e23415. doi: 10.1002/ajhb.23415. Epub 2020 Mar 25. PMID: 32212358.
96. Grenga C, Guarnieri R, Grenga V, et al. Periodontal evaluation of palatally impacted maxillary canines treated by closed approach with ultrasonic surgery and orthodontic treatment: a retrospective pilot study. *Sci Rep*. 2021 Feb 2;11(1):2843. doi: 10.1038/s41598-021-82510-y. Erratum in: *Sci Rep*. 2021 Sep 30;11(1):19866. PMID: 33531610; PMCID: PMC7854633.
97. Guarnieri R, Bertoldo S, Cassetta M, et al. Periodontal results of different therapeutic approaches (open vs. closed technique) and timing evaluation (< 2 year vs. > 2 year) of palatal impacted canines: a systematic review. *BMC Oral Health*. 2021 Nov 10;21(1):574. doi: 10.1186/s12903-021-01937-x. PMID: 34758795; PMCID: PMC8579516.
98. Altieri F, Padalino G, Guarnieri R, Barbato E, Cassetta M. Computer-guided palatal canine disimpaction: a technical note. *Int J Comput Dent*. 2020;23(3):219-224. PMID: 32789309.
99. Leonardi R, Barbato E, Vichi M, Caltabiano M. A sella turcica bridge in subjects with dental anomalies. *Eur J Orthod*. 2006;28(6):580-585. doi:10.1093/ejo/cjl032.
100. Dadgar S, Alimohamadi M, Rajabi N, Rakhshan V, Sobouti F. Associations among palatal impaction of canine, sella turcica bridging, and ponticulus posticus (atlas arcuate foramen). *Surg Radiol Anat*. 2021;43(1):93-99. doi:10.1007/s00276-020-02548-x.
101. Haji Ghadimi M, Amini F, Hamed S, Rakhshan V. Associations among sella turcica bridging, atlas arcuate foramen (ponticulus posticus) development, atlas posterior arch deficiency, and the occurrence of palatally displaced canine impaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2017;151(3):513-520. doi:10.1016/j.ajodo.2016.08.024.
102. Lachman RS. The cervical spine in the skeletal dysplasias and associated disorders. *Pediatr Radiol*. 1997;27(5):402-408. doi:10.1007/s002470050156.

103. Uğar DA, Semb G. The prevalence of anomalies of the upper cervical vertebrae in subjects with cleft lip, cleft palate, or both. *Cleft Palate Craniofac J.* 2001;38(5):498-503. doi:10.1597/1545-1569_2001_038_0498_tpoaot_2.0.co_2.
104. Axelsson S, Storhaug K, Kjaer I. Post-natal size and morphology of the sella turcica. Longitudinal cephalometric standards for Norwegians between 6 and 21 years of age. *Eur J Orthod.* 2004;26(6):597-604. doi:10.1093/ejo/26.6.597.
105. Miletich I, Sharpe PT. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004;72(2):200-212. doi:10.1002/bdrc.20012.
106. Morotomi T, Kawano S, Toyono T, et al. In vitro differentiation of dental epithelial progenitor cells through epithelial-mesenchymal interactions. *Arch Oral Biol.* 2005;50(8):695-705. doi:10.1016/j.archoralbio.2004.12.006.
107. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* 2011 May;17(4):345-54. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x. Epub 2010 Dec 2. PMID: 21122035; PMCID: PMC3056919.
108. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Oct;26(4):781-91. doi: 10.1128/CMR.00021-13. PMID: 24092855; PMCID: PMC3811231.
109. Kapoor P, Chowdhry A, Bagga DK, Bhargava D, Aishwarya S. MicroRNAs in oral fluids (saliva and gingival crevicular fluid) as biomarkers in orthodontics: systematic review and integrated bioinformatic analysis. *Prog Orthod.* 2021 Oct 11;22(1):31. doi: 10.1186/s40510-021-00377-1. PMID: 34632546; PMCID: PMC8502526.
110. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5473-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0736. Epub 2009 Aug 25. PMID: 19706812; PMCID: PMC2752355.
111. Manne R, Gandikota C, Juvvadi SR, Rama HR, Anche S. Impacted canines: Etiology, diagnosis, and orthodontic management. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012 Aug;4(Suppl 2):S234-8. doi: 10.4103/0975-7406.100216. PMID: 23066259; PMCID: PMC3467862.