GEMELLI NELLA RICERCA PEDIATRICA: L'ESPERIENZA DEL REGISTRO NAZIONALE GEMELLI

Sonia Brescianini, Sabrina Alviti, Antonio Arnofi, Cristina D'Ippolito
Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il metodo gemellare consiste nel confronto tra gemelli monozigoti (MZ) e dizigoti (DZ), ed ha lo scopo di indagare l'influenza che geni e ambiente esercitano su un certo carattere di interesse. Tale confronto riguarda il livello di somiglianza fenotipica, ed è basato sulla differenza della correlazione nelle coppie delle due zigosità. Dato che i gemelli MZ sono geneticamente identici, mentre i DZ condividono in media il 50% dei geni, al pari di normali fratelli, è chiaro che un'eventuale maggiore somiglianza osservata tra i primi può essere assunta come indice di influenze genetiche sul carattere in studio. Il ragionamento è valido solo se si assume che i gemelli MZ condividano le esperienze ambientali (*equal environments assumption*), rilevanti per la caratteristica in esame, nella stessa misura dei DZ (1). Per molte variabili tale assunzione può essere ritenuta valida. Sia gli MZ che i DZ condividono i fattori della vita intra-uterina, nonché le esposizioni dell'ambiente familiare e domestico nell'infanzia. Se l'assunzione non è valida, ovvero se una più forte condivisione di esperienze ambientali contribuisce all'eccesso di somiglianza degli MZ rispetto ai DZ, allora il semplice confronto tra MZ e DZ porta ad una sovrastima degli effetti genetici sulla caratteristica in studio.

Dunque, il problema primario del metodo gemellare è stimare la somiglianza tra i fenotipi dei gemelli all'interno delle coppie. In questa fase, gli strumenti sono puramente statistici, e le principali misure utilizzate sono la concordanza (2) e la correlazione.

Successivamente, la questione diventa quella di dedurre, dalle somiglianze (o dalle differenze) osservate, il ruolo svolto dai geni e dall'ambiente nel determinare la variabilità del fenotipo. Ed è qui che trovano applicazione modelli più o meno complessi, le cui assunzioni spesso interessano il campo della genetica.

In questi modelli, un parametro rilevante, nel quale si traduce il quesito di partenza dell'indagine con il metodo gemellare, è quello dell'ereditabilità (1). In generale, essa è definita come proporzione della varianza fenotipica dovuta ai fattori genetici, e quindi misura il contributo dei geni alla variabilità inter-individuale osservata.

Il metodo gemellare è alla base degli studi condotti dal Registro Nazionale Gemelli (RNG), istituito nel 2001 all'Istituto Superiore di Sanità (ISS). L'RNG ha attualmente circa 25.000 gemelli iscritti di cui 3.500 sotto i 12 anni.

L'RNG è impegnato da diversi anni in studi gemellari su patologie pediatriche (3). I primi studi intrapresi hanno riguardato la celiachia e il diabete mellito di tipo 1 (4, 5). Nella celiachia il contributo dei geni, cioè la quota di ereditabilità, è risultata essere dell'87% e il contributo delle esperienze ambientali condivise e non condivise era, rispettivamente, del 12% e dell'1%. Il contributo dei geni alla suscettibilità al diabete mellito di tipo 1 può essere stimato intorno al 63%, le esperienze ambientali non condivise dai gemelli all'interno della coppia si aggirano attorno al 20% e le esperienze condivise contribuiscono per circa il 15%. Per quanto riguarda le abitudini al sonno nel bambini di 18 mesi, invece, l'ereditabilità è risultata essere intorno al 33%

mentre la gran parte della variabilità sembra essere dovuta all'ambiente condiviso dai gemelli (6). L'ereditabilità della velocità di crescita nel primo mese di vita, stimata in un set molto omogeneo di gemelli prematuri, sembra invece esser dovuta in prevalenza ai geni (7). Un altro settore in cui l'RNG ha lavorato è la salute respiratoria nei bambini. Un primo studio su asma e rinite effettuato su circa 400 coppie di gemelli ha mostrato un'alta ereditabilità per entrambe le patologie (92% per l'asma e 78% per la rinite allergica) e una moderata correlazione genetica (58%) (8). Uno studio più recente, su 1000 coppie, in corso di pubblicazione, indaga invece su come fattori ambientali modificabili quali il fumo passivo possano cambiare il peso dei fattori genetici e ambientali nello sviluppo di malattie respiratorie sotto i 2 anni di vita. L'ultimo studio sui bambini, in ordine di tempo, intrapreso dall'RNG è il *MUltiple BIrths COhort Study* (MUBICOS).

Studio MUBICOS

MUBICOS è uno studio longitudinale che ha arruolato una coorte di gemelli nati in 8 ospedali italiani. Lo studio, iniziato nel 2009 con la fase pilota, ha arruolato a oggi più di 350 famiglie di gemelli. Per entrambi i gemelli e i genitori è stato collezionato un campione di DNA che viene conservato nella banca biologica del Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS). I gemelli sono ricontattati a 6, 12 e 18 mesi con questionari postali sullo stato di salute, la crescita e lo sviluppo psicomotorio. I risultati principali, che non necessariamente sfruttano il metodo gemellare, finora conseguiti sono elencati di seguito.

Ereditabilità del peso alla nascita

Il peso alla nascita è un forte determinante di salute non solo infantile ma anche dell'età adulta. David Barker dimostrò infatti una relazione diretta tra basso peso alla nascita e aumento del rischio di morire, in età adulta, per ischemia cardiaca (9). Negli ultimi anni, la relazione tra basso peso e patologie si è estesa a tutti i più importanti disordini umani: obesità, diabete, ipertensione e cancro (10). Nascere sotto peso può accadere in due casi: o perché si nasce prima del tempo, o perché il feto non è stato ben nutrito. Utilizzare dati gemellari consente di appaiare per età gestazionale e ovviare ad alcune di queste difficoltà perché i confronti vengono fatti all'interno della coppia.

Determinare il peso delle componenti genetiche e ambientali è fondamentale per implementare politiche di prevenzione di questo importante indicatore alla nascita.

Utilizzando i dati di peso alla nascita come registrati nella cartella clinica del parto in ogni ospedale partecipante allo studio abbiamo potuto calcolare l'ereditabilità del peso alla nascita per le coppie di gemelli dello stesso sesso. L'ereditabilità del peso alla nascita risulta essere circa del 33% per i maschi mentre invece per le femmine è leggermente più alta (Figura 1).

La componente di ambiente condiviso è circa il 30% per le femmine mentre è il 10% in più per i maschi. A prescindere dalla differenze fra maschi e femmine, che potrebbero dipendere anche dalla numerosità del campione, quello che questo tipo di studio ci mostra è che l'ereditabilità è modesta mentre il più sembra dovuto all'ambiente e soprattutto all'ambiente condiviso dai gemelli (fattori materni). Le implicazioni in termini di sanità pubblica di questo risultato sono ovviamente molto rilevanti.

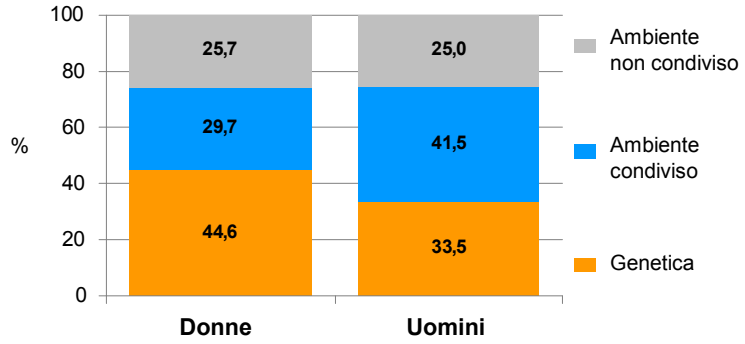

Figura 1. Componenti genetica e ambientale della variabilità del peso alla nascita in coppie di gemelli partecipanti allo studio MUBICOS

Capire quali sono i fattori di rischio (es. fumo materno, alimentazione, attività fisica, ecc.) sui quali è possibile agire a livello materno porterebbe probabilmente a una riduzione del fenomeno del basso peso alla nascita. Un quarto invece della variabilità è spiegata, per entrambi i sessi, da variabili ambientali che i gemelli non condividono.

Esiti neonatali in gemelli da procreazione medicalmente assistita e in gemelli spontanei

Obiettivo dello studio era il confronto delle complicazioni della gravidanza e degli esiti neonatali, in particolare della velocità di crescita nei primi 6 mesi di vita, nei gemelli bicoriali concepiti spontaneamente e nei gemelli bicoriali da Procreazione Medicalmente Assistita (PMA). Alcuni studi hanno trovato un'associazione fra una rallentata crescita intrauterina, seguita da un aumento di peso eccessivo nei primi mesi di vita, e alcune malattie dell'adulto quali diabete, obesità e sindrome metabolica (10, 11). I gemelli sono stati classificati come provenienti da PMA in base alle informazioni da cartella clinica. Le informazioni disponibili per 267 coppie di gemelli erano: età materna, corionicità, parità, preeclampsia, uso prenatale di steroidi, parto prematuro, modalità di parto, punteggio apgar, ammissione in Terapia Intensiva Neonatale (TIN), peso alla nascita, sindrome da distress respiratorio, sepsi, basso peso per età gestazionale (*Small for Gestational Age*, SGA), allattamento materno e durata di degenza. La velocità di crescita è stata calcolata in g/kg/die utilizzando la formula esponenziale (12). La regressione logistica multipla ha standardizzato per ospedale di nascita, e gli errori standard delle stime sono stati calcolati tenendo conto dei dati gemellari.

I gemelli da PMA hanno una probabilità maggiore che vengano loro somministrati corticosteroidi nel periodo prenatale (*Odds Ratio*, OR=3,5; Intervallo di Confidenza (IC) 95%: 1,7-7,2), di sviluppare sepsi (OR=12,3; IC95%: 1,1-140,0), hanno una più lunga durata di degenza (OR=1,04; IC 95%: 1,0-1,1) e una probabilità minore di essere allattati esclusivamente al seno (OR=2,9; IC 95%: 1,4-5,9). Inoltre crescono più velocemente nei primi 6 mesi di vita rispetto ai gemelli non da PMA (OR=13,5, IC 95%: 2,0-88,5) (Figura 2).

In conclusione, i gemelli bicoriali da PMA hanno un rischio più elevato per alcuni esiti sia ostetrici sia neonatali che possono influenzare negativamente la loro salute futura. Il risultato della crescita molto veloce nei primi 6 mesi di vita va monitorato insieme ad altri esiti registrabili nella coorte. La disponibilità di dati gemellari permetterà, quando la zigosità delle coppie sarà disponibile, di stimare l'importanza dei geni e dell'ambiente nel determinare alcuni di questi esiti.

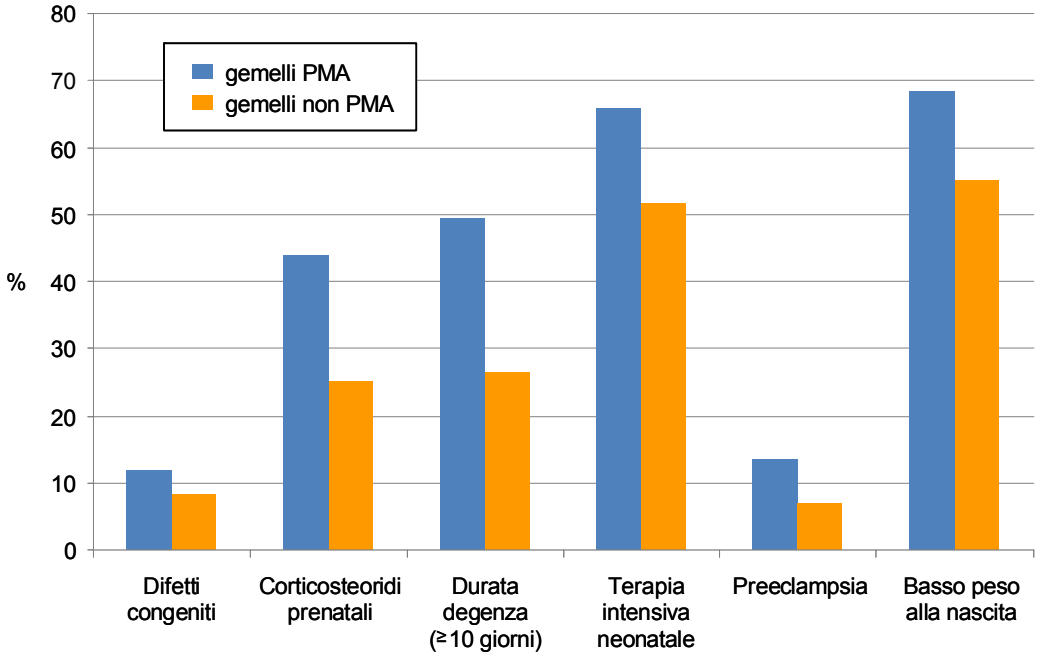

Figura 2. Frequenze di alcuni esiti ostetrici e neonatali in coppie dei gemelli da PMA e in coppie dei gemelli da gravidanze spontanee

Conclusioni

Il focus di questo contributo è sulle attività dell'RNG dell'ISS che riguardano la ricerca pediatrica. L'RNG tra le sue attività si inserisce in un programma europeo di ampio respiro. L'ISS infatti, è il partner italiano del progetto HEALS (*Health and Environment-wide Associations based on Large population Surveys*) attraverso il quale saranno osservati fin dalla nascita 1500 gemelli neonati in 10 Paesi europei. Si tratterà di un approccio integrato che valuterà il ruolo delle esposizioni ambientali e della variabilità epigenetica, dal concepimento in poi. Gli studi su popolazioni gemellari sono stati fondamentali nella ricerca biomedica, quantificando il contributo relativo della genetica e dell'ambiente all'insorgenza di tantissime patologie e fornendo stime della loro "ereditabilità". Nell'era dell'epigenetica, che studia l'insieme dei meccanismi che "accendono e spengono" la traduzione del DNA in proteine, il ruolo degli studi gemellari assume un risalto ancora maggiore e, in particolare, l'osservazione longitudinale di gemelli fin dalla nascita diventa un potente strumento di ricerca in sanità pubblica.

Bibliografia

1. Sham P. *Statistics in human genetics*. New York: Wiley; 1998.
2. Witte JS, Carlin JB, Hopper JL. Likelihood-based approach to estimating twin concordance for dichotomous traits. *Genet Epidemiol* 1999;16:290-304.

3. Brescianini S, Fagnani C, Toccaceli V, Medda E, Nisticò L, D'Ippolito C, Alviti S, Arnofi A, Caffari B, Delfino D, Ferri M, Penna L, Salemi M, Sereni S, Serino L, Cotichini R, Stazi MA. An update on the Italian Twin Register: advances in cohort recruitment, project building and network development. *Twin Res Hum Genet* 2013;16(1):190-6.
4. Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, Paparo F, D'Alfonso S, Giordano M, Sferlazzas C, Magazzù G, Momigliano-Richiardi P, Greco L, Stazi MA. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut* 2006;55(6):803-8.
5. Nisticò L, Iafusco D, Galderisi A, Fagnani C, Cotichini R, Toccaceli V, Stazi MA; Study Group on Diabetes of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. Emerging effects of early environmental factors over genetic background for type 1 diabetes susceptibility: evidence from a Nationwide Italian Twin Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(8):E1483-91.
6. Brescianini S, Volzone A, Fagnani C, Patriarca V, Grimaldi V, Lanni R, Serino L, Mastroiacovo P, Antonietta Stazi M. Genetic and environmental factors shape infant sleep patterns: a study of 18-month-old twins. *Pediatrics* 2011;127(5):e1296-302.
7. Brescianini S, Giampietro S, Cotichini R, Lucchini R, De Curtis M.Genetic and environmental components of neonatal weight gain in preterm infants. *Pediatrics* 2012;129(2):e455-9.
8. Fagnani C, Annesi-Maesano I, Brescianini S, D'Ippolito C, Medda E, Nisticò L, Patriarca V, Rotondi D, Toccaceli V, Stazi MA. Heritability and shared genetic effects of asthma and hay fever: an Italian study of young twins. *Twin Res Hum Genet* 2008;11(2):121-31.
9. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1986;341:938-41.
10. Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod* 1997;2(2):105-11.
11. Ross MG, Beall MH. Adult sequelae of intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol* 2008;32(3):213-8.
12. Patel AL, Engstrom JL, Meier PP, Kimura RE. Accuracy of methods for calculating postnatal growth velocity for extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2005;116(6):1466-73.