

## CONSULENZA GENETICA

- ATTO DURANTE IL QUALE VENGONO FORNITE TUTTE LE INFORMAZIONI POSSIBILI RIGUARDO IL COMPORTAMENTO PER PROGRAMMARE UNA GRAVIDANZA
- Prevede conoscenze mediche che altre discipline non possiedono
- È una disciplina emergente

È necessario:

- VERIFICARE LA DIAGNOSI: bisogna sapere di che malattia si parla e indagare su vari problemi:
  - ✓ ETEROGENEITA' GENETICA: genotipi diversi possono dar luogo a fenotipi molto simili (es. Distrofia muscolare progressiva)
  - ✓ FENOCOPIE: situazioni cliniche che simulano malattie genetiche, ad esempio la microcefalia che può essere dovuta anche a infezioni o radiazioni in gravidanza, o anche ad utero sedimentario
- STESURA CORRETTA DELL'ALBERO GENEALOGICO. per lo studio della modalità di trasmissione (aut dominante, recessiva, x-linked)
- ILLEGGITTIMITA'. Non paternità biologica, si stima che il 15% di tutti i figli non sono figli del padre di famiglia.

A RICHIEDERE UNA CONSULENZA GENETICA SI VIENE PER :

- PROBLEMATICHE CROMOSOMICHE :
  - ✓ Trisomie: possono riguardare crom. sia sessuali che non (S. DI Down 21 s. di Edwards 18, S. di Patau 13)
  - ✓ Monosomie. l'unica compatibile con la vita è quella che riguarda il crom X
- **S. di Down:**
  1. Traslocazione sbilanciata (il 21 migra su 14-15-21)
  2. Traslocazione libera: i cromosomi sono liberi
  3. Traslocazione bilanciata: non sono fenotipicamente evidenti. tutto il cromosoma migra su un altro, al momento della segregazione può sbilanciarsi
  4. Poi bisogna fare la DD tra trisomia :
    - ✓ libera, il rischio che si ripresenti la sindrome di Down direttamente proporzionale all'età della madre
    - ✓ di traslocazione, il rischio che si ripresenti dipende sia dalla madre che dal padre

in caso di malattie multifattoriali (esiste una correlazione tra genotipo e ambiente, il genotipo agisce come "predisposizione genetica" che da solo non è sufficiente perché si manifesti la malattia.

Ricordiamo che il termine genetico(riconosce una mutazione genetica) è diverso da congenito(presente alla nascita)

Fattori: sono variabili, si usano le tabelle di Speed che tengono conto della:

- ✓ **GRAVITA'**(il rischio di ricorrenza è direttamente proporzionale alla gravità):es.Megacolon congenito: intestino >20 cm→rischio ricorrenza 10-15%  
Intestino <20 cm→” “ 5%
- ✓ **SESSO**:es.Stenosi del piloro,alla nascita è più frequente nei M perché hanno una soglia di infezioni > rispetto alle F. In questo caso il sesso che alla nascita è meno colpito è quello che più frequentemente ha figli con malattia
- ✓ **NUMERO DEGLI AFFETTI**:  
nelle multifattoriali il rischio di ricorrenza è direttamente proporzionale al n.degli affetti  
nelle m.Genetiche il rischio è sempre =50% qualunque sia il n.di affetti.

Ogni nascita di affetto aumenta la probabilità che il successivo sia affetto.

## DIAGNOSI PRENATALE

Le patologie dominanti hanno 2 eccezioni :

- penetranza incompleta
- espressività genetica minima
- anticipazione genetica legata al meccanismo dell'espansione da triplette, questo potrebbe portarci a dire che il pz nn ha ereditato la malattia e quindi è in diritto di procreare con il rischio di concepire un figlio malato.

Indicazioni alla diagnosi prenatale CITOENETICHE

- MADRI IN Età AVANZATA > 35 anni
- Coppie con precedenti figli affetti da patologie cromosomiche
- Genitori con anomalie cromosomiche bilanciate
- Riscontro Eco di malformazioni fetali(ritardo sviluppo fetale,anomalie liquido amniotico)
- Alterazione parametri biochimici
- Genitori portatori di aneuploidia non associati a infertilità
- Alcune malattie mendeliane
- Gravidanza ottenuta con fecondazione artificiale
- Malattie mendeliane X-linked per le quali è stato riconosciuto un difetto metabolico
- Malattie infettive contratte e riacutizzate in gravidanza

### Parametri biochimici da valutare:

Esiste il **Tritest**:

1.  $\alpha$  fetoproteina (AFP) → per S. Turner, labioschisi, gravidanze multiple
2. estriolo non coniugato (nE3)
3. B hCG

esempio:

1. AFP diminuita nel sangue materno, aumentata nel sangue fetale
2. nE3 diminuito
3. BhCG aumentato

} **S. di Down**

A TUTTE LE DONNE > DI 35 ANNI VENE OFFERTA LA POSSIBILITÀ DI DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

ESISTE ANCHE IL BITEST: BhCG E PAPP-A (PROTEINA PLASMATICA ASSOCIATA ALLA GRAVIDANZA)

### **TECNICHE DI PRELIEVO TESSUTI FETALI**

- **AMNIOCENTESI** tra 15-18 settimana, gli amniociti dopo centrifugazione con la fetemoagglutinina messi in coltura, bisogna indurli alla mitosi, si fa analisi del cariotipo tramite citogenetica, il risultato entro 3 settimane
- **VILLOCENTESI** tra 9 e 11 settimana, si fa analisi citogenetica e molecolare, non devono essere messi in coltura, presentano mitosi spontanee, il risultato entro 48 h

Entrambe le tecniche possono indurre all'aborto o ad anomalie fetali

- **FUNICOLOCENTESI**, prelievo di sangue fetale per malattie ematologiche
- **FETOSCOPIA** (isolamento cell fetali dal sangue materno, bassa specificità, alta sensibilità)

Qualora ci sia incompatibilità Rh sempre profilassi immunoglobulinica

## **Terapia genica**

Per **terapia genica**, si intende l'inserzione di materiale genetico (DNA) all'interno delle cellule al fine di poter curare delle patologie. Questa procedura di inserzione è nota come transfezione.

Si è valutata così la possibilità di trasfettare le cellule somatiche di un individuo avente una malattia genetica con un segmento di DNA contenente l'allele sano. Questo approccio si è successivamente esteso anche alle patologie non mendeliane come tumori, infezione da HIV ed altre patologie in cui non si va a sostituire un gene difettoso ma se ne aggiunge uno che possa mettere in moto un fenomeno terapeuticamente utile.

### ***Tipologie di terapia genica***

Esistono due tipologie di terapia genica: quella delle **cellule germinali** e quella delle **cellule somatiche**.

La prima si propone di trasfettare le cellule della linea germinale come spermatozoi ed ovociti o le cellule staminali totipotenti dei primissimi stadi dello sviluppo dell'embrione (allo stadio di 4-8 cellule)

La seconda tipologia, invece, si propone di modificare solamente le cellule somatiche. La terapia genica delle cellule somatiche, a sua volta, viene suddivisa in due gruppi: la terapia genica **ex vivo** e quella **in vivo**.

### **La terapia genica ex vivo**

Consiste nel prelievo delle cellule somatiche della persona interessata. Successivamente vengono messe in coltura in laboratorio. Durante questo tempo vengono anche trasfettate con il gene d'interesse, inserito tramite un apposito vettore (spesso vettori virali), poi vengono reinfuse o reinpiantate nel corpo del soggetto. Tale procedura è sicuramente la più lunga e la più costosa delle due ma permette di selezionare ed amplificare le cellule d'interesse ed inoltre gode d'una maggior efficienza.

### **La terapia genica in vivo [**

Viene attuata in tutti quei casi in cui le cellule non possono essere messe in coltura, o prelevate e reimpiantate, come quelle del cervello o del cuore e della maggior parte degli organi interni. Rappresenta un modello terapeutico con elevata compliance, è molto economico ma, attualmente, di più difficile applicazione. In questo caso il gene, o oligonucleotide d'interesse viene inserito nell'organismo, tramite un opportuno vettore, direttamente per via locale o sistemica. I sistemi attualmente studiati sono di tre tipi: lipoplessi, poliplessi, lipopoliplessi. Questi, si formano attraverso l'interazione elettrostatica tra il DNA (carico negativamente) e nanoparticelle (cariche positivamente). Le nanoparticelle possono essere rispettivamente di tipo lipidiche (liposomi cationici), o polimeriche (policationi), o un sistema supramolecolare formato da liposomi e policationi. Potenzialmente tutti i tre tipi di vettori non virali potrebbero sostituire gli attuali vettori virali e fisici.

### **La prima tappa**

- Conoscere la fisiopatologia della malattia in questione
- Identificare gli eventuali geni alterati o coinvolti nel processo o quelli terapeutici
- Una volta individuato il gene d'interesse esso viene amplificato, clonato e sequenziato.

### **Tipologie di trasferimento**

Una volta che il gene d'interesse viene inserito nella cellula può accadere che esso vada incontro ad integrazione nel genoma cellulare oppure che rimanga esterno formando una particella episomale.

L'integrazione nel genoma permette la replicazione del gene ed il suo trasferimento alle cellule figlie derivanti dalla duplicazione della cellula madre.

La particella episomiale, invece, non viene interessata dalla duplicazione per cui essa non viene trasmessa alle cellule figlie. È possibile ovviare a questa situazione, comunque, associando al gene terapeutico un'origine di replicazione, una sequenza di DNA che permette l'aggancio delle polimerasi cellulari, che fa sì che l'episoma venga trasmesso alle cellule figlie.

Avendo a che fare con malattie genetiche, infatti, bisogna utilizzare un gene che si replichi in maniera stabile per cui lo si deve far integrare nel genoma dell'ospite (per esempio utilizzando un retrovirus) oppure lo si può inserire sotto forma di particella episomiale contenente un'origine di replicazione.

In altri casi, invece, il gene terapeutico è necessario solo per un certo periodo di tempo per cui lo si può aggiungere sotto forma di particella episomiale priva dell'origine di replicazione.

### **Metodologia del trasferimento genico**

I diversi sistemi utilizzati per realizzare questo processo vengono attualmente distinti in virali e non virali.

#### **Il trasferimento non virale**

- Iniezione di DNA nudo (procedura lineare e semplice che permette di trasferire costrutti genici di grandi dimensioni. Consiste nell'iniettare il gene terapeutico, legato ad un plasmide, direttamente nella cellula tramite l'utilizzo d'una micropipetta. Lo svantaggio di questa metodica consiste nel fatto che bisogna iniettare il DNA in ogni cellula, una per una). Il rendimento, inoltre, è decisamente basso.
- Inserimento tramite liposomi
- Inserimento attraverso l'uso di polimeri cationici
- Bombardamento tramite particelle (gene gun).

Usando liposomi cationici è possibile far complessare ad essi il DNA, che a pH neutro presenta carica negativa. Il complesso DNA-liposoma può fondersi con la membrana cellulare ma nella maggior parte dei casi viene internalizzato tramite endocitosi.

Successivamente il DNA viene liberato nel citoplasma, entra nel nucleo e viene espresso. Sfortunatamente questo processo è a bassa efficienza. Per ovviare a ciò nei liposomi sono state anche inserite proteine ed anticorpi che possano aumentare l'efficacia della procedura minimizzando la degradazione del DNA e facilitando il corretto direccionamento della vescicola.

Molto simile è la procedura che si applica per la transfezione che utilizza polimeri cationici, infatti polimeri dotati di molteplici cariche positive interagiscono con il DNA, che, come già detto, a pH fisiologico è un polianione, provocandone la condensazione e proteggendolo da aggressivi sia chimici che enzimatici, oltre che da radiazioni ionizzanti. Anche i complessi DNA-policatione vengono internalizzati dalla cellula per endocitosi, e possono essere attivamente indirizzati verso specifiche linee cellulari o tessuti utilizzando anticorpi o altre molecole direccionanti.

Il quarto metodo consiste nell'utilizzo di particolari strumenti elettrici o ad alta pressione, detti cannoni genici (gene gun), che permettono di inviare nella cellula particelle microscopiche d'oro o di tungsteno ricoperte da DNA.

### **Il trasferimento virale**

Si basa sull'utilizzo di opportuni virus ricombinanti.

I virus hanno un'ottima tendenza ad infettare le cellule ed ad inserirvi il proprio DNA sia integrandolo sia sotto forma d'episoma. Rispetto ai sistemi di trasferimento non virali, quindi, hanno un'efficienza nettamente maggiore. I virus da impiegare, tuttavia, devono godere d'alcune caratteristiche:

- le particelle virali ricombinanti, rispetto al *wild-type* (*tipo selvaggio* cioè il virus non ricombinato), devono essere difettive rispetto alla replicazione
- il virus non deve possedere alcune qualità non desiderabili (tipo produzione di composti tossici od attivazione del sistema immunitario)
- vi dev'essere spazio a sufficienza per il gene terapeutico (vincolo di dimensione).

I virus attualmente studiati quali vettori per la terapia genica sono:

- i retrovirus,
- i lentivirus,
- gli adenovirus,
- i virus adenoassociati,
- gli herpesvirus.