

## GENETICA

Lezione 24- 27/5

## HEREDITARY BREAST-OVARIAN CANCER (HBOC)

La sindrome ereditaria HBOC conferisce un incrementato rischio di sviluppare carcinoma mammario e ovarico. HBOC è caratterizzato anche da un aumentato rischio anche di altri tumori come il cancro al seno maschile, alla prostata, al pancreas e melanoma. Gli individui con HBOC tendono a sviluppare il cancro in età anticipata rispetto alla popolazione generale (di solito sotto i 60 anni), ma comunque in età adulta. Hanno inoltre un rischio più elevato di:

- recidiva
- carcinoma mammario bilaterale,
- un secondo tumore primario in un tessuto diverso

*La ricerca del gene del carcinoma mammario*

Dal 1974 al 1990, Mary Claire King (Univ di Washington a Seattle) ha svolto indagini alla ricerca di un marcatore genetico, un gene da associare al carcinoma mammario familiare. Nel 1990, King e il suo team dopo aver esaminato ed eliminato 172 possibili marcatori, erano riusciti a dimostrare che un singolo locus genico sul cromosoma 17 poteva essere collegato a molti tumori al seno e alle ovaie. Il gene fu chiamato BRCA1. Oggi i geni principali del carcinoma mammario familiare sono due, BRCA1 e BRCA2, e sappiamo molte cose riguardanti la loro struttura, mutazioni e funzioni.

Le mutazioni in questi geni oltre ad aumentare il rischio si tumori della mammella e dell'ovaio sono associati al rischio di insorgenza di altri tumori come pancreas e melanoma sia in uomo che donna.

**BRCA and Cancer**

Although the risk of cancer is greater for women than men with BRCA 1/2 gene mutations, both sexes face elevated lifetime chances of several types of cancer. Risk of cancer as a percentage, by gender.

Gender	Cancer type	U.S. white	BRCA1 mutation carriers	BRCA2 mutation carriers
MEN	Breast	0.1%	1-3%	7%
	Prostate	36	4	25
	Melanoma	2	N.S.	5
	Pancreas	1	Up to 1	3-5
WOMEN	Breast	12%	60-90%	80-10%
	Ovary	1.3	20-45	13-30
	Melanoma	2	N.S.	Up to 5
	Pancreas	1	Up to 1	3-5

N.S. = Not Significant, comparable with incidence in females younger than 60.  
SOURCE: From National Breast Research Center, San Francisco. © 1994 PLACENTRAL, Inc. All rights reserved.

*Rischio e prevalenza*

Si ritiene che di tutti i tumori circa il 5-10% di tutti i tumori mammari e il 10- 15% di tutti i tumori ovarici sono attribuiti al HBOC. Si stima che 1 su 350-500 individui nella popolazione generale abbia una mutazione BRCA1 o BRCA2 patogena. Circa 1 su 40 individui di origine ebraica ashkenazita sono portatori di una mutazione BRCA1 o BRCA2.

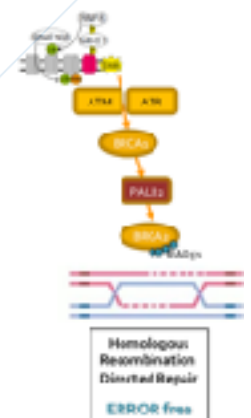
Dove si trovano le mutazioni BRCA1 e BRCA2?

Si tratta di mutazioni inattivanti la funzione di questi geni e praticamente sono sparse su tutto il gene. La mutazione è in grado di inattivare la funzionalità della proteina che ha la funzione di garantire la stabilità del genoma.

Esistono dei database pubblici dove sono state raccolte tutte le mutazioni fino ad oggi riportate nella letteratura sia per quello che riguarda sia BRCA1 dove la maggior parte delle mutazioni patogene sono delle delezioni e delle mutazioni non senso, molto meno sono le mutazioni nei siti di splicing e mutazioni dissenso, sia BRCA2 dove sono state raccolte quasi 2 mila diverse mutazioni e anche queste simili a BRCA1.

*Quali sono le funzioni dei geni BRCA1 e BRCA2?*

Entrambi lavorano e funzionano in un sistema di riparo, in particolare nella riparazione delle lesioni che rompono la doppia elica del DNA. Quando è presente un danno che è dovuto alla rottura della doppia catena, questo danno viene segnalato da varie proteine che a loro volta segnalano a proteine ATM ed ATR che passano a BRCA1 e poi al PALB2 e al BRCA2. BRCA2 interagisce con RAD51 che è la principale proteina coinvolta nell'invasione di una delle catene del DNA (quella che si era rotta), e promuove una ricombinazione omologa, ripristinando esattamente la sequenza del DNA così come era prima della rottura della catena. Quindi è una correzione della catena senza errori.



Esiste un'altro sistema di riparo della rottura della doppia catena che si chiama NHEJ (Non Homologous End-Joining) che è un sistema di salvataggio e che consente di riunire le catene che si erano rotte in modo rapido e ciò comporta l'introduzione di errori come delle delizioni, inserzioni di nucleotidi, traslocazioni. Fisiologicamente è un sistema che viene usato nel riarrangiamento delle immunoglobuline dove l'introduzione di errori è utile perché permette alle immunoglobuline di variare e di produrre delle proteine anticorpali che meglio si adattano agli antigeni che devono andare a riconoscere.



Di norma la via che viene utilizzata è quella della ricombinazione omologa infatti PALB2 è in grado di segnalare ed inibire la via della NHEJ. Tuttavia se BRCA1 o BRCA2 non sono funzionanti e la via della ricombinazione omologa non funziona questo sistema non è più in grado di bloccare la NHEJ. L'uso di NHEJ provoca un alto grado di instabilità cromosomica. Le cellule sviluppano ulteriori alterazioni genetiche che possono portare al cancro.

Un sistema che non funziona e che determina l'accumulo di errori dovrebbe essere in un qualche modo inibito da P53 che dovrebbe innescare dei meccanismi di salvaguardia che bloccano l'accumulo di questo tipo di mutazioni. Nel caso in cui BRCA1 e BRCA2 non siano funzionanti e quindi si accumulano delle alterazioni genetiche quello che dovrebbe succedere è che P53 viene attivata e determina un blocco cellulare ed eventualmente manda la cellula in apoptosi. Ma ciò non succede perché in molti tumori che presentano alterata inattività o funzionalità di BRCA1/2 anche P53 è mutata e perciò non funzionante e quindi le cellule non possono essere eliminate mediante apoptosi e continuano a proliferare e ad accumulare errori.

Sono presenti diverse altre proteine che sono ugualmente coinvolte e che sono importanti nel processo di ricombinazione omologa come per esempio PALB2 che connette tra loro BRCA1 e BRCA2. PALB2 è anch'essa mutata nei tumori mammari e ovarici. Il fenomeno definito **BRCAness** deriva da mutazioni genetiche in geni diversi da BRCA1/ BRCA2, ma ugualmente determinano una carente riparazione del DNA, analoga a quella che si verifica nei portatori di mutazione BRCA1 o BRCA2. Questi geni aumentano il rischio di sviluppare tumori della mammella e dell'ovaio. Oltre ai geni riconducibili al BRCAness altre sindromi ereditarie sono associate ad un incremento di suscettibilità e di sviluppo di tumori della mammella e dell'ovaio. Per esempio:

- Lynch syndrom
- Sindrome di Li-Fraumeni (mutazione che colpisce P53)
- Sindrome di Cowden
- Carcinoma gastrico ereditario (mutazione che riguarda il gene della cadeina1)

Tutte queste mutazioni oltre che ad indurre i tumori tipici di quelle patologie conferiscono un incrementato rischio di sviluppare anche tumori ovarici e tumori della mammella.

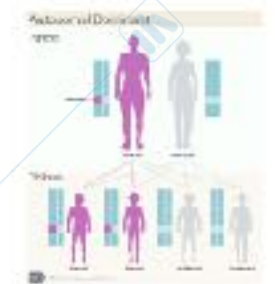
### Diagnosi HBOC

La determinazione di mutazioni dei geni BRCA1 e BRCA2 sono insufficienti al fine di dare una diagnosi corretta sebbene questi siano i maggiori responsabili. La diagnosi di HBOC viene stabilita in un probando mediante identificazione di una variante patogena germinale eterozigote tramite test genetici molecolari. Si studiano quindi anche i geni BRCAness e geni che sono riconducibili ad altre sindromi ma che incrementano il rischio di sviluppare tumore alla mammella e all'ovaio.

### Trasmissione ereditaria

Il rischio di cancro della sindrome di Lynch è ereditato in maniera autosomica dominante: una copia del gene alterato è sufficiente per aumentare il rischio di cancro. È importante notare che le persone ereditano un aumentato rischio di cancro, non la malattia stessa. La malattia si sviluppa quando il secondo allele che è wild-type viene mutato somaticamente e quindi viene persa la funzionalità di entrambi.

La malattia presenta una penetranza incompleta per i diversi tipi di neoplasia: complessivamente 87% per le donne e del 20% per gli uomini.

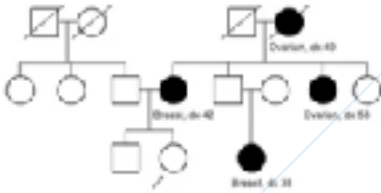


### Counseling genetico: sospetto HBOC

- Donne che hanno familiari con carcinoma mammario, ovarico, delle tube di Falloppio o peritoneale
- Diagnosi di carcinoma mammario prima dei 50 anni

- Cancro in entrambi i seni nella stessa donna
- Tumori mammari e delle ovaie nella stessa donna o nella stessa famiglia
- Tumori mammari multipli in famiglia
- Due o più tipi di tumori correlati a BRCA1 o BRCA2 in un singolo membro della famiglia
- Casi di cancro mammario maschile
- Etnia ebrea Ashkenazita (1:40)

Vista la storia familiare, il consultando (non ha sviluppato la malattia) indicato dalla freccia chiede di conoscere quale sia il rischio di essere portatore di un gene predisponente al cancro e conseguentemente la probabilità di trasmetterlo alla progenie. In questo caso la nonna ha avuto il tumore all'ovaio a 48 anni, la zia al seno a 42 anni, la zia tumore ovarico a 53 e una cugina con tumore alla mammella sviluppato a 38 anni. Considerando la tipologia di tumori, la famiglia potrebbe essere una HBOC. Se una mutazione in BRCA1/2 o altri geni fosse nota nella famiglia, sarebbe semplice svolgere un'indagine molecolare per fornire una risposta certa al consultando. In assenza di tale informazione, vi sono algoritmi predittivi utilizzabili ad esempio il Tyrer Kuzick Test e il BOADICEA.



In Emilia Romagna esiste un sito in cui viene monitorato le donne che hanno effettuato la mammografia. Le donne possono rispondere ad un questionario che chiede loro di segnalare casi passati o presenti di tumore alla mammella e all'ovaio. Ciò ci permette di descrivere il programma attivo in regione Emilia Romagna per donne con HBOC, svolto entro il tradizionale programma di screening per il tumore mammario. I dati definiti dalle risposte che il paziente ha dato sono elaborati e poi viene emesso uno score. Se lo score è superiore a 2 allora alla donna può essere proposto di approfondire ulteriormente l'analisi familiare attraverso uno strumento detto di Tyrer Kuzick Test che raccoglie informazioni più precise riguardo la famiglia e si costruisce un pedigree familiare e si indicando le relazioni del consultando con gli altri membri della famiglia e da dove siano emerse le patologie neoplastiche. Il test restituisce un risultato che dà il rischio individuale rispetto al rischio della popolazione. Il rischio viene calcolato in base alla diversa età.

Il test BOADICEA invece è un po' più elaborato rispetto al precedente. Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm (BOADICEA): un programma informatico utilizzato per:

- calcolare i rischi di carcinoma mammario e ovarico nelle donne in base alla loro storia familiare.
  - calcolare la probabilità di essere portatore di mutazioni nei geni BRCA1 o BRCA2 o altri.
- Ma noi non sappiamo se è presente veramente la mutazione o meno. Quindi l'indagine deve essere fatta anche a livello molecolare per capire se è presente o meno la mutazione.

### *BRCA2 e Anemia di Fanconi*

Sebbene raro, in un eventuale incrocio tra individui con mutazioni di BRCA2, la progenie ha una probabilità del 25% di sviluppare l'anemia di Fanconi (FA). La FA è caratterizzata da insufficienza midollare (assenza delle cellule del sangue), anomalie fisiche (es. microcefalia), difetti renali e un aumentato rischio di sviluppare leucemie acute.

### *Sorveglianza e management*

Indipendente da quella che è la conoscenza della mutazione BRCA questi individui entrano in un programma di sorveglianza.

Membro di famiglia a rischio (genotipo non noto):

- Tra 25-34 anni: esame clinico annuale + ecografia ogni 6 mesi
- Tra 35-49 anni: esame clinico + mammografia + ecografia annuale
- Tra 50-69 anni: esame clinico + mammografia annuale
- 70 anni ed oltre: mammografia biennale

Per portatori non affetti (genotipo BRCA noto):

- Meno di 25 anni: esame clinico ed ecografia semestrale
- Tra 25-34 anni: esame clinico + risonanza magnetica annuale + ecografia ogni 6 mesi
- Tra 35-49 anni: esame clinico + mammografia + risonanza magnetica + ecografia annuale
- Tra 50-69 anni: esame clinico + mammografia + risonanza magnetica annuale
- 70 anni ed oltre: mammografia biennale

In questi individui è possibile svolgere dei trattamenti e dei programmi di prevenzione:

- Programmi di chemio-prevenzione:
  - Senza mutazione BRCA: Tamoxifene, Inibitori aromatasi
  - Con mutazione BRCA: fenretinide
- Programmi di profilassi chirurgica:
  - Mastectomia bilaterale con ricostruzione
  - Salpingectomia (rimozione delle ovaie e tube del Falloppio) e ovariectomia.

**È possibile evitare HBOC?**

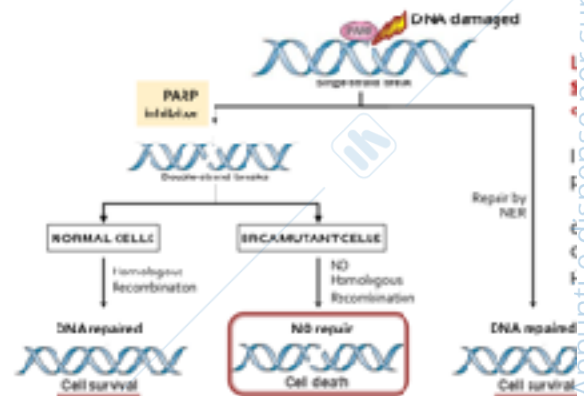
È possibile attraverso una diagnosi preimpianto. Attraverso questa tecnica, il DNA isolato da una cellula di un embrione tipicamente di 8 cellule è testato per l'anomalia genetica, garantendo così che gli embrioni affetti da geni BRCA non vengano impiantati.

**Tumori BRCAness: terapia**

Oltre all'intervento chirurgico per l'esportazione della massa tumorale sono state anche sviluppate delle terapie sistemiche che sono mirate al fatto che questi tumori mancano della funzionalità dei geni BRCA e quindi sono BRCAness. Mutazioni BRCA & BRCAness conferiscono sensibilità a farmaci detti inibitori della Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARPi). PARP svolge un ruolo chiave nella riparazione di rotture a singolo filamento. Non ha un ruolo nella riparazione bensì a un ruolo nel segnalare che è presente una rottura:

- Si lega al sito del danno al DNA
- Genera catene ramificate di poli (ADP-ribosio) su diverse proteine
- Questi rami reclutano enzimi per la riparazione del DNA

Cosa succede se io aggiungo in questo sistema l'inibitore PARP? La rottura della singola catena non viene segnalata e questa rottura diventa rapidamente una rottura della doppia catena che dovrebbe essere riparata, nelle cellule normali infatti questa viene riparata attraverso il processo di ricombinazione omologa e quindi il DNA è riparato e la cellula sopravvive. Ma in presenza di un mutante BRCA che manca del processo di ricombinazione omologa non vi sarà il riparo e la cellula andrà incontro a morte. L'inibizione di PARP è detta di synthetically lethal nel contesto di una mutazione BRCAness. I due meccanismi di riparazione si potrebbero compensare, ma ciò non avviene perché uno è difettoso (BRCA), e l'altro inibito per via farmacologica.

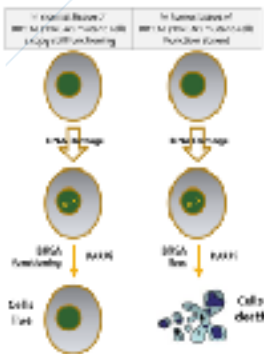


**Inibitori PARP: fenomeno della letalità sintetica razionale**

Es con un tavolo: l'inibitore PARP rompe una delle gambe ma rompendo una delle gambe, sebbene instabile, il tavolo rimane dritto. In presenza di cellule tumorali che mancano della capacità di riparare la gamba del tavolo, la presenza dell'inibitore PARP porta alla rottura anche di una seconda gamba e quindi il tavolo cade e si rompe.

**Cosa succede nei pazienti che hanno la mutazione BRCA1/2?**

In generale le cellule di questi individui presentano comunque una copia di BRCA1/2 funzionante. Solamente nelle cellule tumorali la seconda copia di BRCA1/2 (secondo allele) è andata persa e quindi la loro funzione è assente. In presenza di un danno, e all'aggiunta dell'inibitore PARP, nelle cellule normali BRCA1 o 2 è ancora funzionante e quindi le cellule riparano il danno. Questo non succede nelle cellule tumorali che hanno perso la funzione di BRCA e quindi saranno quelle maggiormente colpite dagli inibitori PARP e quindi avranno degli effetti minimi sulle cellule non tumorali e determineranno la morte invece delle cellule tumorali. Quando si verifica la perdita funzionale di entrambe le copie di BRCA, l'inibire PARP agisce a concentrazioni estremamente basse.



Quando la cellula non ha la funzionalità di BRCA è estremamente suscettibile agli inibitori PARP. Questo è stato portato a sperimentazioni cliniche nei pazienti.

Lo studio SOLO 2 di fase III di confronto tra l'inibitore di PARP olaparib rispetto al placebo ha mostrato una sopravvivenza libera da progressione per i pazienti affetti da carcinoma ovarico con mutazione BRCA era di 14 mesi più lunga rispetto al braccio di controllo.

## SINDROME DI LYNCH O HEREDITARY NON POLYPOSIS COLON CANCER (HNPCC)

La sindrome di Lynch è una malattia ereditaria che aumenta il rischio di molti tipi di tumore, in particolare:

- tumori del colon e del retto: prevalentemente al colon prossimale.
- tumori dello stomaco, dell'intestino tenue, del fegato, dei dotti della cistifellea, del tratto urinario superiore, del cervello e della pelle.
- Inoltre, le donne con sindrome di Lynch hanno un alto rischio di cancro al endometrio e alle ovaie
- Gli individui affetti da sindrome di Lynch generalmente sviluppano i tumori ad una età compresa tra 40-60 anni.

Si ritiene che circa il 3-5% dei tumori al colon retto sono attribuibili alla Sindrome di Lynch, infatti un individuo su 200-400 è portatore di questo carattere nella popolazione.

Il segno distintivo di HNPCC è la riparazione difettosa del DNA mismatch (errori che si introducono durante la replicazione del DNA). I 4 geni principali coinvolti nel HNPCC sono MSH2 (60% dei casi), MLH1 (30% dei casi), MSH6 (7-10%) e PMS2. Questo difetto porta all'instabilità dei microsatelliti, detto anche MSI-H, evidenziabile da cambiamenti nella lunghezza di ripetizioni dinucleotidiche CACACACACA.

### Fisiopatologia

I 4 geni principali coinvolti nella sindrome di Lynch sono MSH2, MLH1, MSH6 e PMS2.

I geni MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 codificano per proteine coinvolte nel mismatch repair, errori che si accumulano durante la duplicazione del DNA.

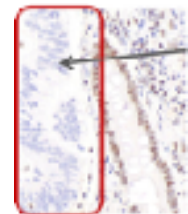
La proteina MSH2 dimerizza con MSH6, per identificare i mismatch, cioè gli appaiamenti di basi sbagliati. La proteina MLH1 dimerizza con PMS2 per formare MutL $\alpha$  (un complesso), che coordina il legame di altre proteine coinvolte nella riparazione, come DNA elicasi, proteina di legame del DNA a singolo filamento (RPA) e DNA polimerasi.

Il segno distintivo di HNPCC è la riparazione difettosa del DNA mismatch. Mutazioni inattivanti anche in uno solo dei geni MSH2, MLH1, MSH6 e PMS2 impediscono la corretta riparazione degli errori di replicazione del DNA. Tale inefficace riparazione degli errori porta ad accumulo di mutazioni in tutto il genoma ed incrementa la probabilità di alterazioni in proto-oncogeni o in oncosoppressori, capaci di promuovere il cancro.

### Diagnosi

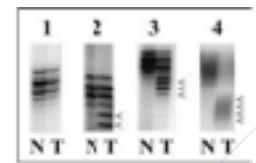
Due sono i principali metodi di diagnosi:

- Indagini immunohistochimiche evidenziano la perdita di espressione di proteine (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) implicate nel mismatch repair. Nella foto si vede adenocarcinoma colon rettale con perdita di espressione di MLH1. È evidente la differenza con le cellule normali vicine.



- L'analisi dei microsatelliti può indicare il difetto nel processo di mismatch repair e portare ad indagini su pedigree familiare ed indagini molecolari per identificare mutazioni germinali. Nella foto si vede l'instabilità dei microsatelliti in tumori di individui con sindrome di Lynch.

T=tumore e N= tessuto normale.



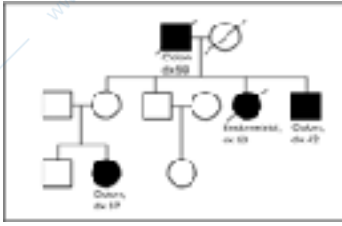
Queste indicazioni ci hanno permesso di capire che esista un danno in uno dei geni implicati nel mismatch repair. Deve essere svolta una ricerca di mutazioni nello stato germinale di uno di questi geni (MLH1, MSH2, MSH6, e PMS2) e quindi la valutazione dovrà essere fatta mediante un pannello genetico attraverso l'uso di sequenziamenti di nuova generazione.

Analisi della delezione del gene EPCAM è anche indicata (si tratta di un gene vicino a MSH2 la cui delezione impatta sull'espressione di MSH2).

### Trasmissione ereditaria

Il rischio di cancro della sindrome di Lynch è ereditato in maniera autosomica dominante: una copia del gene alterato è sufficiente per aumentare il rischio di cancro. È importante notare che le persone ereditano un aumentato rischio di cancro, non la malattia stessa. La malattia presenta una penetranza incompleta: complessivamente 80-90% (50-60% per il carcinoma colon-rettale).

### Counseling genetico



Vista la storia familiare, il consultando indicato dalla freccia chiede di conoscere quale sia il rischio di essere portatore di un gene predisponente al cancro e conseguentemente la probabilità di trasmetterlo alla progenie. Considerando la tipologia di tumori che si osservano (endometrio, colon), la famiglia potrebbe essere una Lynch. Se una mutazione in MSH2 o altri geni fosse nota nella famiglia, sarebbe semplice svolgere un'indagine molecolare per fornire una risposta certa al consultando. In assenza di tale informazione, vi sono algoritmi predittivi utilizzabili ad esempio PREMM (Dana Farber Cancer Institute).

Il modello PREMM è un algoritmo clinico che stima la probabilità cumulativa di un individuo portatore di una mutazione germinale nei geni MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 o EPCAM. Le mutazioni di questi geni causano la sindrome di Lynch e ereditano la sindrome da predisposizione al cancro. Inserendo i dati della famiglia precedente per il consultando il rischio di essere portatore di un gene di rischio è del 23.6%. Se il rischio è superiore al 2.5%, l'indicazione è di svolgere indagini diagnostiche più approfondite, inclusa la ricerca di mutazioni germinali in geni del mismatch repair.

### Sorveglianza e management

- Per portatori non affetti (genotipo noto):
  - Colonscopia ogni 1-2 anni
  - Per donne: esame ginecologico annuale a partire dai 25 anni; screening ecografico ed eco-doppler per carcinoma ovarico; ricerca del biomarcatore CA-125
- Membro di famiglia a rischio (genotipo non noto):
  - Colonscopia ogni 2-3 anni
  - Per donne: esame ginecologico annuale, a partire dai 30-35 anni

### Trattamenti terapeutici e preventivi

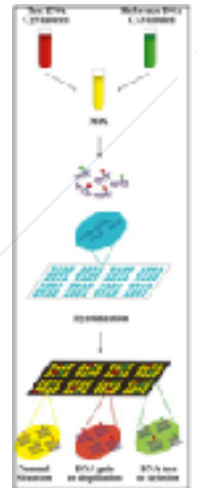
- La chirurgia rimane l'approccio terapeutico principale per la rimozione dei tumori che insorgono nei pazienti con sindrome di Lynch.
- Rimozione di utero, ovaio e tube del Falloppio: opzione come profilassi, qualora la donna non ha più in programma la gravidanza.
- Terapia adiuvante sistemica post intervento è basata principalmente sull'uso di 5- fluorouracile (5-FU). Immunoterapia basata su anticorpi anti-PD1 sembra essere efficace nei tumori MSI-H

### Prevenzione

Come profilassi, è stato descritto che l'uso di aspirina per almeno 4 anni ha un effetto protettivo sullo sviluppo di tumori del colon-retto nei pazienti con sindrome di Lynch. Tuttavia, molti individui non possono tollerare l'uso prolungato di aspirina a causa di gravi effetti collaterali, quali ulcera gastrica, sanguinamenti, angioedema, ecc.



Un tipo di indagine che si può fare direttamente sulle cellule del liquido amniotico è detta tecnica di Array-CGH che è un'indagine di citogenetica molecolare. Consente di analizzare rapidamente l'intero genoma per perdita o acquisizione di interi o parti di cromosomi. È costituita da un vetrino in cui sono presenti migliaia di sonde che corrispondono all'intero genoma umano. L'analisi prevede la marcatura del DNA-test (quello isolato dalle cellule del liquido amniotico), marcato con un colore rosso (es. cianina5) e viene confrontato con un DNA di riferimento normale marcato in maniera diversa per esempio di verde (es. cianina3). Una volta che questa ibridazione viene svolta insieme, le diverse sonde ibridizzeranno sia il DNA del test sia il DNA normale e si verrà a costituire un segnale giallo che è dato dall'ibridazione dei due DNA qualora vi sia un equilibrio dei due DNA. Ma se il DNA del test è in eccesso (regione cromosomica in più) sarà prevalente il colore rosso nelle sonde corrispondenti a quel cromosoma oppure se vi è una delezione della regione sarà prevalente il colore verde del DNA normale.



Rispetto all'esame citogenetico tradizionale, l'analisi Array CGH ha una risoluzione 100 volte più elevata. Ciò consente di identificare alterazioni cromosomiche submicroscopiche (microdelezioni o microduplicazioni) e le eventuali malattie associate.

Altre analisi molecolari che si possono svolgere sono:

- Qualora la storia familiare lo suggerisca, indagini molecolari su specifici geni possono essere svolte tramite l'impiego di:
  - tecnologie basate su PCR
  - sequenziamento del DNA
- Nel nostro territorio, per l'alta incidenza, analisi molecolari per mutazioni in geni per beta-talassemia (b-globina) o fibrosi cistica (CTFTR) sono frequenti

AMNIOCENTESI: Scheda tecnica	
Periodo di esecuzione:	dalla settimana 15 alla 20 di gravidanza
Metodica:	prelevati circa 25 cc. di liquido amniotico introducendo un ago nell'utero attraverso l'addome, sotto controllo ecografico
Indicazioni:	determinazione del cariotipo fetale; verifica del passaggio transplacentare di patogeni infettivi (rosolia, toxoplasma ect.) mediante PCR, diagnosi molecolare di malattie genetiche.
Risposte:	- 12-15 giorni per cariotipo fetale tradizionale - 2-3 giorni per cariotipo fetale mediante array-CGH - 24-48 ore per PCR quantitativa (trisomia 21, 18, 13, ed alterazioni dell'X e dell'Y) - 24 ore per valore dell'alfa - fetoproteina (AFP), marcatori di difetti del tubo neurale
Successo del prelievo:	nel 98% dei casi al primo tentativo e 99,8% circa al secondo.
Svantaggi:	- abortività in seguito all'esame circa l'0,2-0,3% - fallimento dell'analisi nello 0,2% circa (1/500)

### Villocentesi

Un altro approccio per prelevare materiale fetale e diagnosticare l'eventuale presenza di anomalie cromosomiche o genetiche è tramite i villi coriali o villocentesi. La villocentesi è il prelievo di materiale dai villi coriali, tessuto che formerà la placenta. Questo prelievo è svolto tra le 11 e 13 settimane di gravidanza, e comunque entro le 15 settimane. Perciò, l'analisi sui villi può essere svolta più precocemente dell'amniocentesi. Il rischio di aborto connesso alla villocentesi si aggira intorno allo 1 %. I villi coriali sono un annesso embrionale che non verrà a costituire il tessuto del feto. Ciò rende possibile discrepanza tra l'assetto cromosomico dei villi coriali e del feto.

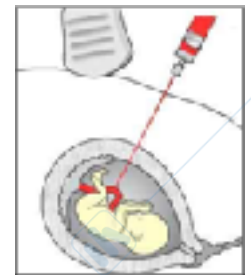


Mosaicismo: due linee cellulari con differente assetto cromosomico. In caso di alterazioni queste potrebbero coinvolgere il feto o essere confinate ai villi. Mosaicismo presente in circa 1% delle analisi sui villi coriali. Nell'analisi dei villi, sono possibili: falsi positivi o falsi negativi,

VILLOCENTESI: Scheda tecnica	
Periodo di esecuzione:	non può essere eseguita prima della 10a settimana di gravidanza per legge ministeriale; il periodo ottimale è l'11a-12a settimana.
Metodica:	mediante controllo ecografico, l'ago viene inserito nell'addome materno e l'operatore preleva, piccoli frammenti di villi coriali
Indicazioni:	determinazione del cariotipo fetale; diagnosi molecolare di malattie genetiche.
Risposta:	- 24-48 ore per PCR quantitativa (trisomia 21, 18, 13, ed alterazioni dell'X e dell'Y); - 24-48 ore per l'analisi citogenetica "diretta" - 2-3 giorni per il cariotipo fetale mediante array-CGH - 12-15 giorni per il cariotipo fetale tradizionale (metodo coltura cellulare);
Successo del prelievo:	nel 98% dei casi al primo tentativo e 99,8% circa al secondo.
Svantaggi:	- abortività, circa l'1%; - Mosaicismi genetici, circa 1% dei casi. - fallimento dell'analisi nello 0,2% circa dei casi

### *Funicolocentesi o cordocentesi*

La funicolocentesi o cordocentesi è il prelievo di sangue dal cordone ombelicale del feto. È utile quando non è possibile ottenere informazioni attraverso l'amniocentesi, la villocentesi o l'ecografia (o se i risultati di questi test erano inconcludenti); infatti, questo prelievo comporta un rischio significativo di complicanze ed è in genere riservato a gravidanze ad alto probabilità di difetto genetico.



CORDOCENTESI o FUNIColocENTESI: Scheda tecnica	
Periodo di esecuzione:	Viene eseguita dopo la 18-20 <sup>a</sup> settimana di gravidanza.
Metodica:	prelevati 1-3 cc di sangue fetale dal cordone ombelicale, con un ago infisso attraverso l'addome materno, sotto guida ecografica
Indicazioni:	necessità di determinare il cariotipo fetale in epoca avanzata di gravidanza, dubbi diagnostici in seguito ad amniocentesi
Risposta:	- 72-96 ore per l'analisi citogenetica "diretta" - 2-3 giorni per il cariotipo fetale mediante array-CGH
Svantaggi:	- abortività elevata, circa 1-4%; - fallimento dell'analisi nello 1% circa

### *Disciplina della interruzione volontaria di gravidanza in Italia*

La diagnosi prenatale è spesso propedeutica ad una eventuale scelta di interruzione volontaria di gravidanza (IVG). In Italia, è la legge n. 194 del 22 maggio 1978 che ha depenalizzato e disciplinato la IVG. La 194 consente alla donna di ricorrere alla IVG in una struttura pubblica o convenzionata, nei primi 90 giorni di gestazione (13 settimane). Mentre tra il quarto e quinto mese (20 settimane) è possibile ricorrere alla IVG solo per ragioni mediche.

## NON INVASIVE PRENATAL TEST (NIPT)

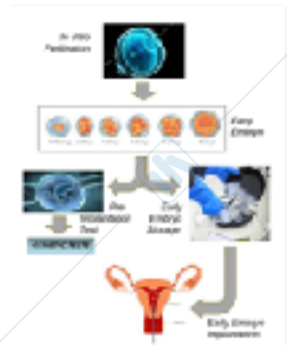
Consente analisi del DNA fetale ma è di tipo non invasivo. DNA fetale libero (cell free fetal DNA, cffDNA) è presente nel sangue materno. Circa il 10-13% del DNA libero circolante è di origine fetale. Il DNA fetale origina da microparticelle di placenta che vengono riversate nel sangue materno. Perciò un prelievo venoso di sangue materno da cui è isolato il plasma che può essere usato per analizzare anche il DNA fetale. Può essere svolto a partire dalle 10 settimane di gestazione. Principale vantaggio è che non è invasivo e non implica alcun rischio per il feto. Tuttavia non è un'indagine diagnostica, ma di screening.

NIPT può essere svolto a partire dalle 10 settimane di gestazione. Le principali analisi svolte riguardano la ricerca di eventuali anomalie cromosomiche. L'analisi del cffDNA mediante NIPT non è un metodo di diagnosi prenatale. Bensì un metodo di screening non invasivo sul rischio di avere un figlio affetto da una patologia cromosomica spesso richiesto per donne in età avanzata. Qualora NIPT indichi un rischio elevato, la diagnosi dovrà basarsi su un approccio tradizionale, ad esempio sull'analisi di un campione prelevato mediante amniocentesi.

## TEST GENETICO PREIMPIANTO

Analisi viene svolta su DNA isolato da una cellula presa da un embrione nelle sue primissime fasi di sviluppo. Il test genetico preimpianto (TGP o Preimplantation Genetic Test, PGT) ha come obiettivo quello di impedire la trasmissione di malattie ereditarie. Essa può essere svolta nel corso di un programma di fecondazione in vitro. È ovviamente utile nel caso in cui in famiglia vi siano casi di malattie genetiche o la madre abbia un'età sopra i 35 anni e si sottopone ad un programma di fecondazione assistita.

Questa indagine è svolta nell'ambito della procreazione medicalmente assistita (PMA). Essa inizia con la fecondazione/fecondazione in vitro. Successivamente viene fatta una coltivazione in vitro dell'embrione per arrivare ad 8-16 cellule a livello di blastocisti. Dopo di che si ha la criopreservazione degli embrioni (congelati per essere conservati prima dell'impianto nell'utero della madre). Durante lo sviluppo dell'embrione, si procede con una «biopsia» di cellule. Ciò avviene generalmente a 3 giorni di sviluppo dell'embrione (stadio di 8 cellule o blastomeri), oppure allo stadio di blastocisti. Una o due cellule sono prelevate per svolgere le appropriate indagini genetiche. Termina con l'impianto dell'embrione nella madre.



Quali indagini genetiche preimpianto si possono svolgere?

In linea teorica, tutte le malattie, autosomiche dominanti, recessive o X-linked, per le quali sia stato identificato il gene responsabile. Malattie genetiche diffuse in Italia in cui la diagnostica preimpianto trova applicazione sono: Beta-Talassemia, Anemia Falciforme, Emofilia A e B, Distrofia Muscolare di Duchenne-Becker, Distrofia Miotonica, Fibrosi Cistica, Atrofia Muscolare Spinale (SMA), Sindrome di Lesch-Nyhan, Malattia di Charcot-Marie-Tooth, Alfa-1-Antitripsina e X-Fragile.

### PMA e diagnosi preimpianto in Italia

La procreazione medicalmente assistita (PMA) in Italia è disciplinata dalla legge n. 40 del 19 febbraio 2004 "Norme in materia di procreazione medicalmente assistita". Numerosi pronunciamenti della Corte costituzionale hanno modificato una serie di limiti imposti dalla legge 1 aprile 2009: illegittimi i commi 2 e 3 dell'articolo 14.

- 1 aprile 2009: illegittimo il divieto di diagnosi preimpianto.
- 9 aprile 2014: l'illegittimità della legge 40 rispetto agli articoli 2, 3, 29, 31, 32, e 117 della costituzione e agli articoli 8 e 14 della Convenzione per la salvaguardia dei diritti dell'uomo.
- 11 novembre 2015: illegittimo l'articolo 13, commi 3, lettera b, e 4, che sanzionava penalmente la condotta dell'operatore medico volta a consentire il trasferimento nell'utero della donna dei soli embrioni sani o portatori sani di malattie genetiche.

Per quanto concerne la diagnosi preimpianto:

- Nel 2007 il tribunale di Cagliari aveva autorizzato la diagnosi preimpianto nel settore pubblico.
- Nel novembre 2012, il tribunale di Cagliari aveva imposto all'azienda sanitaria locale di eseguire la diagnosi preimpianto per una coppia portatrice di malattie genetiche
- Il 28 agosto 2012 la Corte europea dei diritti umani ha bocciato la legge sulla impossibilità per una coppia fertile, ma portatrice di una malattia genetica, di accedere alla diagnosi preimpianto degli embrioni.
- Il Governo Monti aveva chiesto il 28 novembre 2012 il riesame della sentenza presso la Grande Chambre della Corte europea.
- L'11 febbraio 2013 il ricorso del governo è stato bocciato dalla corte

