

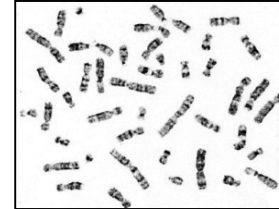
LEZIONE VI

- *Citogenetica molecolare*
- *Malattie complesse*
- *Prevenzione delle malattie genetiche (consulenza genetica, test genetici)*
- *Genetica e cancro*

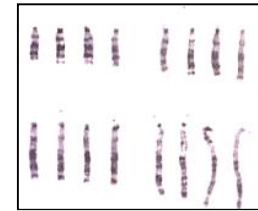
Citogenetica Molecolare

La “rivoluzione” citogenetica

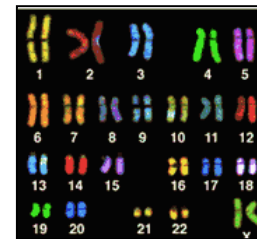
- ❑ 1970: Tecniche di bandeggiamento (5-10 Mb)



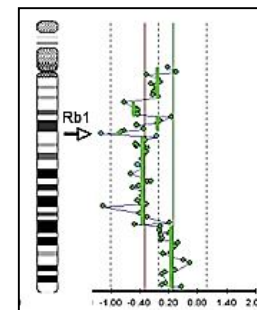
- ❑ 1980: Alta risoluzione cromosomica (>4 Mb)



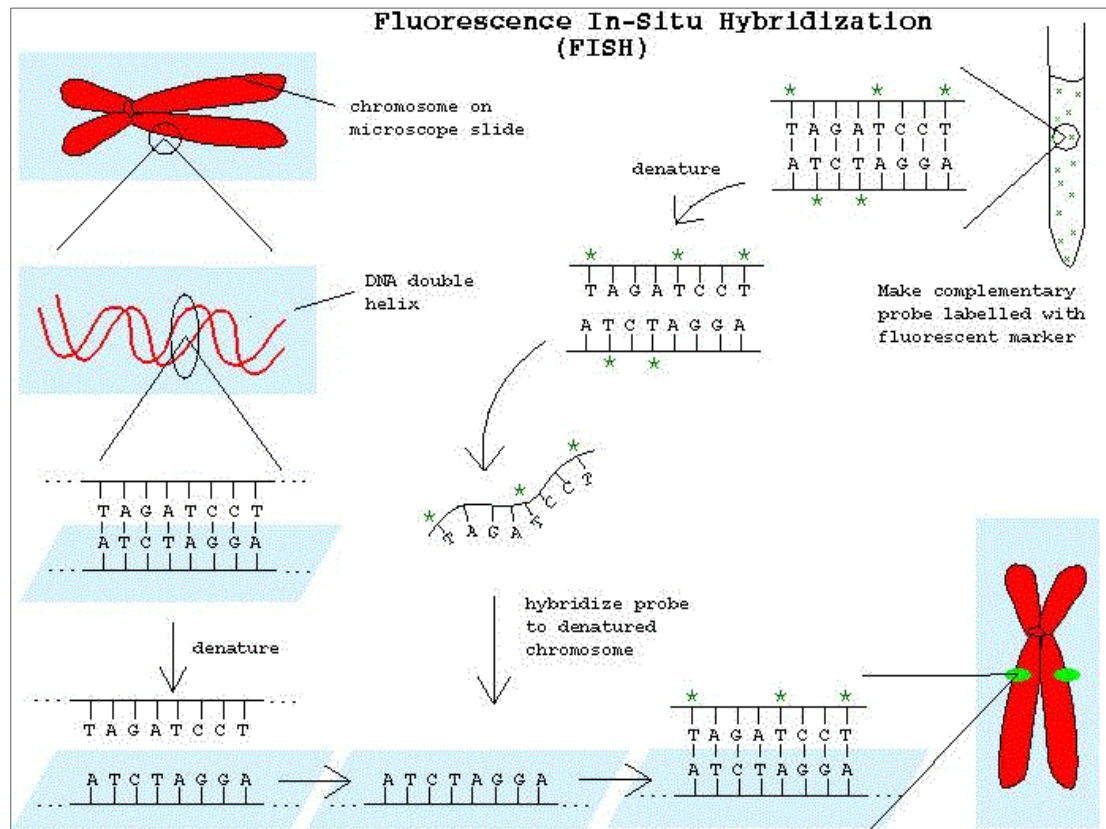
- ❑ 1990: Citogenetica molecolare
Fluorescent In Situ Hybridization (FISH, 40-100 kb)



- ❑ 2000: CGH-array e CGH-microarray (1 Mb - 5 kb)

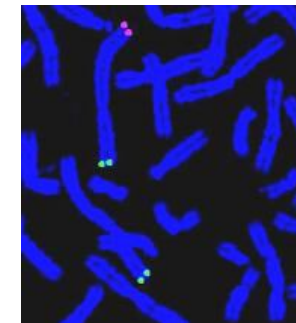


Fluorescent In Situ Hybridization



E' una tecnica di ibridazione che permette, dopo fissazione di metafasi e nuclei in interfase su vetrino, di identificare sequenze specifiche negli acidi nucleici.

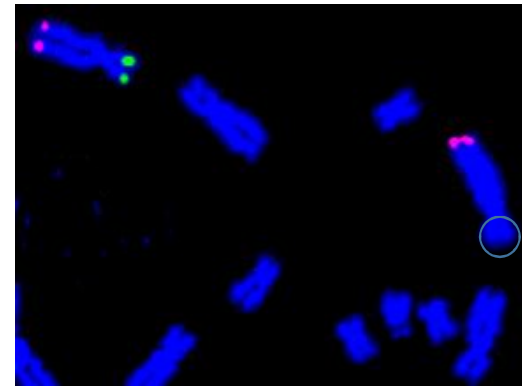
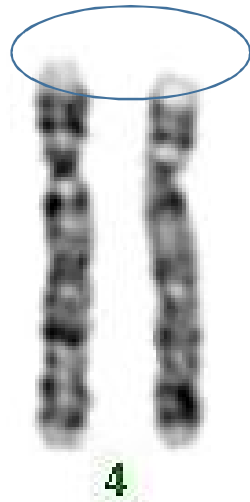
Tale identificazione avviene mediante **sonde marcate** in maniera non isotopica, impiegando **fluorocromi** che emettono a diverse lunghezze d'onda.



Confermare una diagnosi clinica



sindrome di Wolf-Hirschhorn



del(4p16)

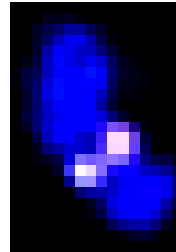
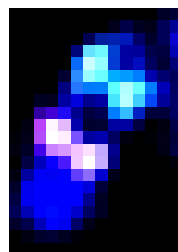
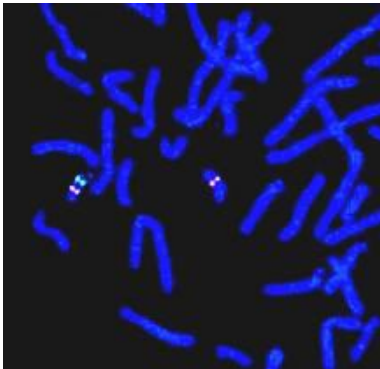
Definire le basi biologiche di sindromi note:
sindrome di DiGeorge/Velocardiofacciale e del(22q11.2)



Incidenza: **1/6000** nati vivi

Caratteristiche cliniche:

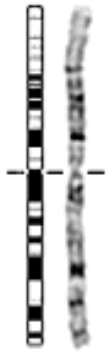
- Anomalie facciali
- Difetti cardiaci
(**TRONCOCONALI**)
- Labiopalatoschisi
- Deficit immunitario
- Ipocalcemia neonatale
- Ritardo mentale



Difetto genetico: **microdelezione 22q11.2**

Dalla citogenetica molecolare per ibridazione in situ agli arrays

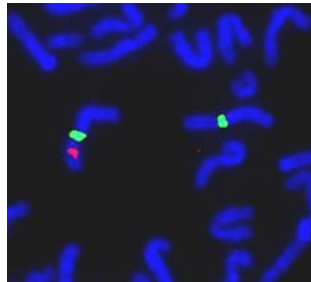
Anni '60-80: cariotipo



~5-10Mb

analisi genomica
a bassa risoluzione

>anni '90:
citogenetica molecolare



~40-100kb

>2000



analisi genomica ad elevata
risoluzione locus-specifica

“cariotipo molecolare”

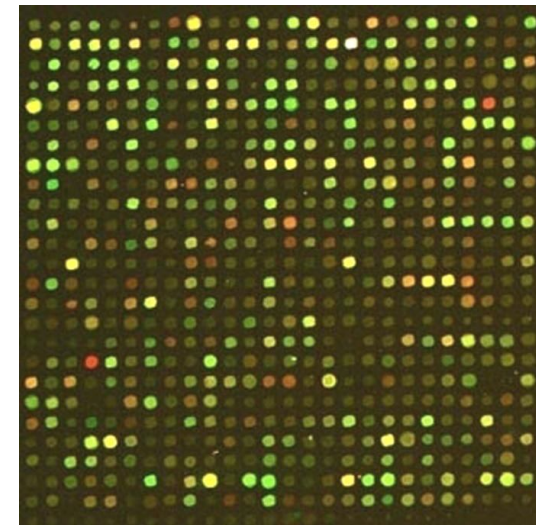
Arrays

La FISH, nonostante sia di grande applicazione nella diagnosi clinica odierna, è necessariamente limitata dal fatto di essere una tecnica di "**indagine mirata**": la sua applicazione consente solo di poter individuare mutazioni specifiche a livello di precisi loci cromosomici.

Con l'impiego della tecnica **Array-CGH** (cariotipo molecolare) si è grado di valutare la presenza di eventuali **anomalie cromosomiche a livello dell'intero genoma in un unico esperimento**, senza sapere in anticipo cosa cercare.

Arrays

- ❑ Analizzano l'intero genoma in un singolo esperimento, in base al legame del DNA da testare con il DNA fissato sul substrato
- ❑ La risoluzione dipende dalla lunghezza delle sequenze e dal numero degli *spots*
- ❑ Utilizzano diversi tipi di sonde: BAC (80-200 Kb), cloni di cDNA (0.5-2.5 Kb), prodotti di PCR (100 bp- 1.5 Kb), oligonucleotidi (25-80 nt), SNPs (25 nt)



Principali indicazioni all'analisi citogenetica standard: vita postnatale

- Persone con sospetta o documentata sindrome cromosomica**

per confermare la diagnosi o definire il tipo di anomalia (per es. sindrome di Down da traslocazione)

- Genitori e familiari di pazienti con patologia cromosomica**

per ricercare eventuali anomalie bilanciate (ad es. traslocazioni) o mosaicismi

- Persone con ritardo mentale non sindromico**

40% dei ritardati con QI <55 e 10-20% di quelli con QI di 55-70 hanno una patologia cromosomica

- Soggetti con due o più malformazioni non sindromiche**

eventuale inquadramento in una patologia cromosomica

- Ritardo di accrescimento non sindromico**

è un sintomo specifico comune alla maggior parte degli sbilanciamenti cromosomici

- Persone con genitali ambigui**

per definire il sesso genetico e ricercare eventuali mosaicismi

- Maschi con oligospermia o azoospermia**

il 5-10% presenta un'anomalia cromosomica

- Amenorrea primaria (*) o secondaria**

(*) soprattutto se associata a bassa statura

- Coppie con poliabortività**

nel 5-10% dei casi uno dei partner è eterozigote per un'anomalia cromosomica bilanciata

- Neonati nati morti con malformazioni o con causa non accertata**

5-10% di queste morti sono dovute ad uno sbilanciamento cromosomico

- Caratterizzazione del cariotipo delle cellule tumorali**

Principali indicazioni all'analisi citogenetica standard: vita prenatale

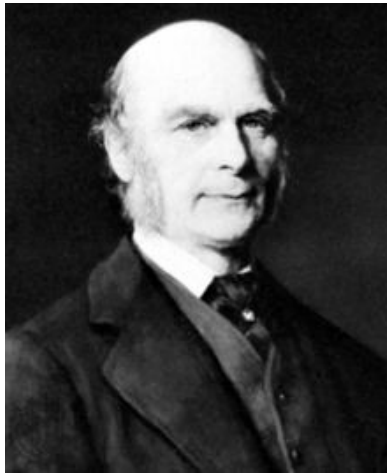
- ❑ Madri attempate ≥ 35 anni l'aumento del rischio di aneuploidia correla con l'età materna
- ❑ Genitori con **precedente figlio affetto** da aneuploidia rischio di ricorrenza circa 1% nelle coppie giovani (possibile mosaicismo parentale)
- ❑ **Genitori eterozigoti** per anomalie cromosomiche
- ❑ **Malformazioni fetali eco-evidenziate** circa il 20% di questi feti è sbilanciato
- ❑ **Alterazioni biochimiche** nella madre nel I-II trimestre
bilanciate aumento del rischio di concepimenti sbilanciati
aumento dei valori di gonadotropina corionica, riduzione dell'alfa-fetoproteina e dell'estriolo non coniugato predicono nel secondo trimestre circa il 70% delle gravidanze con feto affetto da trisomia 21; sono disponibili diversi protocolli biochimici; falsi positivi $\geq 5\%$

MALATTIE COMPLESSE/MULTIFATTORIALI

Classificazione delle malattie genetiche

- ❑ Malattie mitocondriali
- ❑ Malattie cromosomiche
 - ↗ numeriche
 - ↘ strutturali
- ❑ Malattie genomiche
- ❑ Malattie mendeliane
 - ↗ autosomiche dominanti e recessive
 - ↘ X-linked dominanti e recessive
- ❑ Malattie da alterato *imprinting*
- ❑ **Malattie multifattoriali**

Modello dei caratteri continui

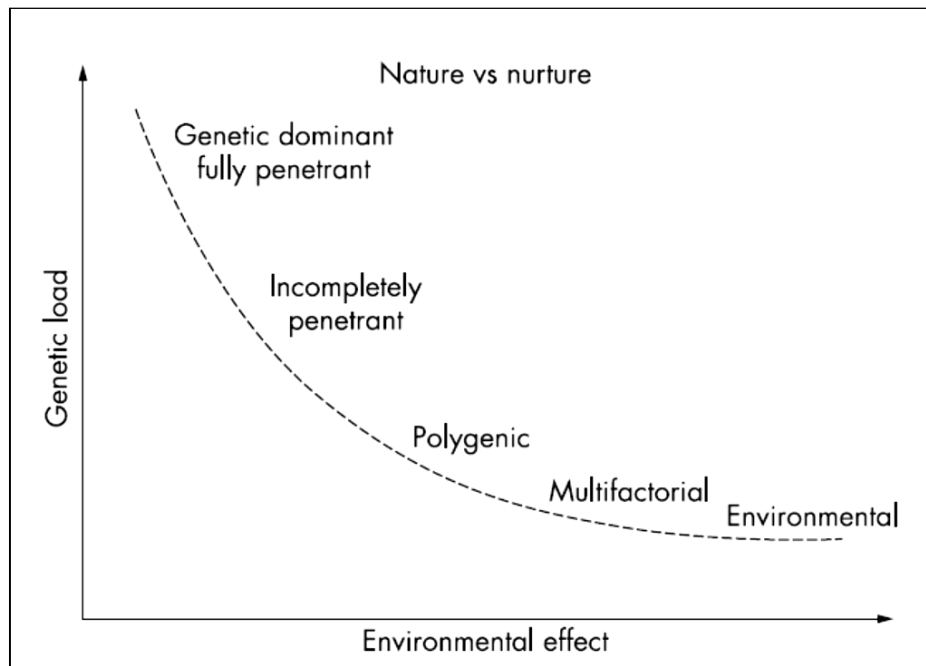


Sir Francis Galton
(1822-1911)

All'inizio del secolo scorso, quando si sono riscoperte le leggi di Mendel, è stato ipotizzato **un altro modello di trasmissione dei caratteri**. Questo modello riguardava dei caratteri che a differenza di quelli mendeliani, che sono caratteri discontinui cioè del tutto o nulla (presenza o assenza della malattia), erano **caratteri continui** cioè **caratteri che sono misurabili** (statura, ipertensione arteriosa, circonferenza cranica). **Francis Galton**, cugino di Charles Darwin, sviluppò questo tipo di modello.

Geni vs ambiente

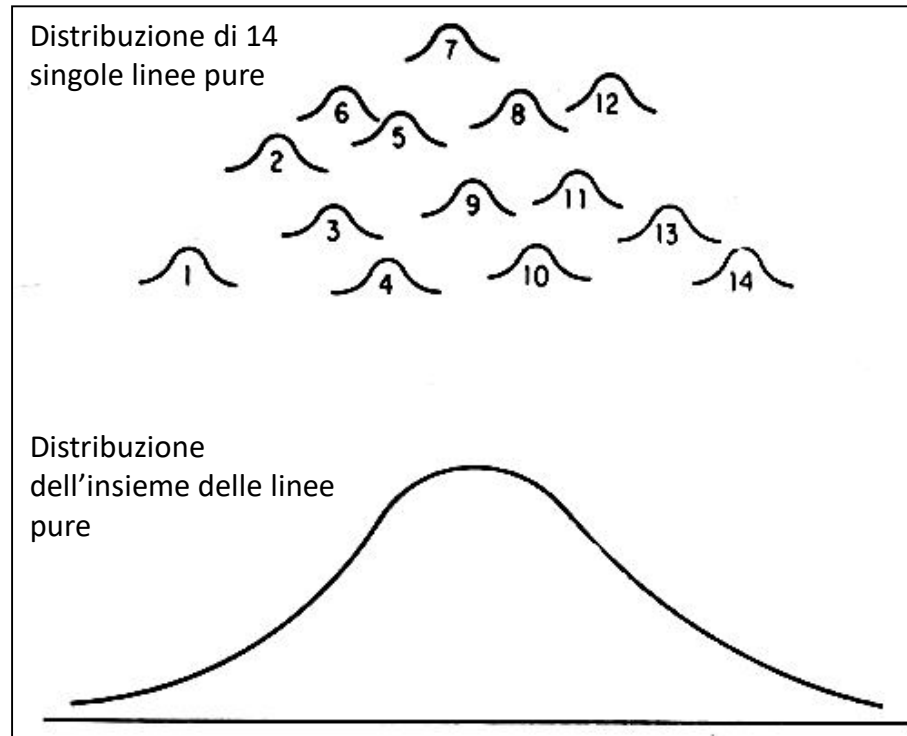
G



A

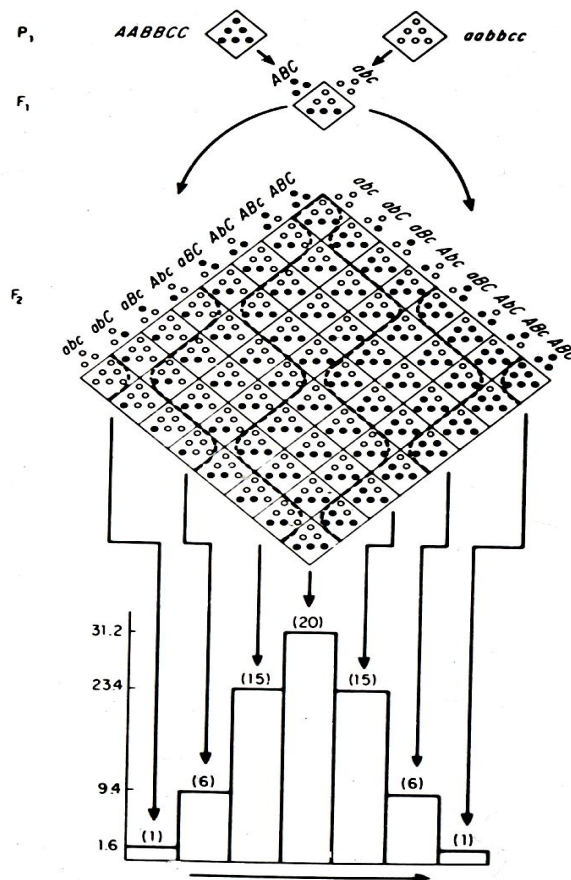
Ci sono dei caratteri che sono fortemente sotto il **controllo genico** (caratteri dominanti e recessivi) come ci sono caratteri dovuti **completamente all'ambiente** (un'ustione, un trauma da caduta). In mezzo ci sono altri caratteri che hanno caratteristiche intermedie come i caratteri mendeliani con **difetto di penetranza** (qualche soggetto che ha la mutazione non la esprime) per passare ai **caratteri complessi** cioè a quelli **poligenici** dovuti all'azione di più geni (caratteri misurabili) e ai caratteri **multifattoriali** dovuti all'interazione tra geni ed ambiente

Distribuzione di 14 “linee pure” e del loro insieme (linee pure di Johanssen, fenotipo: peso dei fagioli)



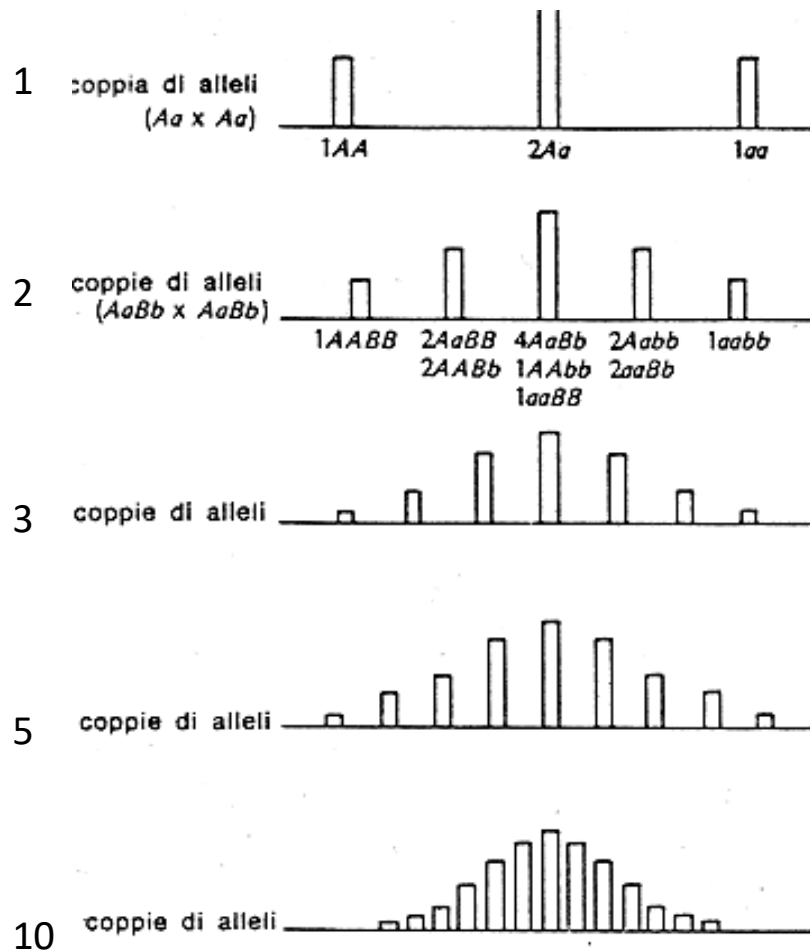
Tra i vari esperimenti quello che viene maggiormente citato per avere dato l'avvio alla comprensione dei meccanismi dei caratteri complessi è questo esperimento eseguito da un botanico genetista danese, Johanssen, che considerò un carattere misurabile che era il **peso del fagiolo**. Partendo da piante che erano fortemente impollinate si rese conto che **la maggior parte dei discendenti di quella pianta geneticamente pura avevano un peso medio mentre altri avevano degli scostamenti in più o in meno**. La conclusione fu che le variazioni erano dovute all'ambiente e da allora si cominciò a parlare di **interazione geni-ambiente**.

Poligenia



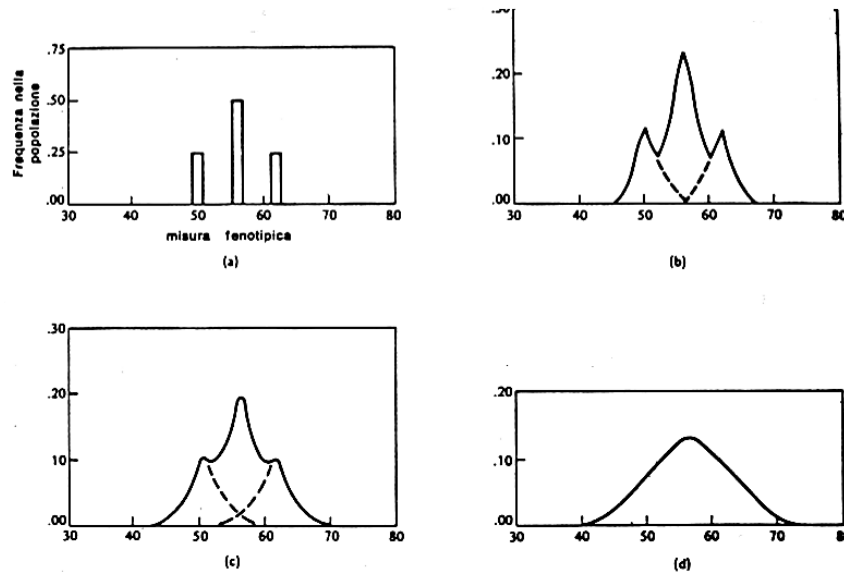
Questo esperimento fa riferimento al **colore della cariosside del frumento** (potrebbe essere anche il colore della pelle umana). Sappiamo che c'è una continuità nel colore : si può andare da un **colore estremamente bianco al colore estremamente pigmentato**. In questo esperimento la variazione dal bianco al rosso è dovuto all'interazione **di tre geni** diversi che con un **effetto di tipo additivo** danno tutte le variazioni di colore. In questa situazione esistono **64 tipi di combinazioni** diverse che vanno dal colore bianco al colore rosso con una serie di colori intermedi. Questo è l'effetto di un **carattere continuo poligenico** dove ci sono delle variazioni continue nel passaggio da una categoria all'altra.

Poligenia



Se partiamo da un sistema semplice controllato da una **coppia di alleli** avremo **quattro combinazioni** ma **tre sistemi**. Se aggiungiamo un'altra coppia di alleli il sistema si complica (seconda legge di Mendel) avremo 16 combinazioni. Se andiamo a 3 coppie di alleli abbiamo 64 combinazioni. Per cinque alleli arriviamo a oltre 250 combinazioni e così via.

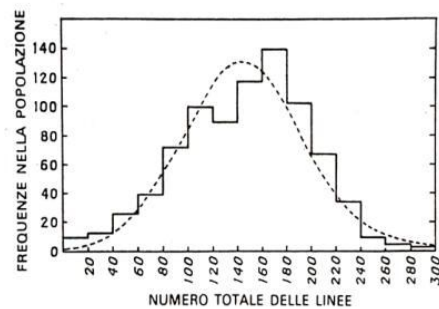
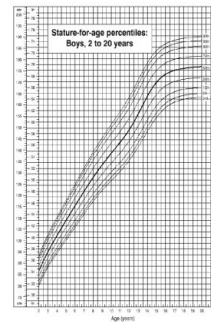
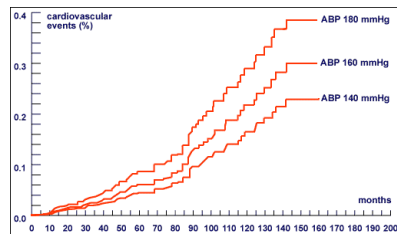
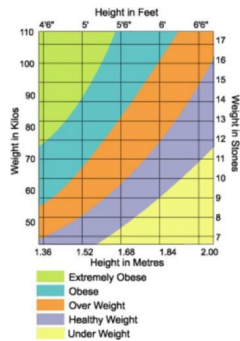
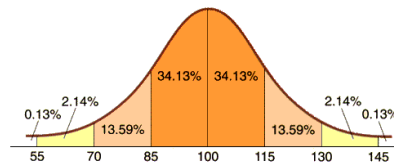
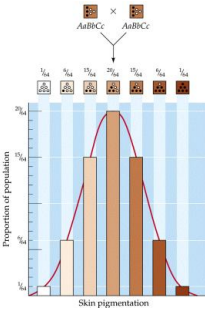
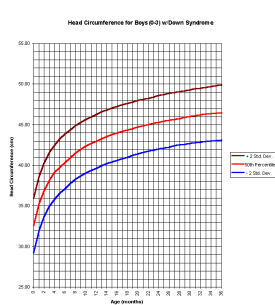
Effetto di diversi livelli di influsso dell'ambiente



Effetto di diversi livelli di influsso dell'ambiente sull'espressione fenotipica dei genotipi F2 prodotti dalla segregazione di una singola differenza per un gene

Ognuna delle combinazioni dei caratteri continui rappresenta una categoria per cui sull'istogramma dovremmo vedere delle differenze nette tra una categoria e l'altra. In realtà queste **differenze vengono smussate dall'effetto dell'ambiente**. Man mano che al numero delle combinazioni dovute alle caratteristiche genetiche aggiungiamo un effetto integrativo dell'ambiente, le differenze tra una categoria e l'altra diventano più lievi e alla fine, **quando avremo una buona integrazione tra un sistema genetico complesso ed un sistema ambientale che agisce sul sistema complesso, avremo la distribuzione continua**.

Esempi di caratteri poligenici



1. Circonferenza cranica
2. Colore della pelle
3. Intelligenza (Q.I.)
4. Peso corporeo
5. Pressione del sangue
6. Statura
7. Numero delle creste sui polpastrelli (dermatoglifi)

Ereditabilità

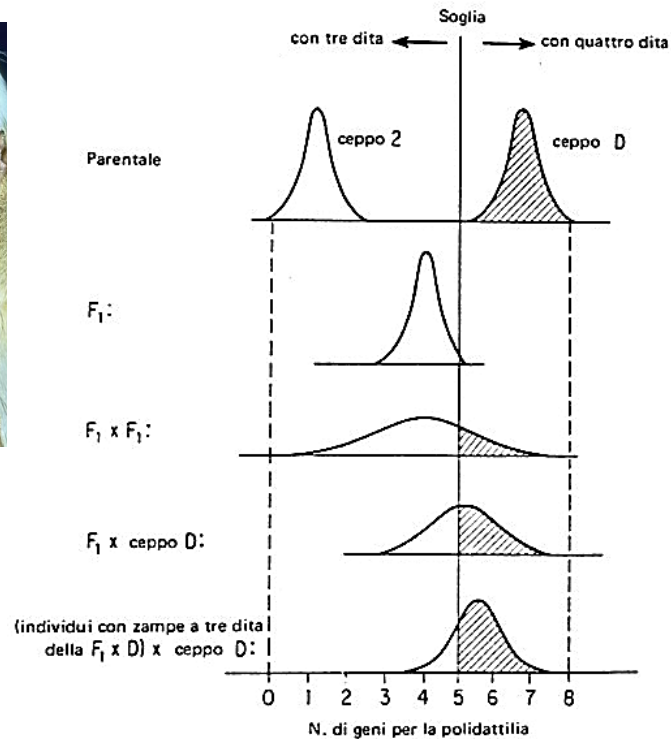
La **componente genetica di un sistema complesso** viene definita ereditabilità. Una formula per calcolare l'ereditabilità è quella che sottrae la concordanza dei gemelli monozigoti da quella dei gemelli dizigoti diviso 1 meno la concordanza dei gemelli dizigoti.

$$h^2 = \frac{CMZ - CDZ}{1 - CDZ}$$

Ereditabilità di alcune patologie multifattoriali

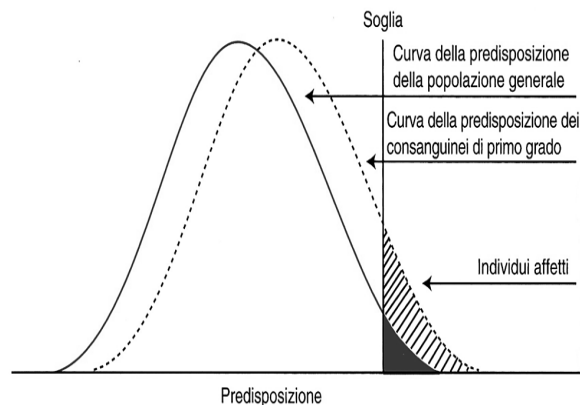
Patologia	Frequenza (%)	Ereditabilità
Anencefalia/spina bifida	0,1	60
Asma	4	80
Cardiopatie congenite	0,5 - 1	35
Coronaropatie	3	65
Ipertensione	5	62
Labio/palatoschisi	0,1	76
Lussazione dell'anca	0,1	60
Piede torto	0,1	68
Schizofrenia	1	85
Spondilite anchilosante	0,2	70
Ulcera peptica	4	37

Fenotipo discontinuo



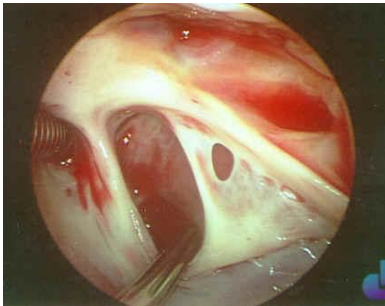
Mentre il carattere continuo è rappresentato da una curva gaussiana nella quale siamo tutti rappresentati, **il carattere discontinuo** è assenza o presenza di un carattere ed è regolato dal sistema dell'eredità multifattoriale definita in questo caso **eredità a soglia**. L'idea di questo modello nasce da alcuni esperimenti di cui quello più significativo è qui rappresentato. In questo caso il difetto è il numero di dita della zampa posteriore di un topolino, normalmente sono tre ma esiste una patologia con 4 dita. Incrociando soggetti con 3 dita con soggetti con 4 dita si ottiene una F_1 dove la maggior parte dei soggetti hanno 3 dita mentre pochissimi ne hanno 4. Incrociando tra di loro le generazioni successive, il numero di soggetti patologici aumenta. Quindi sono patologici solamente gli animali che superano un certo livello soglia empiricamente definito.

Eredità “a soglia”



Ci sono due curve a campana, una continua, che misura e indica la **distribuzione dei fattori di suscettibilità ad un carattere complesso nella popolazione generale**, e l'altra tratteggiata indica la distribuzione di quei fattori di suscettibilità nei consanguinei di un paziente. La linea verticale indica **la soglia** cioè quel **parametro empirico al di là del quale si manifesta il quadro patologico mentre al di qua sono i soggetti sono fenotipicamente normali**. Quindi questo grafico ci dice che, nella popolazione generale, i **fattori di suscettibilità si distribuiscono secondo una curva normale** per un qualunque carattere complesso e la distribuzione normale ci dice che la maggior parte dei soggetti ha un numero medio di fattori di suscettibilità, una piccola parte di soggetti ha un piccolo numero di fattori di suscettibilità e un piccolo numero di soggetti un grande numero di fattori di suscettibilità e quelli che cadono al di là della soglia avranno il carattere patologico. La **curva dei consanguinei** ci dice che, siccome i consanguinei di una persona ammalata condividono un numero maggiore di fattori di suscettibilità rispetto alla popolazione generale, il rischio di sviluppare quel quadro patologico sarà aumentato. **Più è stretto il legame di parentela tanto più elevato sarà il numero di soggetti che ammalano di quella patologia.**

Esempi di difetti congeniti ad eredità multifattoriale



cardiopatie
congenite



lussazione
congenita dell'anca



difetti del tubo
neurale



piedi torti



labio/palatoschisi



stenosi ipertrofica
del piloro

Esempi di malattie ad eredità multifattoriale



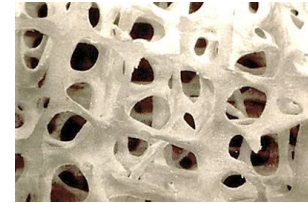
asma



obesità



cardiopatie
ischemiche



osteoporosi



diabete
mellito



malattie infiammatorie
croniche dell'intestino



ipertensione



schizofrenia

Fattori che condizionano il rischio di ricorrenza di un carattere discontinuo

- 1. **Gravità** del fenotipo
- 2. **Numero** di consanguinei affetti
- 3. **Grado di consanguineità** con una persona affetta
- 4. **Sesso** della persona (solo per alcuni caratteri)

Gravità del fenotipo

Rischi empirici di ricorrenza delle labio/palatoschisi nei consanguinei di primo grado di un paziente

Labioschisi bilaterale + palatoschisi	5,7%
Labioschisi monolaterale + palatoschisi	4,2%
Labioschisi monolaterale	2,5%



Numero dei consanguinei affetti

Rischi di ricorrenza (%) nelle labio/palatoschisi

Nessun figlio affetto

+ genitori non affetti	0,1
+ un genitore affetto	3
+ entrambi i genitori affetti	34

Un figlio affetto

+ genitori non affetti	3
+ un genitore affetto	11
+ entrambi i genitori affetti	40

Due figli affetti

+ genitori non affetti	9
+ un genitore affetto	19
+ entrambi i genitori affetti	45

Un figlio e un consanguineo di secondo grado affetti

+ genitori non affetti	6
+ un genitore affetto	16
+ entrambi i genitori affetti	43

Un figlio e un consanguineo di terzo grado affetti

+ genitori non affetti	4
+ un genitore affetto	14
+ entrambi i genitori affetti	44

Grado di consanguineità con una persona affetta

Rischi di ricorrenza in rapporto al grado di consanguineità con il paziente

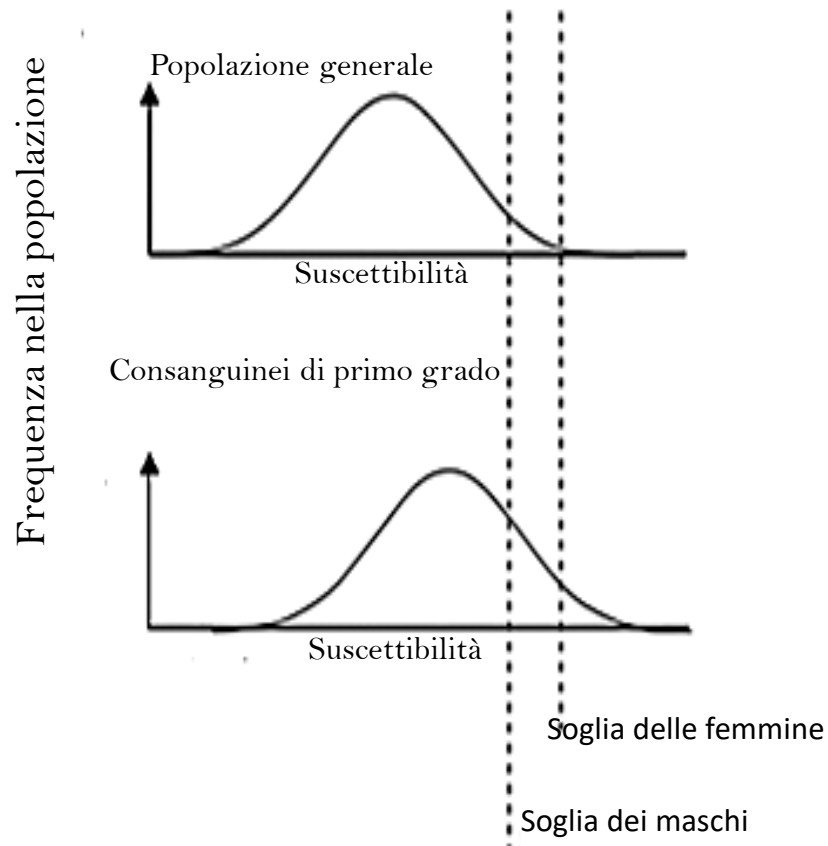
	Popolazione			
	Generale	I°	II°	III°
Autismo	0,04	4,5	0,1	0,05
Labio/ palatoschisi	0,1	4	0,7	0,3
Lussazione dell'anca	0,2	5	0,6	0,4
Piede torto	0,1	4,5	0,1	0,05

Caratteri discontinui a diversa prevalenza nei due sessi

Malattia	Rapporto M:F
Artrite reumatoide	1 : 3
Lussazione congenita dell'anca	1 : 6
Piede torto	2 : 1
Ulcera peptica	2 : 1
Stenosi ipertrofica del piloro	5 : 1

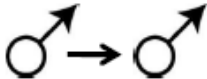

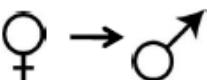
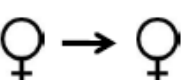
Rischi di ricorrenza in rapporto al sesso del genitore affetto

Eredità “a soglia” di una malattia più comune nel sesso maschile



Sesso della persona trasmittitrice

Rischi di ricorrenza della stenosi ipertrofica del piloro

Rapporto di parentela		Frequenza (%)	Aumento del rischio rispetto alla popolazione dello stesso sesso
Consanguinei di un paziente		5	10 volte
Consanguinee di un paziente		2	20 volte
Consanguinei di una paziente		17	35 volte
Consanguinee di una paziente		7	70 volte

PREVENZIONE
DELLE
MALATTIE GENETICHE

Prevenzione delle malattie genetiche

La PREVENZIONE viene schematicamente suddivisa in:

Prevenzione primaria: deve tendere a **non fare avvenire la procreazione di soggetti ammalati**

Prevenzione secondaria: deve **evitare che la malattia si manifesti**

La Prevenzione primaria comprende:

Prevenzione **Preconcezionale**

Prevenzione **Prenatale**

In casi di correzione di difetti malformativi o di somministrazioni terapeutiche in utero la prevenzione prenatale è anche secondaria

Strumenti della prevenzione

**consulenza genetica e
test genetici**

**sono gli strumenti base
della prevenzione della
malattie genetiche**

Consulenza genetica

Genetic Counseling is aimed to provide people with an **understanding of the genetic problems in their families.**



Sheldon Reed, 1947



Consulenza Genetica



Obiettivo: mettere il paziente in condizione di compiere scelte informate e consapevoli

Fasi della consulenza

❑ **Raccolta delle informazioni:**

Viene effettuata tramite **l'anamnesi personale e familiare** del probando.

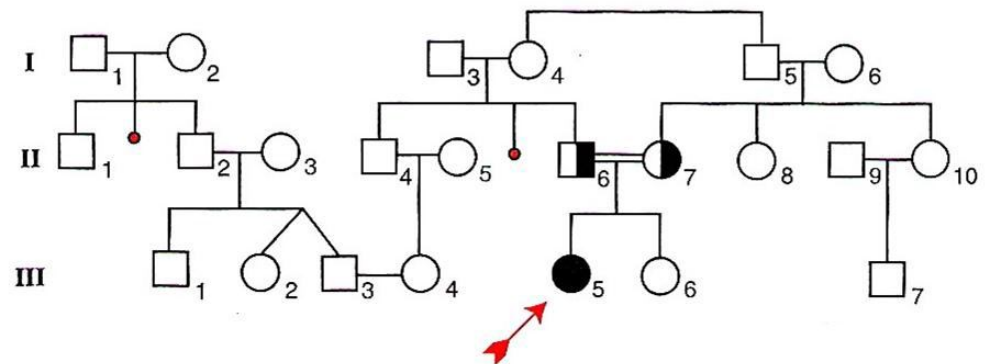
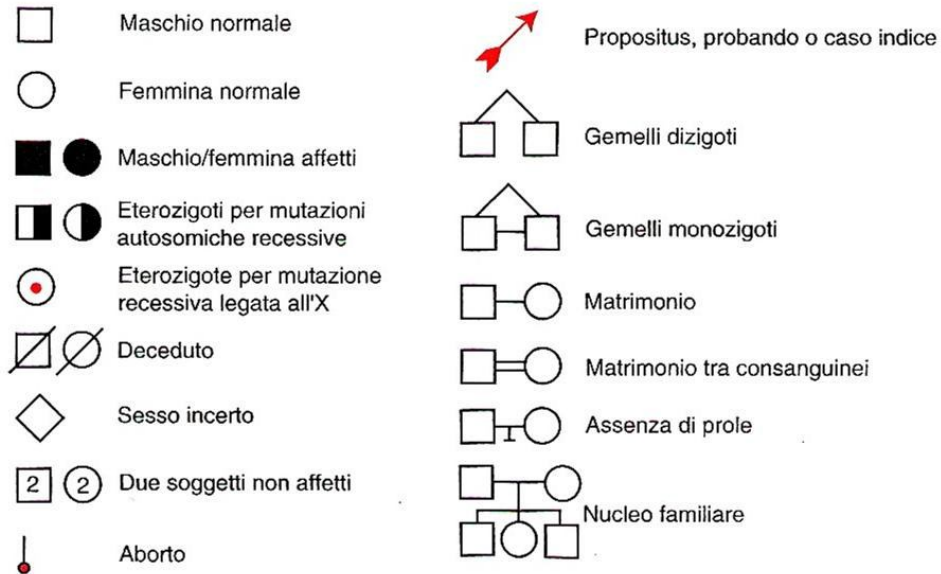
E' un momento fondamentale, in cui vengono raccolte tutte le informazioni necessarie.

A tal fine possono essere utili, oltre alle cartelle cliniche e alle varie **documentazioni sanitarie**, anche fotografie dei familiari deceduti.

❑ **Ricostruzione dell'albero genealogico (pedigree):**

è una **ricostruzione grafica** che consente di raccogliere le **informazioni di carattere genetico** della famiglia in esame

Albero genealogico



Fasi della consulenza

❑ **Visite specialistiche:**

vengono richieste dal genetista per confermare o escludere altri eventuali segni minimi della malattia nel probando e nei suoi familiari

❑ **Esami di laboratorio:**

per quelle malattie genetiche in cui si conosce il difetto genetico comprendono

test genetici

analisi del DNA e/o

dei cromosomi (cariotipo)

❑ **Esami strumentali**

Fasi della consulenza

❑ *Calcolo del rischio genetico:*

è la possibilità che una condizione patologica a base genetica presente nel probando si verifichi nuovamente in altri membri appartenenti alla stessa famiglia

Il calcolo del rischio si basa **sull'accertamento della modalità di trasmissione della malattia, sui dati strumentali e di laboratorio disponibili e sulla posizione del probando all'interno della famiglia.**

Il rischio genetico può essere fornito *in termini probabilistici* o con *un valore percentuale*.

Test genetici: definizione



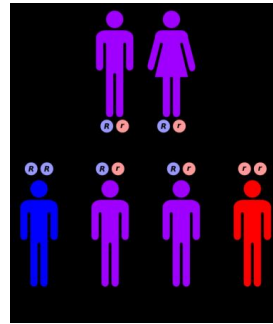
“I test genetici sono analisi finalizzate ad individuare la presenza, l’assenza o la mutazione di un particolare cromosoma, di un gene, del prodotto di un gene o di un metabolita, indicative di una specifica modificazione genetica”.

UK Human Genetic Commission (2009)

I test genetici nella pratica clinica



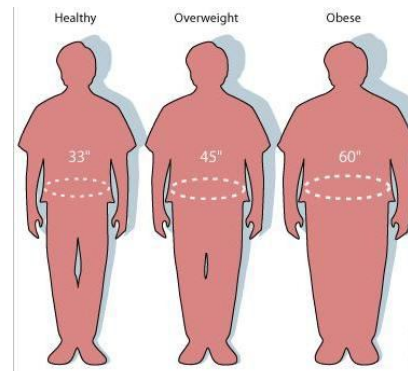
diagnostici



portatori sani



presintomatici



predittivi



di farmacogenetica

Test diagnostici

Si effettuano **sulle persone che hanno, o si sospetta che abbiano, una particolare malattia**

Il quesito che tentano di risolvere è se il paziente **abbia o non abbia una determinata malattia** e non se la svilupperà in un certo momento della sua vita.

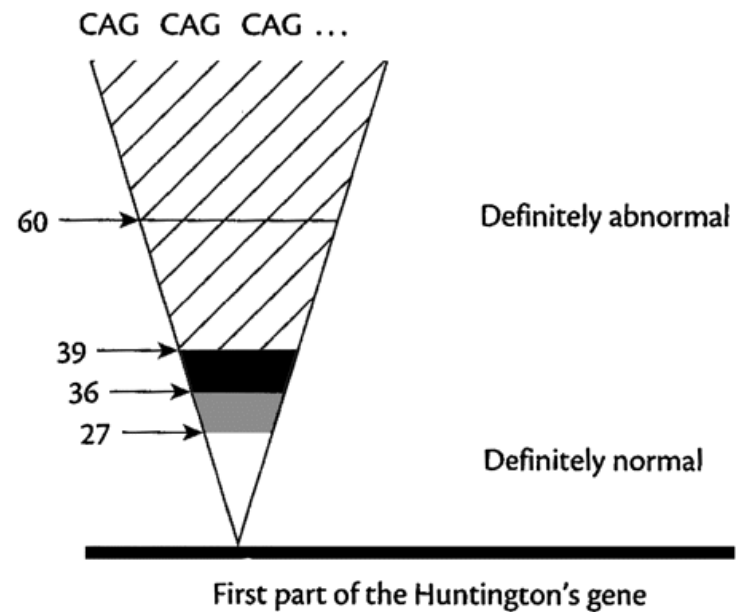
- **Fare diagnosi** (per es. diagnosticare malattie nelle quali l'esame clinico non è conclusivo)
- **Validare una diagnosi clinica** (per es. sindrome di Down)
- **Scegliere la terapia più appropriata** (per es. iperplasia congenita del surrene -gene CYP21A-: prevenire la virilizzazione nelle femmine e la pubertà precoce nei maschi)
- Delineare la storia naturale delle malattie, **stabilire correlazioni genotipo-fenotipo**
- **Evitare diagnosi strumentali inutili** (per es. analisi genetiche nelle famiglie con poliposi adenomatosa del colon - gene APC)

Test per identificare i portatori di geni-malattia

- Identificare le persone a rischio mediante **'screening di popolazione'** (per es. riconoscere i portatori della β -talassemia nelle popolazioni a rischio)
- Identificare i familiari a rischio mediante **'screening a cascata'** (per es. identificare gli eterozigoti per SMN nelle famiglie con atrofia muscolare spinale)

Test presintomatici

- Identificare le **persone a rischio di sviluppare una malattia** ad esordio tardivo (per es. espansione della tripletta CAG nel gene della corea di Huntington)



Test predittivi

- Riguardano numerose affezioni comuni, nelle quali il rischio di malattia è aumentato o ridotto, ma con un livello di accuratezza molto più basso rispetto a quello degli altri test genetici (**trombofilia genetica**)
- ❑ Si applicano alle malattie complesse ed identificano situazioni di suscettibilità o di resistenza a tali patologie.
- ❑ Identificano un **rischio di ammalarsi superiore rispetto a quello medio** della popolazione generale ma non conferisce nessuna certezza circa il manifestarsi della malattia nel corso della vita.

Test genetici

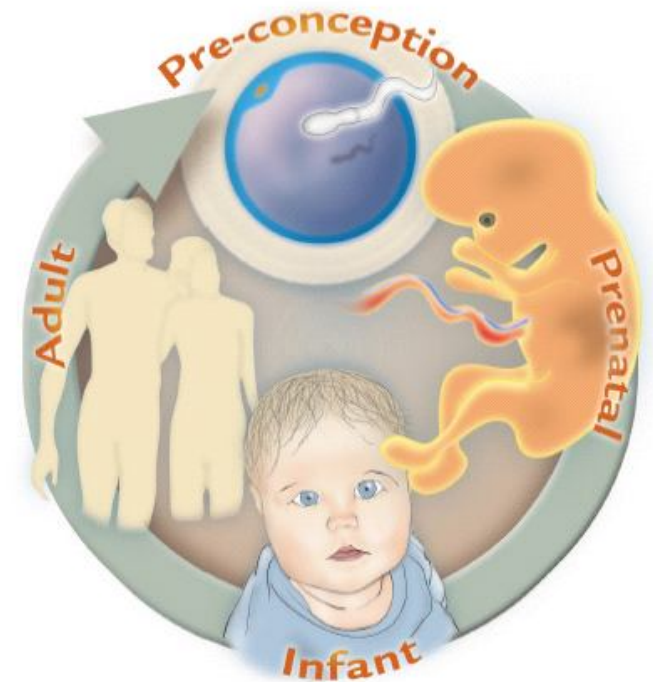
A seconda della popolazione bersaglio i test genetici si possono distinguere in:

TEST PRECONCEZIONALE

TEST PRENATALE

TEST NEONATALE

TEST DEGLI ADULTI



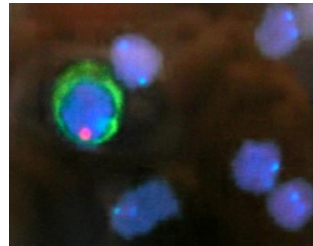
Test genetici preconcezionali e prenatali



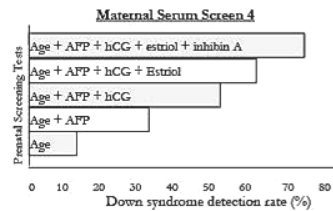
Analisi del globulo polare



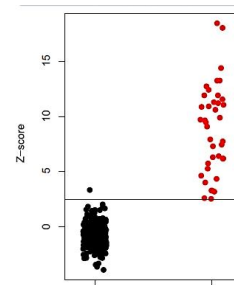
Diagnosi preimpianto



Cellule fetali circolanti



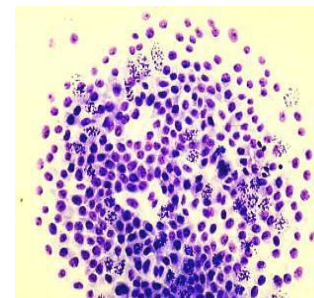
Screening biochimico



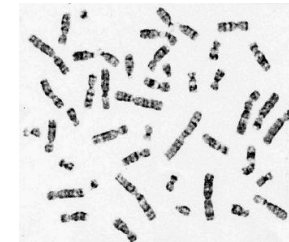
DNA fetale circolante



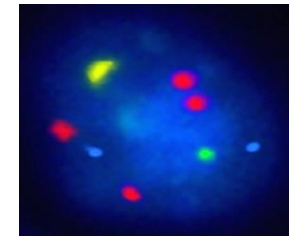
Villi coriali



Amniociti



Citogenetica

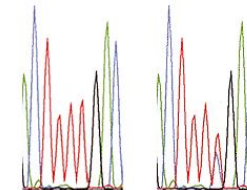


Citogenetica

molecolare

Wild-type
AC TTTT GAC
110

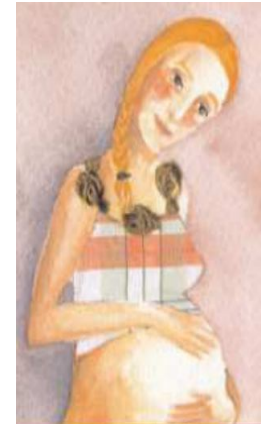
Point Mutation
AC TTTN GAC
110



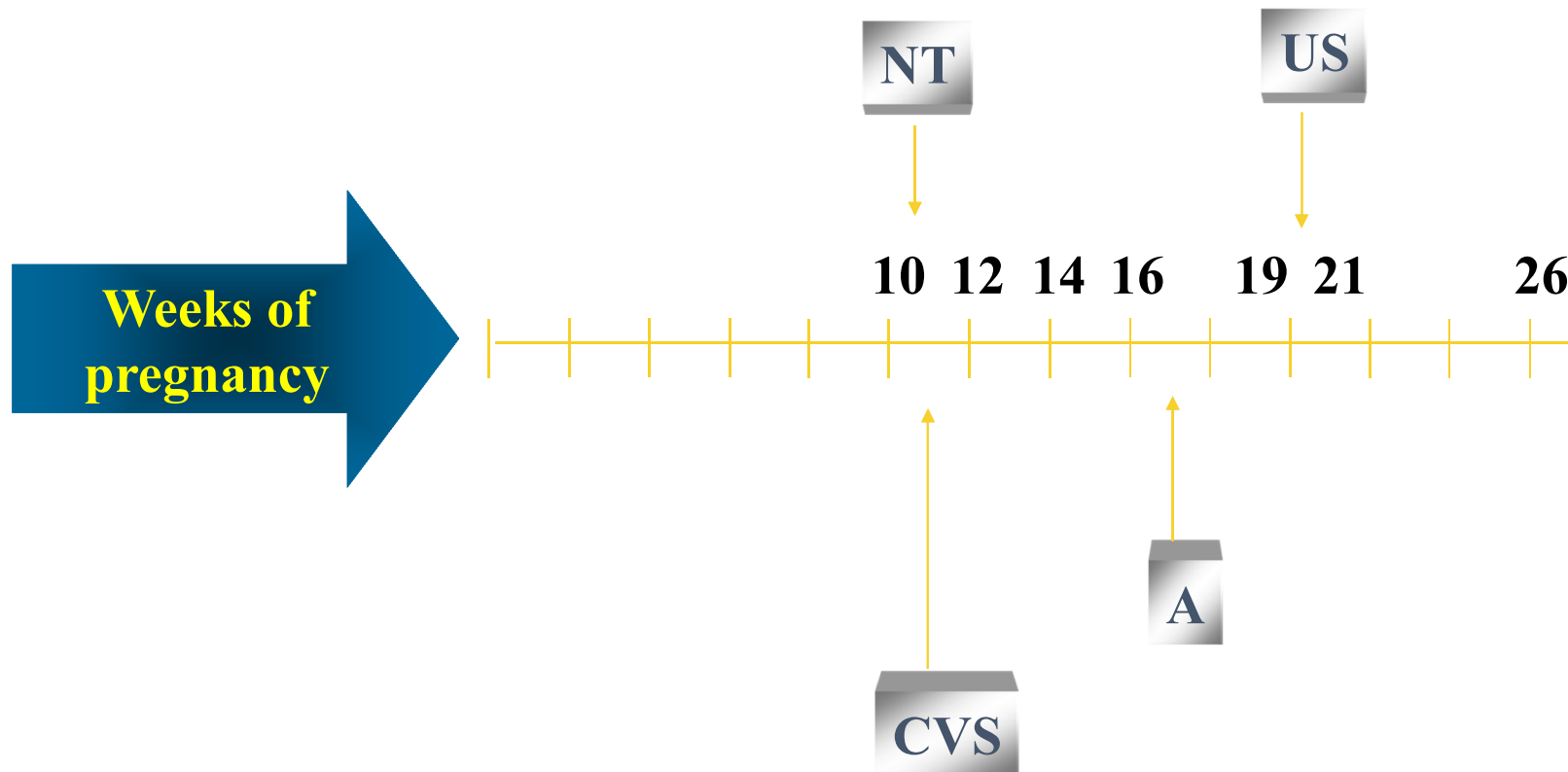
Genetica molecolare

Diagnosi prenatale

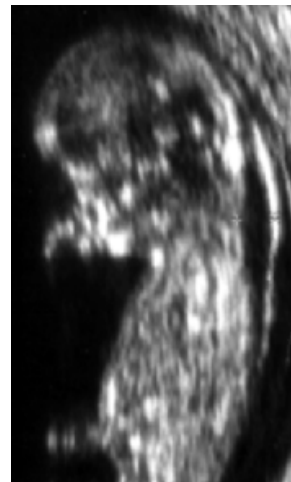
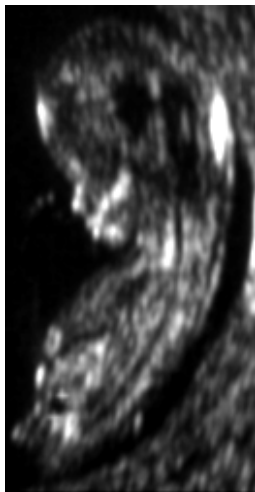
- ❑ **Insieme di indagini strumentali e di laboratorio** finalizzate all'identificazione di patologie su base genetica, infettiva, iatrogena o ambientale in epoca prenatale
- ❑ Attività con delle **forti implicazioni etiche e psicologiche** e proprio per questo rappresenta un obiettivo primario sia nei programmi nazionali che regionali di tutela della salute materno infantile
- ❑ **Attività di equipe** che prevede l'integrazione di diverse competenze: ostetriche, genetiche, psicologiche, chirurgiche, di anatomia patologica.



Percorso di diagnosi prenatale



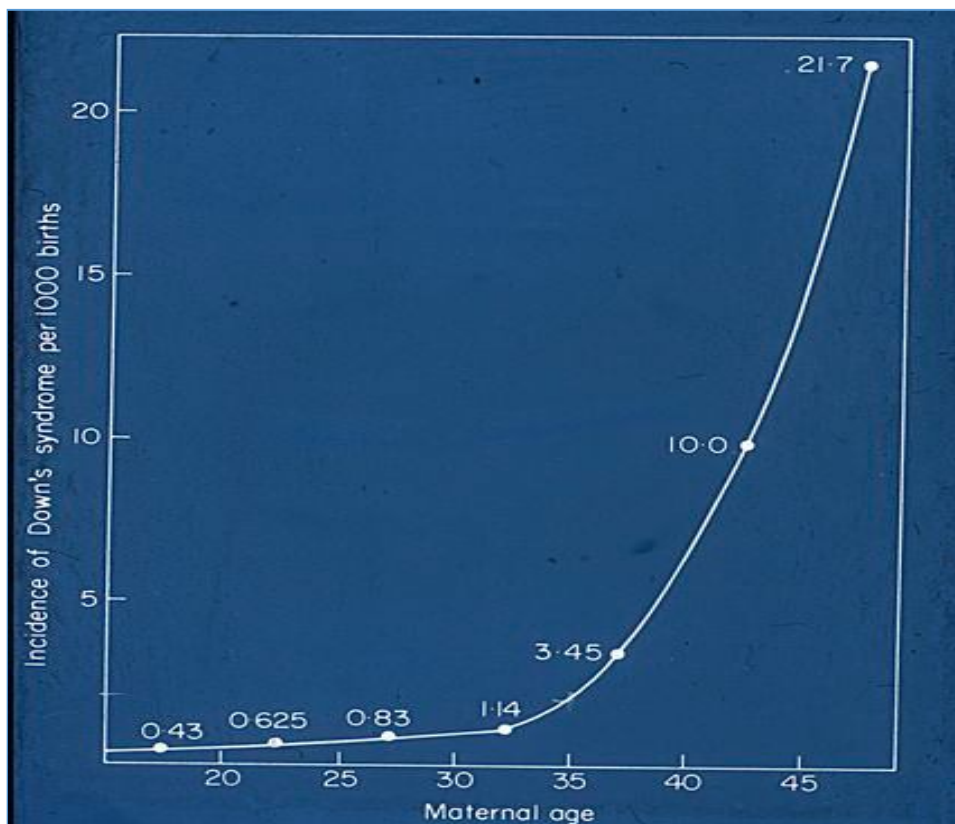
Screening ecografico della trisomia 21 nel I trimestre: Translucenza Nucale (NT)



La novità di maggiore interesse nel campo dello screening ecografico delle anomalie cromosomiche è stato dall'osservazione che la maggior parte dei feti affetti da aneuploidie ed in particolare da trisomia 21, e solo una minima parte dei feti con cariotipo normale presentano tra 10 e 14 settimane di gestazione **un incremento transitorio del liquido contenuto all'interno dei tessuti molli retronucali**. Tale accumulo di fluido viene evidenziato ecograficamente come una piccola area translucente presente nella porzione posteriore del collo fetale. La patogenesi di tale fenomeno appare a tutt'oggi sconosciuta, anche se sono state formulate diverse ipotesi che sembrano coinvolgere in modo particolare il sistema cardiovascolare fetale. Tale reperto viene più comunemente definito nuchal translucency, che potrebbe essere tradotto in italiano come translucenza nucale. (NB: fino a 14 settimane si parla di translucenza, dopo di plica nucale). Nelle foto tre feti ad 11 settimane di gestazione, in scansione sagittale:

- nel primo la translucenza nucale è sottile;
- nel secondo si osserva un aumento del fluido retronucleare che potrebbe essere definito borderline (2,7 mm);
- nel terzo l'aumento è marcato e si associa ad edema generalizzato (5,5 mm).

Rischio di trisomia 21 in funzione della NT e dell'età materna



Dal momento che ogni donna presenta un rischio di base di essere portatrice di un feto affetto da trisomia 21 che è in relazione all'età della donna al momento del concepimento, Nicolaides propone di utilizzare dei **fattori di moltiplicazione per ogni valore della translucenza nucale da applicare a questo rischio di base** per definire il rischio finale. In accordo ai dati del suo studio multicentrico, il rischio di base di anomalie cromosomiche è diminuito di 4 volte se lo spessore è inferiore a 3 mm e aumentato di 12 volte se è uguale o superiore a 3 mm.

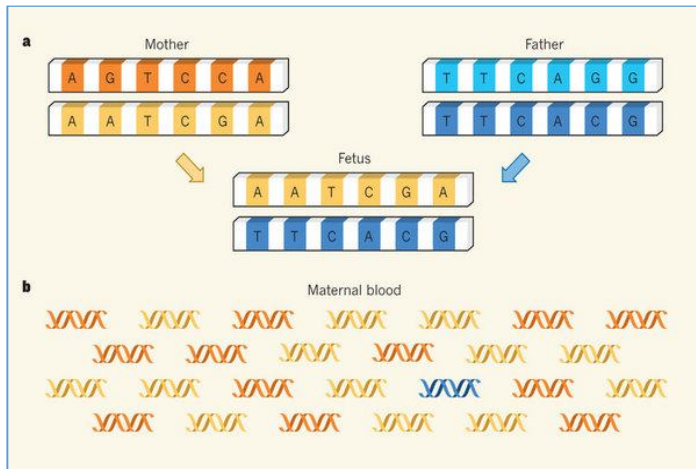
In particolare il rischio è aumentato 4 volte se lo spessore è 3 mm, 21 volte se è 4 mm, 26 volte se è 5 mm, 41 volte se è superiore a 5 mm.

Ad esempio se consideriamo una donna con un rischio di base di 1:100, se la translucenza nucale risulterà < 2,5 mm, il rischio risulterà ridotto ad 1:400; se la misurazione sarà di 4 mm, il rischio sarà di 1:15.

Test di screening su sangue materno

	<i>NT</i> 10-13 sett*	<i>hCG</i> 10-12 sett*	<i>PAPP-A</i> 10-12 sett*	<i>hCG</i> 14-20 sett*	<i>AFP</i> 14-20 sett*	<i>uE3</i> 14-20 sett*	<i>inibina A</i> 14-20 sett*
Traslucenza nucale (NT)	X						
Test combinato	X	X	X				
Doppio test				X	X		
Triplo test				X	X	X	
Quadruplo test				X	X	X	X
Test integrato sierologico			X	X	X	X	X
Test integrato	X		X	X	X	X	X
	primo trimestre			secondo trimestre			

Non invasive prenatal test (NIPT)



Presence of cell-free fetal DNA
(cff-DNA) in maternal blood
Lo et al, 1997 Lancet



Next-generation DNA sequencing

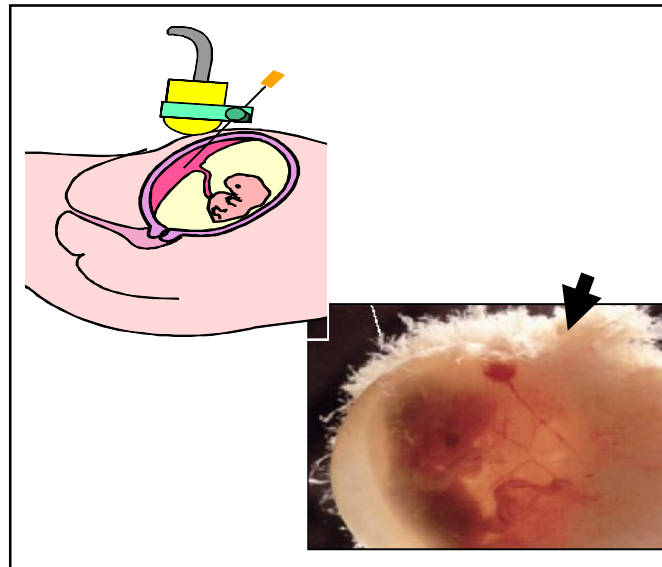
Home | Sitemap | Contact Us | Search

Overview | About Us | Research and Development | Intellectual Property | News | Contact Us

NIPD Test for Trisomy 21

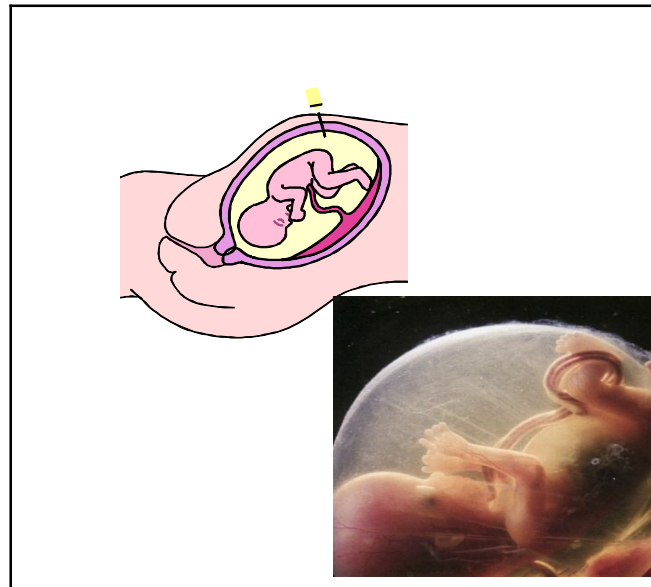
Down syndrome (trisomy 21) is the most common cause of mental impairment with an incidence of 1:700 births. The early detection of trisomy 21 is critical for prospective parents and is an integral component of many national healthcare programs. NIPD Genetics has been successful in developing a Non-Invasive Prenatal Diagnostic (NIPD) test for the diagnosis of trisomy 21 during the early stages of pregnancy based on the identification and use of fetal-specific markers found in maternal blood. NIPD Genetics has announced the findings of their most recent validation study which describes the company's re-evaluation and improvements to the method as well as a blind validation study which tested a cohort of 175 pregnant women and found the refined method has the sensitivity (100%) and specificity (99.2%) necessary for prenatal diagnosis.

Prelievi invasivi: villocentesi



- Epoca di esecuzione: 10-12 settimane
- Regime: ambulatoriale
- Preparazione: nessuna
- Esami preliminari: gruppo sanguigno e fattore Rh
- Terapia: immunoprofilassi nelle donne Rh-
- Esami: cariotipo fetale, genetica molecolare (es.: talassemia, fibrosi cistica, distrofia muscolare di Duchenne, ecc.)

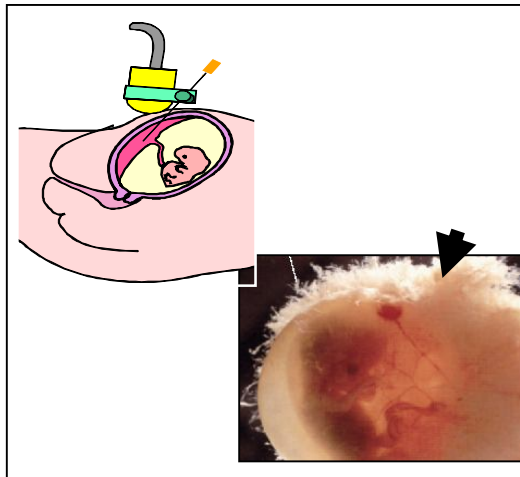
Prelievi invasivi: amniocentesi



- Epoca di esecuzione: 16-18 settimane
- Regime: ambulatoriale
- Preparazione: nessuna
- Esami preliminari: gruppo sanguigno e fattore Rh
- Terapia: immunoprofilassi nelle donne Rh-
- Esami: cariotipo fetale, AFP (difetti del tubo neurale), genetica molecolare

Prelievi invasivi: complicanze

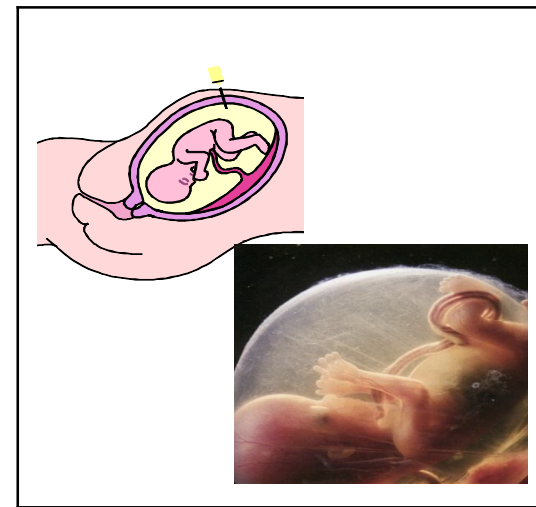
Villocentesi



Contrazioni, perdita ematica e di liquido, infezione

Aborto : 1-3%

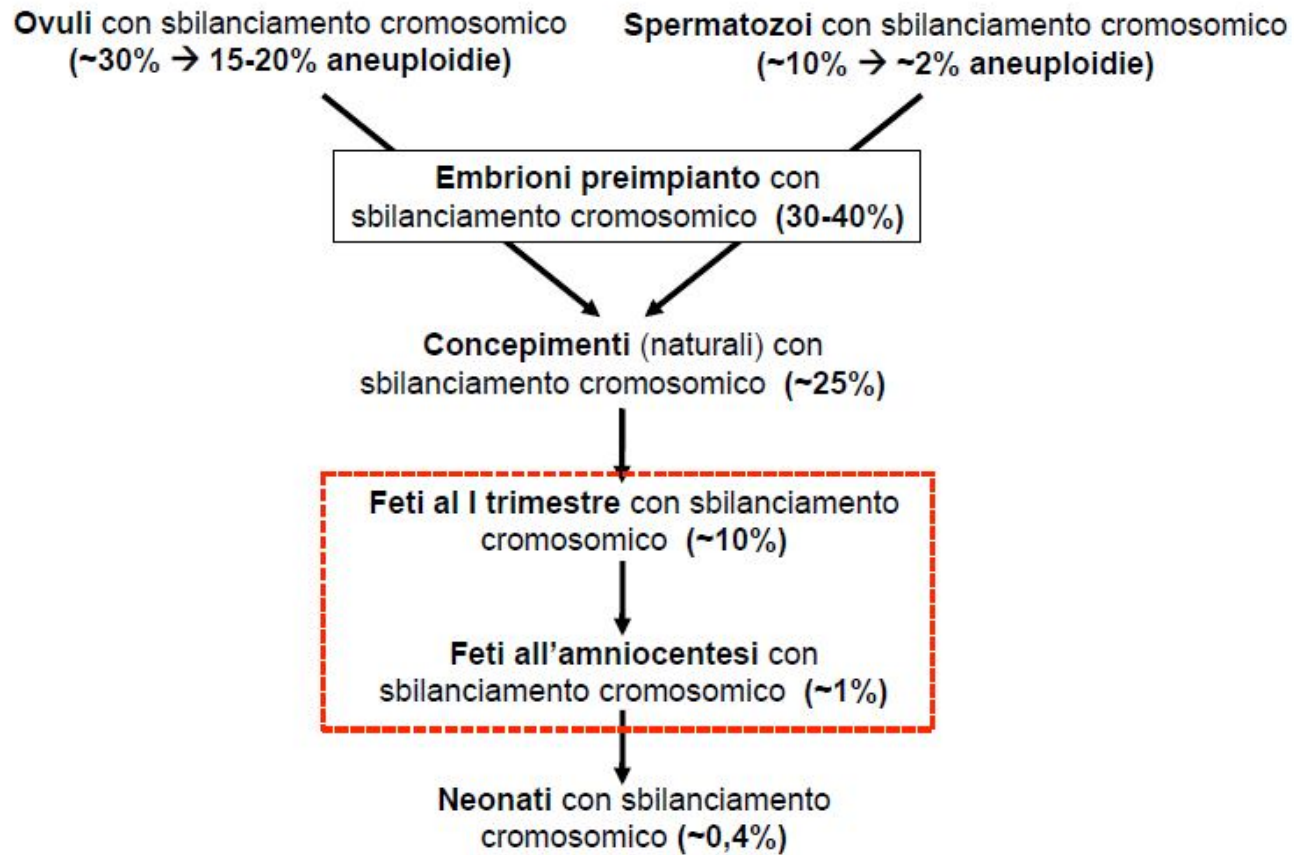
Amniocentesi



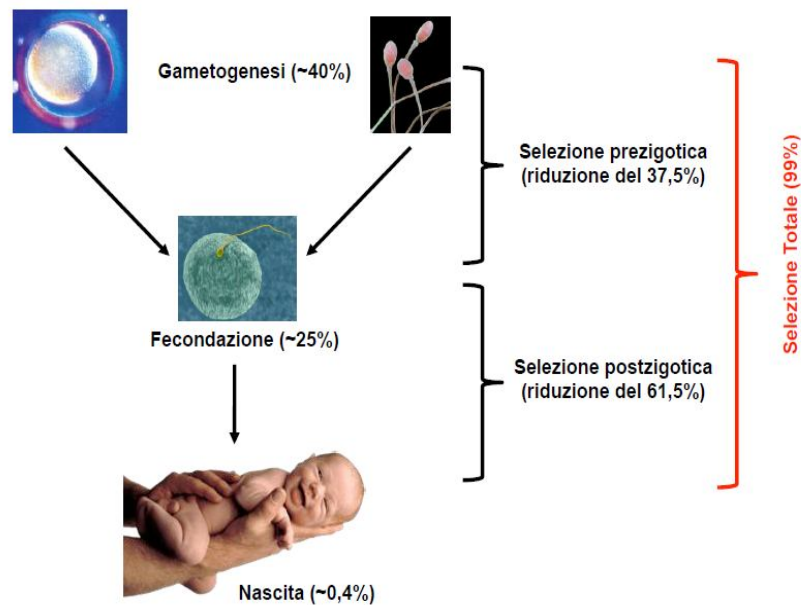
Dolori crampiformi, perdita ematica, infezione

Aborto : 0.5%

Sbilanciamenti ed epoca prenatale



Cromosomi ed aborto



Almeno **il 25% di tutti i concepimenti** ha un corredo cromosomico alterato

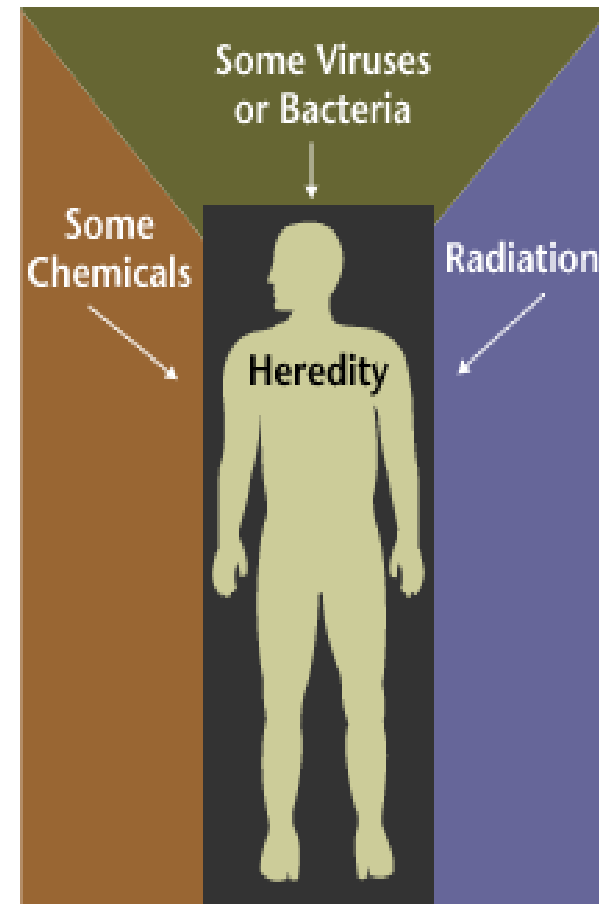
- ❑ **Il 50%** dei concepimenti naturali esita **in aborto**
- ❑ Di questi aborti, **il 50% è “cromosomico”**
- ❑ Tale percentuale è inversamente proporzionale all'epoca gestazione
- ❑ Le selezioni prezigotica (mancato concepimento) e postzigotica (aborto spontaneo) **riducono del 99% la frequenza di anomalie cromosomiche** alla nascita
- ❑ La selezione postzigotica (aborto spontaneo) è lo **strumento più efficace di “correzione naturale” delle anomalie cromosomiche**

GENETICA E CANCRO

Cos'è il cancro?

- **Malattia genetica** causata da eventi mutazionali in specifici geni
- Può essere indotto da:
 - ▣ Carcinogeni chimici
 - ▣ Radiazioni
 - ▣ Alcuni virus

- Eredità - 5%



Genesi del cancro

- Le cellule di un organismo multicellulare collaborano a vantaggio dell'intero organismo
- Quando una cellula ha un **vantaggio riproduttivo** potrebbe divenire la fondatrice di un clone di cellule che potrà prendere il controllo dell'organismo
- Nel corso dell'evoluzione, tuttavia, gli esseri viventi hanno evoluto molti e sofisticati livelli di controllo per cui si ha la manifestazione del tumore solo dopo che siano **andati persi più controlli indipendenti**

Genesi del cancro

- La trasformazione di una cellula normale in una cellula di un tumore maligno richiede una media di **sei o sette mutazioni** successive che si sommino nella stessa cellula.
- le mutazioni devono realizzarsi in geni il cui prodotto sia essenziale per **il ciclo cellulare**
- Tipici tassi di mutazione di 10^{-6} per gene

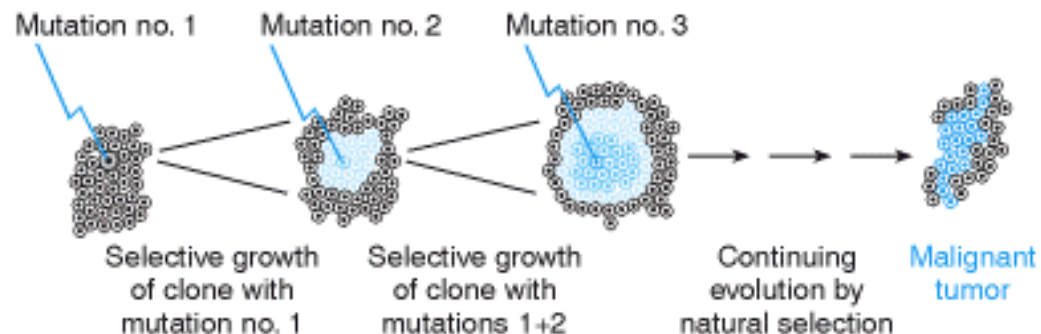


improbabile che si raggiunga l'effetto additivo in una linea cellulare: le cellule potrebbero completare il loro ciclo vitale prima di riuscire a collezionare tutte le mutazioni

Insorgenza tumorale

□ Processo patologico multiplo a piùstadi (neoplasia)

- Crescita cellulare anomala -> **perdita dei meccanismi di controllo** responsabile della divisione e del differenziamento cellulare
- Alcune mutazioni aumentano la proliferazione cellulare, creando una **popolazione espansa** di cellule nella quale si verifica la mutazione successiva;
- Le mutazioni successive intervengono sulla stabilità del genoma, favorendo a loro volta l'insorgenza di successive mutazioni.



Mutazioni nel processo tumorale

Meccanismi generali possono rendere più probabile tale accumulo di mutazioni:

1. mutazioni che intaccano la stabilità dell'intero genoma

(aumentano il tasso complessivo di mutazione)



GENI MUTATORI

2. mutazioni che aumentano la proliferazione cellulare (creando una popolazione espansa di cellule bersaglio per la mutazione successiva)



ONCOGENI E ONCOSOPPRESSORI

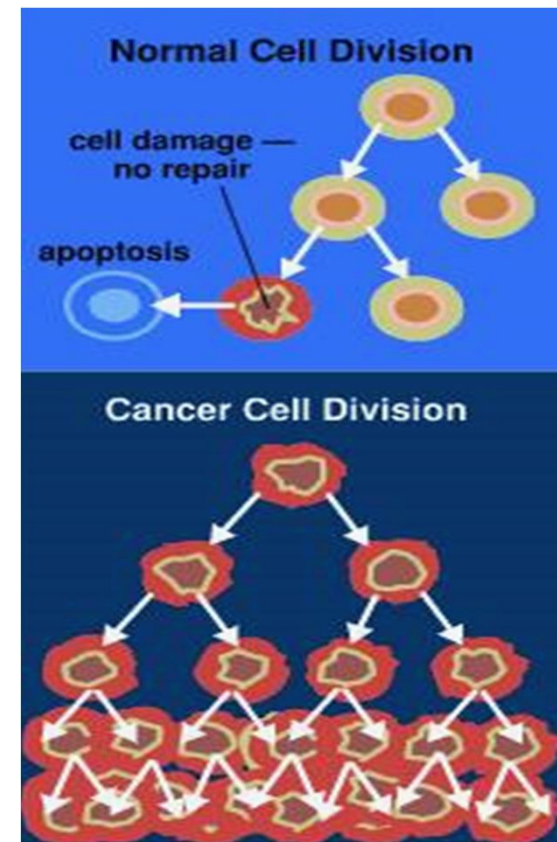
Basi cellulari del cancro

❑ Il cancro è caratterizzato da **anormale ed incontrollata crescita cellulare**

❑ Nel tessuto normale, la crescita di nuove cellule e la morte di vecchie cellule è mantenuto in equilibrio

❑ Nel cancro questo **equilibrio viene interrotto**

- Questa interruzione può essere dovuta a
 - 1) incontrollata crescita cellulare o
 - 2) perdita dell'abilità di andare in apoptosi

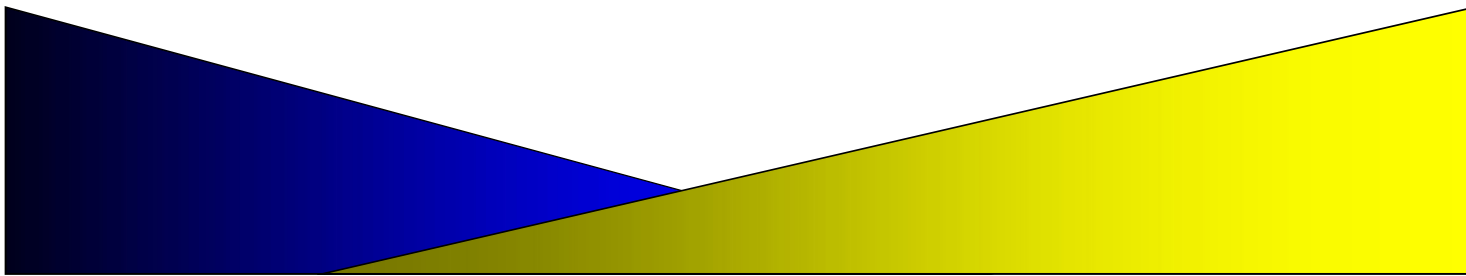


Equilibrio cellulare

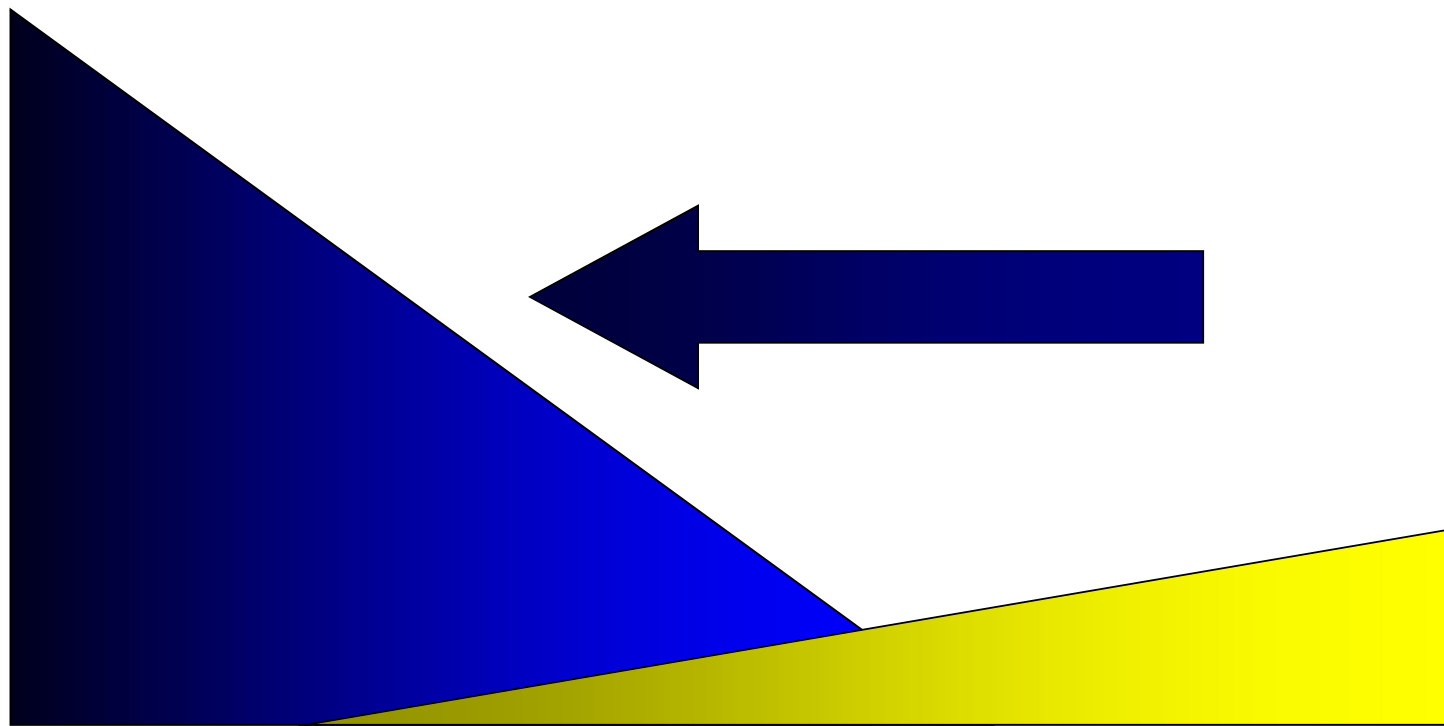
Proliferazione

Differenziazione

Morte



Cancro: interruzione dell'equilibrio cellulare



Proliferazione

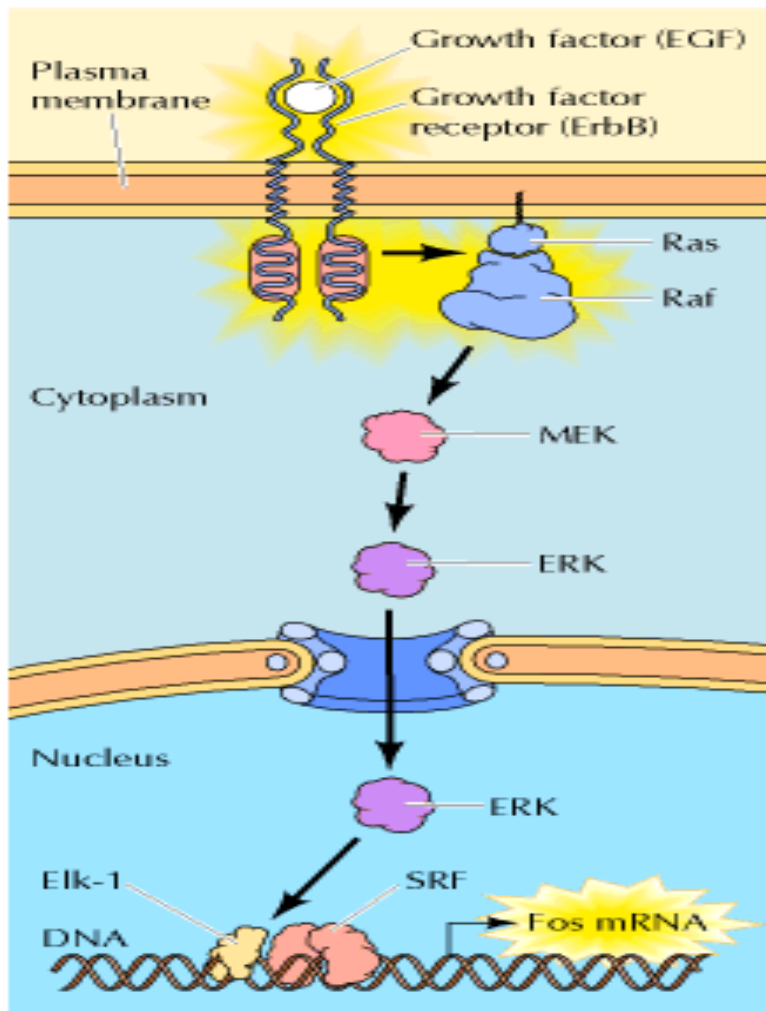
Differenziazione

Morte

Geni che giocano un ruolo nello sviluppo del cancro

- *Proto-Oncogeni*
- *Geni oncosoppressori*
- *Geni mutatori*

Proto-oncogeni



I proto-oncogeni sono normali geni cellulari implicati nel controllo della crescita cellulare. Le mutazioni possono convertire i **proto-oncogeni in oncogeni** attivati che sovrintendono la crescita delle cellule tumorali.

Il loro bersaglio è localizzato in differenti compartimenti e funzioni della cellula, come nei **recettori** per la crescita cellulare, nei **fattori di crescita** cellulare, nel sistema di **trasduzione intracellulare**, nelle **proteine che regolano il ciclo cellulare** e nei **fattori di trascrizione**.

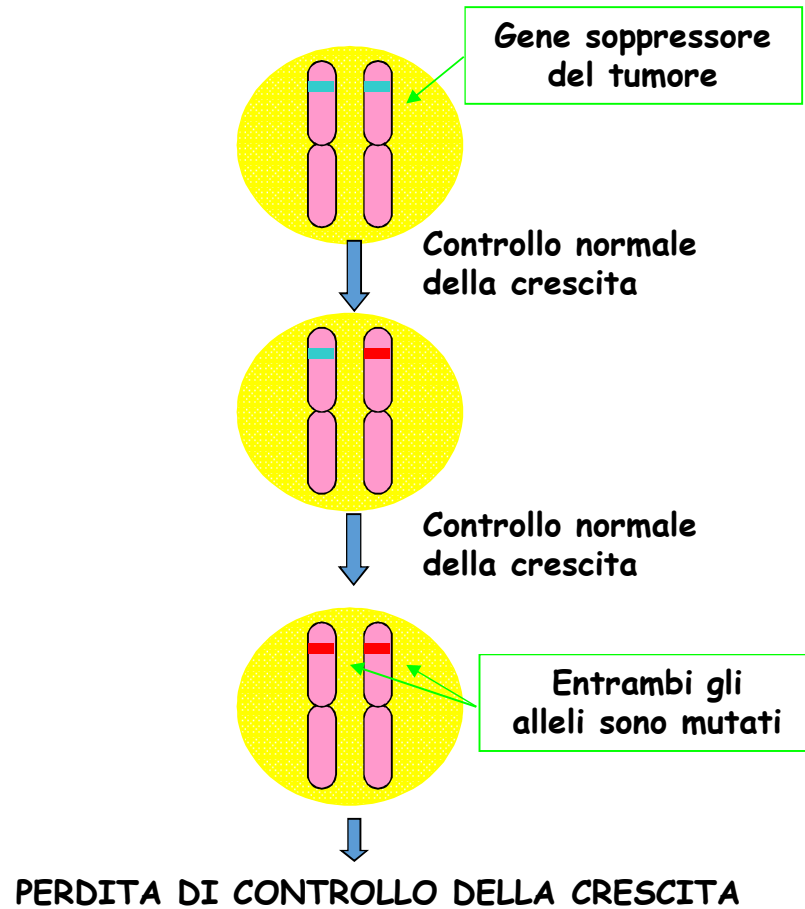
L'attivazione dei proto oncogeni

- ❑ **Amplificazione:** la cellula contiene copie in soprannumero di un oncogene strutturalmente normale (es. ERBB2);
- ❑ **Mutazioni puntiformi:** sostituzione di un nucleotide con un altro (es. gene H-RAS);
- ❑ **Modificazione del promotore:** es. inserzione retrovirus
- ❑ **Traslocazione:** inserimento di sequenze enhancer, proteine di fusione

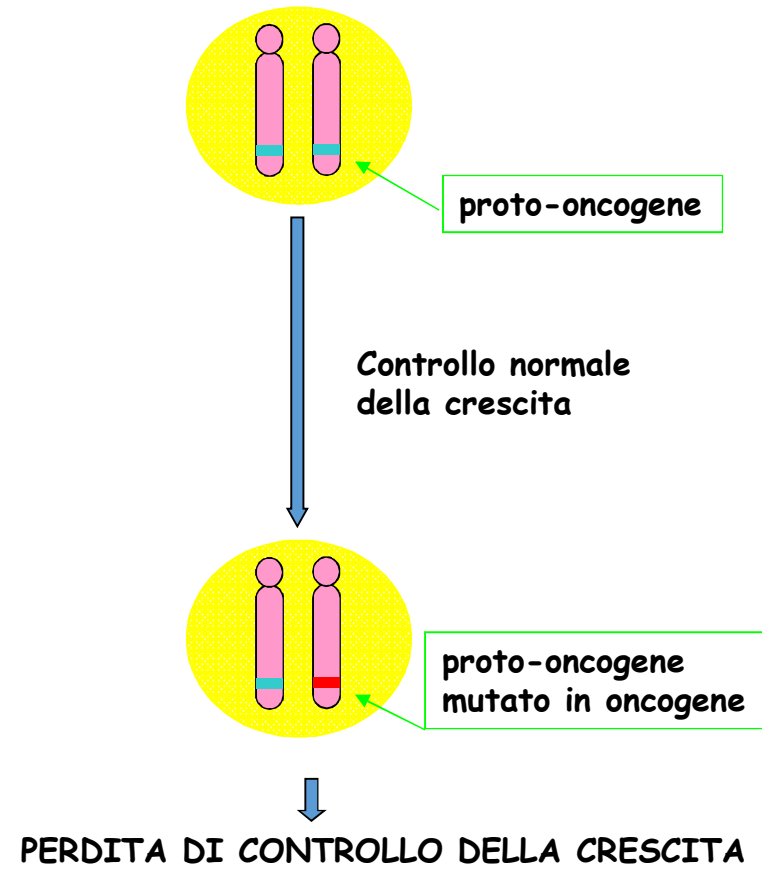
Geni oncosoppressori

- Un gene oncosoppressore è un gene la cui presenza **contrasta l'insorgenza di tumori**.
- Quando una cellula non è in grado di esprimere un gene oncosoppressore, in quanto entrambi gli alleli che lo codificano sono alterati, va incontro alla trasformazione tumorale e cresce senza controlli.
- Le funzioni di questi geni vanno in genere ricercate nella **capacità di impedire a una cellula con delle anomalie acquisite nel codice genetico di riprodursi**. Gli onco- soppressori sono geni la cui funzione normale non è sensibile alla quantità di prodotto: **il mancato funzionamento di un allele non ne pregiudica la funzione**. Tra gli esempi più noti di geni oncosoppressori si ritrovano i geni **Rb** e **BRCA**, implicati sviluppo del retinoblastoma e del tumore della mammella.

Mutazioni in un gene soppressore del tumore



Mutazioni in un proto-oncogene



Elenco di alcuni geni oncosoppressori

Gene	Type of cancer
APC	Colon/rectum carcinoma
BRCA1	Breast and ovarian carcinomas
BRCA2	Breast carcinoma
DPC4	Pancreatic carcinoma
INK4	Melanoma, lung carcinoma, brain tumors, leukemias, lymphomas
MADR2	Colon/rectum carcinoma
NF1	Neurofibrosarcoma
NF2	Meningioma
p 53	Brain tumors; breast, colon/rectum, esophageal, liver, and lung carcinomas;
PTC	Basal cell carcinoma
PTEN	Brain tumors; melanoma; prostate, endometrial, kidney, and lung carcinomas
Rb	Retinoblastoma ; sarcomas; bladder, breast, and lung carcinomas
VHL	Renal cell carcinoma WT1 Wilms' tumor

Retinoblastoma



- e' un **tumore maligno della retina** che si sviluppa nei primi anni di vita
- puo' essere **monolaterale o bilaterale**
- si puo' manifestare in **forme sporadiche** (diagnosticate a 7-10 anni, generalmente monofocali) o **ereditarie** (diagnosticate nel primo anno di vita, multifocali)

Genetica del retinoblastoma

- 10% anamnesi familiare positiva per Rb
 - trasmissione autosomica dominante
 - penetranza del 90%
- 30% anamnesi familiare negativa
 - mutazione germinale → Rb familiare
- 60% Rb sporadico

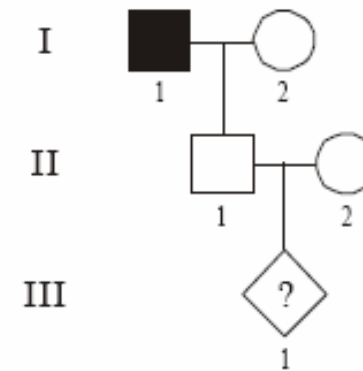
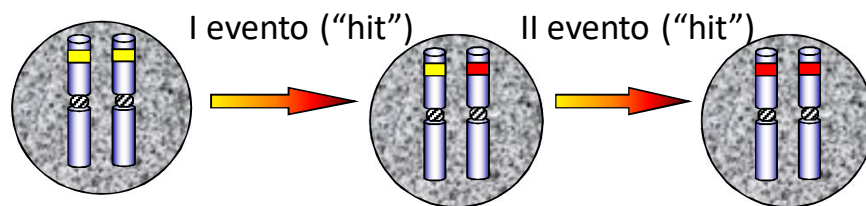


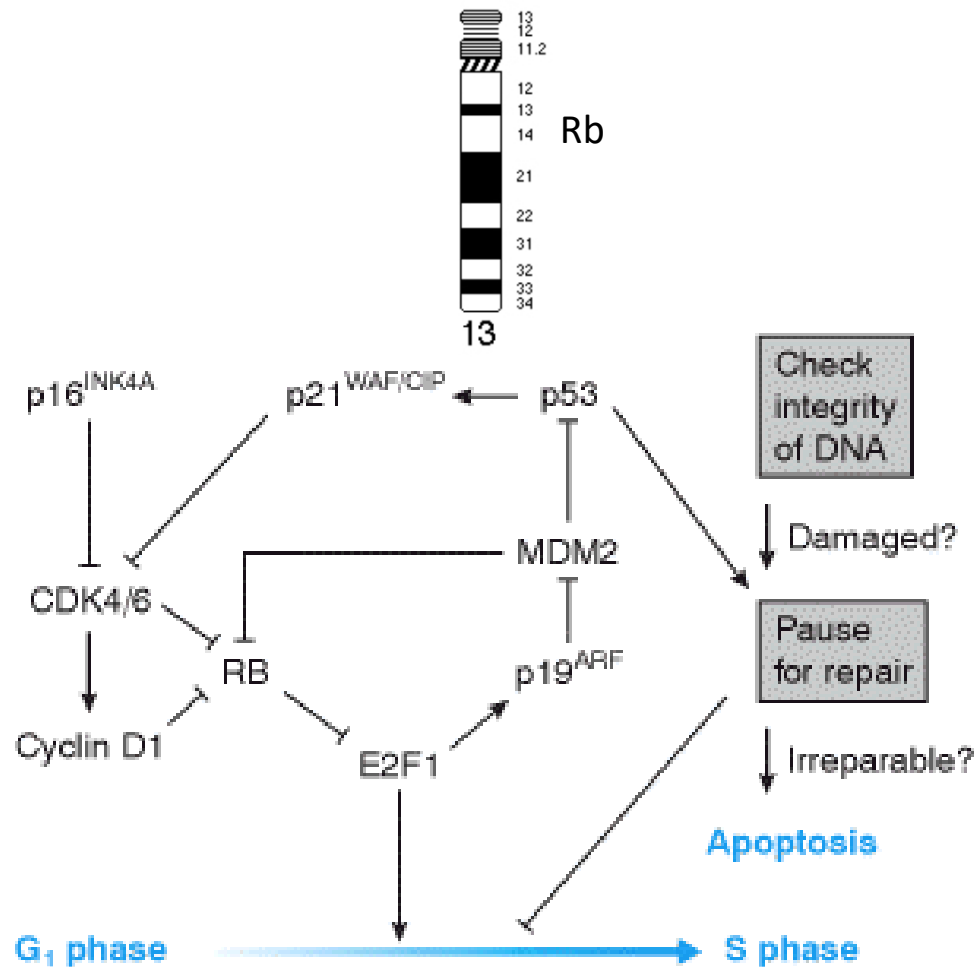
Figure3-7 Pedigree for Retinoblastoma

Modello dei “due eventi”



Nel 1971 Alfred Knudson analizzando bambini con retinoblastoma sia monolaterale che bilaterale osservò che al momento della diagnosi, i bambini che avrebbero sviluppato tumori bilaterali erano più piccoli di quelli per i quali i tumori sarebbero rimasti monolaterali. Propose così un modello (*two-hit hypothesis*) secondo il quale, affinché si abbia il retinoblastoma, è necessario che in una linea di cellule retiniche si verifichino **due distinti eventi mutazionali**. I soggetti con **retinoblastoma ereditario** hanno ereditato una di queste mutazioni, la quale, pertanto, è presente in tutte le loro cellule retiniche e, quindi, è necessario un secondo evento perché si produca il tumore. Il **retinoblastoma sporadico**, invece, si forma solo quando due eventi mutazionali indipendenti avvengono nella stessa linea cellulare. Ciò si realizza più raramente, per cui l'insorgenza è più tardiva e i tumori sono invariabilmente monolaterali.

Il gene del retinoblastoma (Rb)



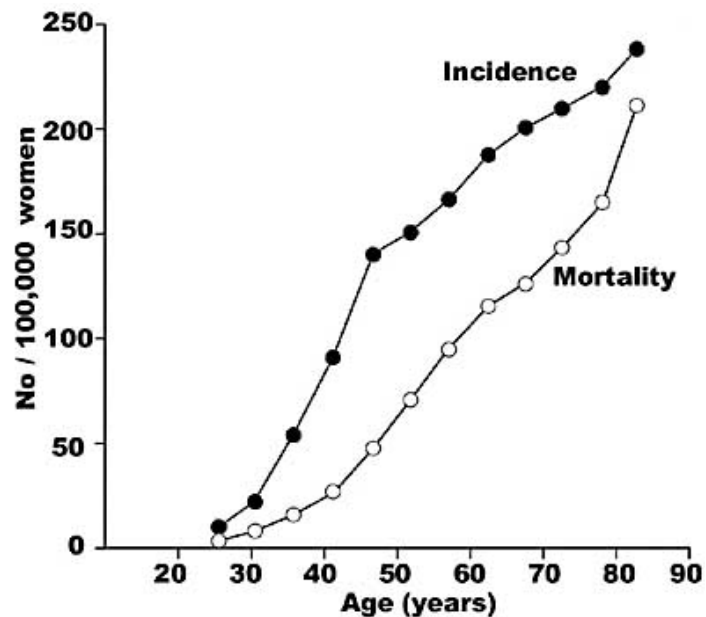
- Il gene RB, localizzato in **13q14**, codifica per una **proteina nucleare** (pRb), che è in grado di inattivare il fattore di trascrizione cellulare E2F1, **bloccando così la progressione** della cellula verso la fase S.

Tumore della mammella



- ❑ La più frequente neoplasia maligna tra le donne di tutte le età;
- ❑ In Italia l'incidenza è pari a 48 casi per 100.000 abitanti (**1 donna su 10** si ammalerà di tumore alla mammella nel corso della vita);
- ❑ Principale causa di morte nella popolazione femminile oltre i 35 anni d'età (la probabilità aumenta intorno al periodo di menopausa e cresce con l'età);
- ❑ L'**età** è il principale fattore di rischio, assieme ad altre circostanze come la **predisposizione familiare** (BRCA1/BRCA2, nel <10% casi), **storia riproduttiva** (età prima gravidanza), **obesità, cattiva alimentazione ed esposizione a raggi X** (radioterapia di tumori vicini alla mammella, no mammografie);

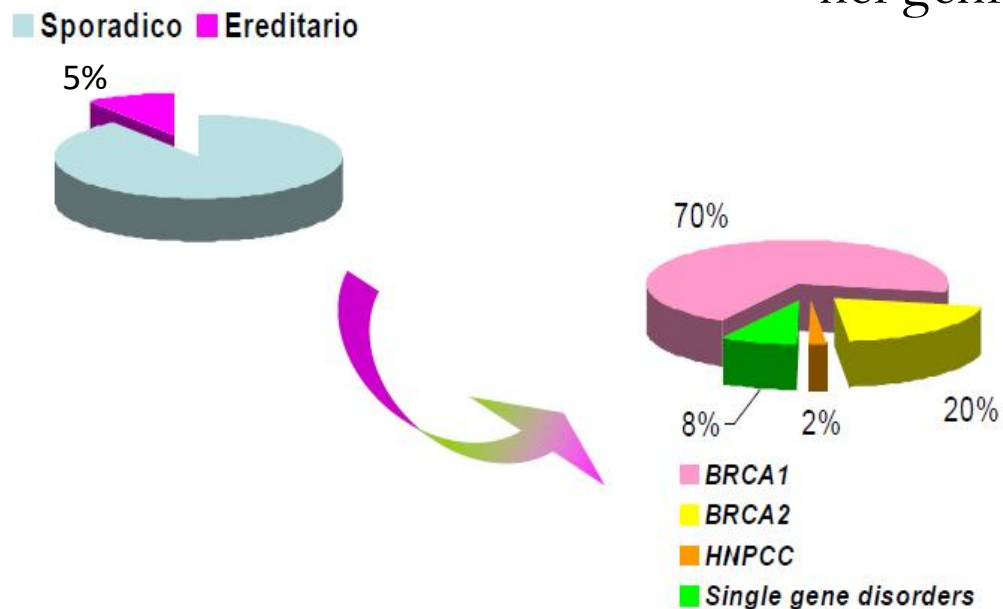
Prevenzione



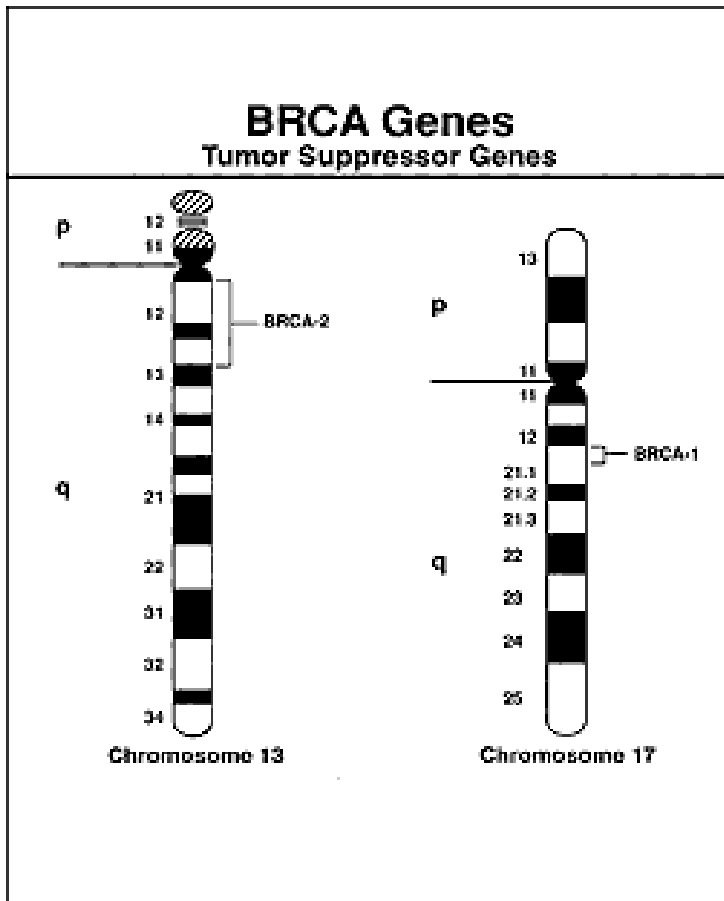
- La prevenzione e la **diagnosi precoce** possono ridurre notevolmente la mortalità: l'identificazione della malattia negli stadi precoci innalza la probabilità di guarigione al 90%

Cause di suscettibilità ereditaria ai tumori della mammella e dell'ovaio

- ❑ Solo il 5% dei tumori della mammella è ereditario
- ❑ il 90% è causato da mutazioni nei geni BRCA1 e BRCA2



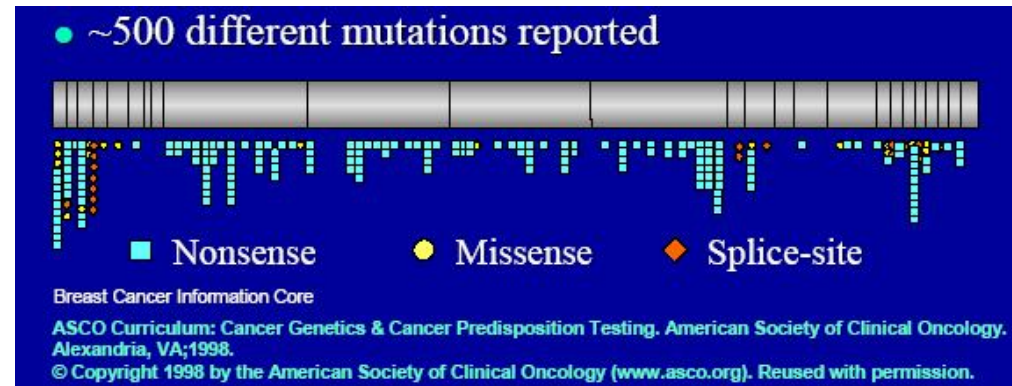
BRCA1/BRCA2



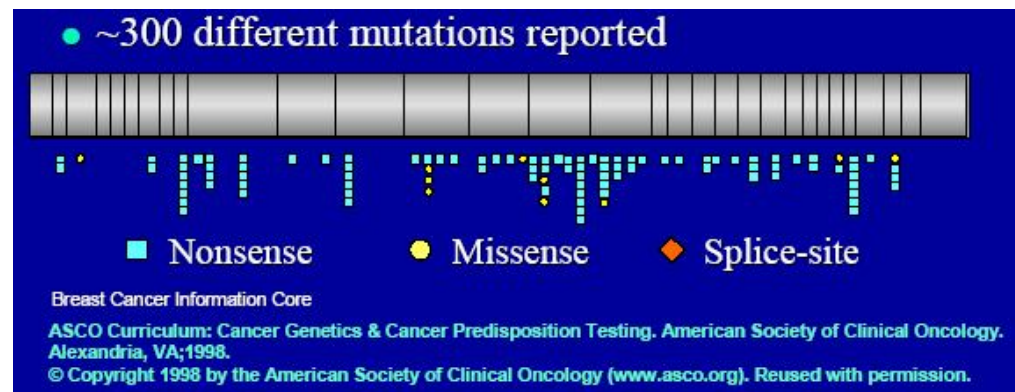
- Una donna con mutazioni nel gene BRCA1 presenta un rischio dell' 85-90% di sviluppare tumore al seno e del 40% all'ovaio. Lo stesso per mutazioni BRCA2, ma solo al seno
- Questi rischi sono attendibili solo per **donne con storia familiare accertata**
- Sono geni **oncosoppressori**, con funzioni di attivatori trascrizionali e **attivi nel riparo del DNA**
- Nessuna forma sporadica è causata da mutazioni nei due geni
- L'identificazione della mutazione indirizza al test gli altri familiari e porta a intraprendere scelte preventive

BRCA1/BRCA2

BRCA1



BRCA2



Test BCRA1/BCRA2

Chi deve fare il test

	Cancro della mammella prima di 50 anni	Cancro dell'ovaio a qualunque età	Altri tumori
Probanda			
Madre			
Sorella			
Figlia			
Linea materna			
Nonna			
Zia			
Cugina			
Altro			

Il soggetto che risponde positivamente a due o più colonne, è considerato candidato al test

- Il test può essere offerto alle **consanguinee di primo grado** delle donne affette
- Test complesso e costoso che impone una rigorosa selezione delle famiglie da analizzare
- Un **risultato negativo non modifica il rischio di tumore**, in quanto la maggior parte delle tecniche identifica solo il 20-30% delle mutazioni e altri geni (non noti) possono causare il tumore
- Attualmente **nessun test genetico di predittività** tumorale è appropriato per lo **screening** dei soggetti sani della popolazione generale
- Nessuna forma sporadica è causata da mutazioni nei due geni

Prevenzione

- ***PRIMARIA***

Mastectomia bilaterale

Annessiectomia bilaterale

Chemioprevenzione

- ***SECONDARIA***

Sorveglianza clinica

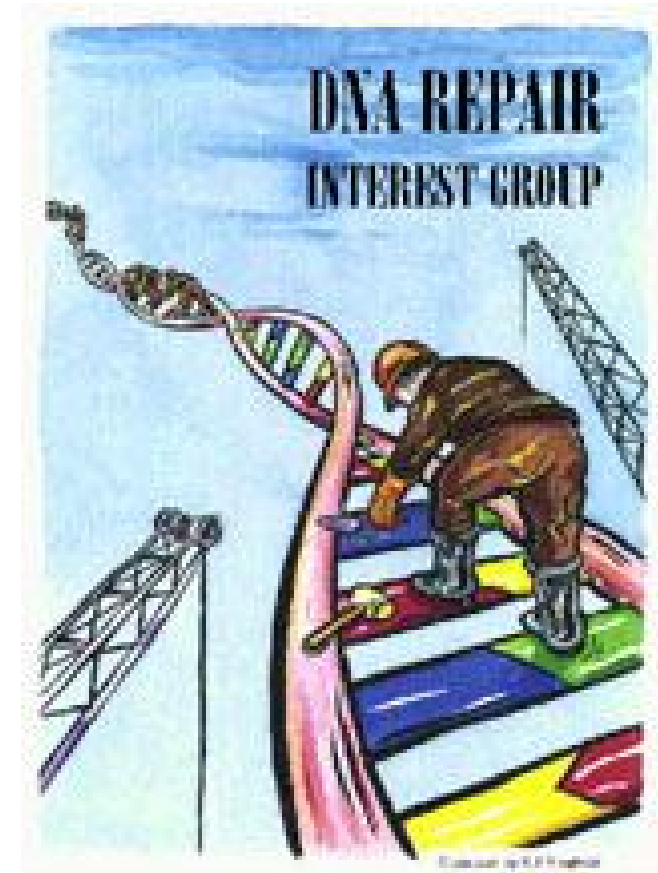
Mammella

Ovaio

Più dell'80% delle donne americane eterozigoti BRCA1/BRCA2 opta per la mastectomia profilattica bilaterale; in Italia <5%

Geni mutatori (riparo del DNA)

- ❑ Assicurano che ogni filamento di informazione genetica sia accuratamente copiato durante la divisione cellulare
- ❑ Le mutazione di questi geni porta ad **un aumento della frequenza di mutazioni** in altri geni, come **proto-oncogeni e geni oncosoppressori**



Cromosomi e tumori



Theodor Boveri
Photo from History of Genetics
by Hans Stubbe

“...la tendenza ad una rapida proliferazione osservata nelle cellule tumorali puo’ essere dovuta alla presenza di specifici cromosomi che inibiscono la divisione cellulare e ad altri che promuovono tale processo....”

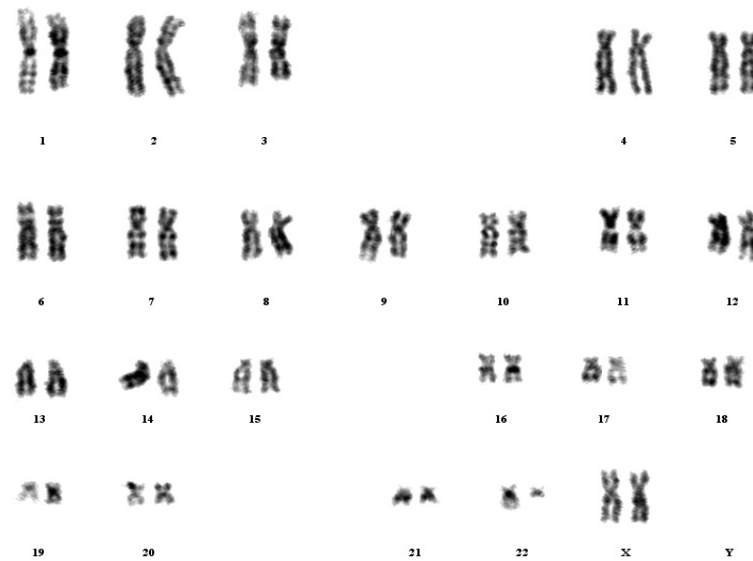
Theodor Boveri, 1911

Cromosoma Philadelphia

P.Nowell, 1960

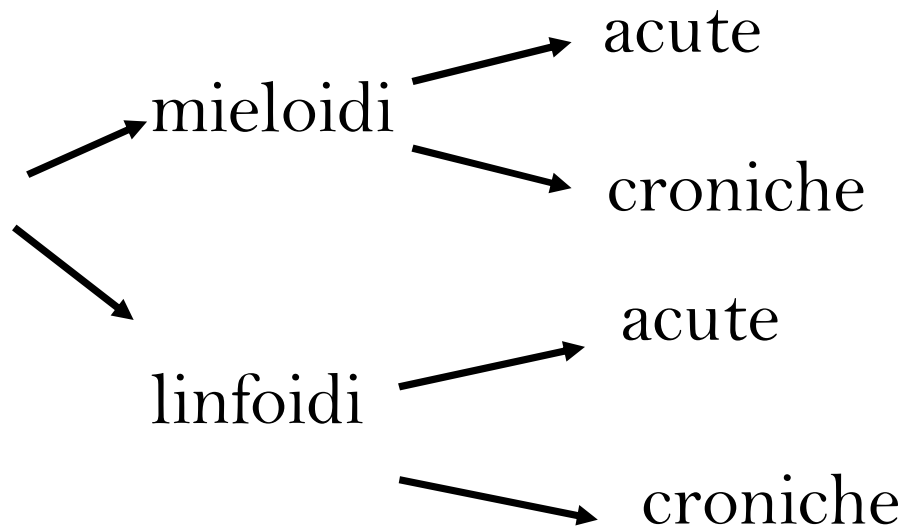


1973: t(9;22) in LMC (Rowley)

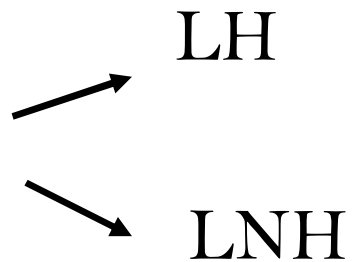


Emopatie maligne

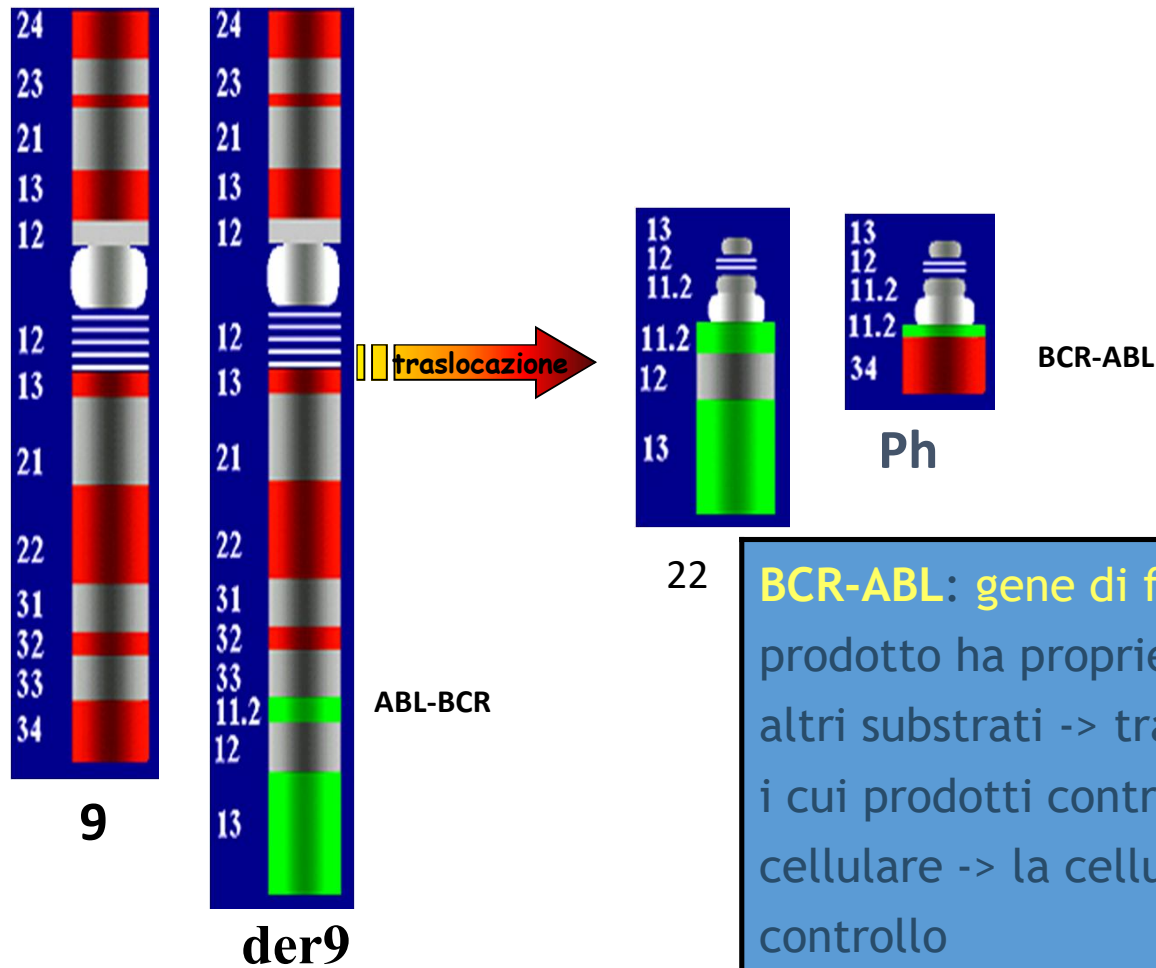
□ *Leucemie*



□ *Linfomi*

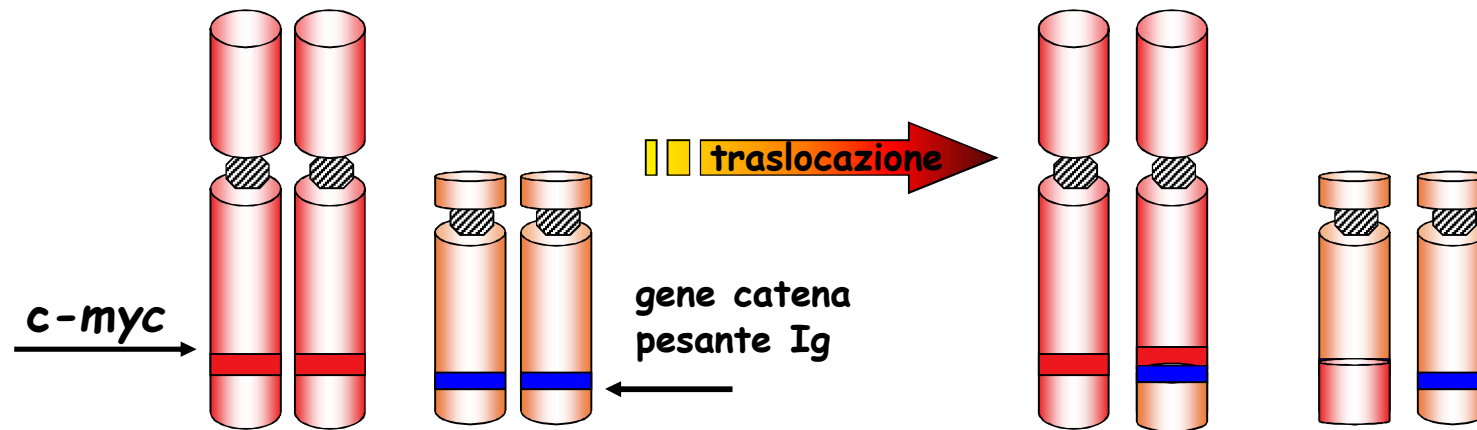


Traslocazione 9;22



BCR-ABL: gene di fusione, il cui prodotto ha proprietà di fosforilare altri substrati -> trascrizione di geni i cui prodotti controllano il ciclo cellulare -> la cellula perde il controllo

Traslocazione 8;14



c-myc si viene a trovare sotto il controllo del promotore del Ig che e' un promotore forte e nella serie bianca funziona ad un ritmo elevato: il proto-oncogene perde la propria regolazione e assume quella del Ig. La cellula perde il controllo

Significato delle alterazioni citogenetiche nei tumori

- Trisomie, duplicazioni, amplificazioni – aumento di materiale genetico
 - Aumento del numero di copie di un oncogene
- Monosomie o delezioni – perdita di materiale genetico
 - Perdita di geni oncosoppressori
- Traslocazioni, inversioni – spostamento di geni o parte di geni
 - Geni di fusione con nuove funzioni o perdita di regolazione