

GENETICA DELLA RIPRODUZIONE

Polo GGB offre un panorama di esami utili a garantire una riproduzione consapevole, proponendo un'estesa offerta di genetica della riproduzione in grado di coprire le diverse fasi della vita riproduttiva della coppia.

Le analisi proposte includono esami per la valutazione di rischio nella riproduzione (genetica preconcezionale), per l'individuazione di cause/patologie associate a problemi di fertilità (procreazione medicalmente assistita), e Test prenatali non invasivi per l'individuazione di difetti congeniti nell'embrione e nel feto rispettivamente.

Nel dettaglio l'offerta del Polo GGB è distinta in:

- Genetica preconcezionale
- Infertilità e procreazione medicalmente assistita
- Genetica prenatale

Genetica preconcezionale

Polo GGB mette a disposizione della coppia una serie di analisi genetiche preconcezionali in grado di permettere la valutazione del rischio associato alla riproduzione al fine di compiere scelte riproduttive consapevoli e informate.

Fibrosi cistica

La fibrosi cistica è una malattia genetica che può interessare diversi organi, principalmente polmoni, pancreas, intestino e ghiandole sudoripare. I pazienti affetti da fibrosi cistica secretano muco denso e il blocco del rilascio degli enzimi pancreatici e quindi l'inibizione della digestione di lipidi e proteine.

L'insorgenza della malattia è dovuta alla presenza di una mutazione in entrambe le copie del gene *CFTR*. Questo codifica per una proteina, la Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, che regola il passaggio del cloro attraverso le membrane delle cellule epiteliali. Mutazioni a carico del gene *CFTR* possono causare un funzionamento anomalo di questa proteina, o la sua totale assenza. Di conseguenza, le secrezioni dell'organismo non presenteranno sufficiente cloro e acqua, rendendole dense e appiccicose. Queste secrezioni andranno quindi ad accumularsi in varie sedi, come i bronchi, provocando infezioni respiratorie come bronchiti e polmoniti.

La fibrosi cistica può presentarsi in varie forme, più o meno tipiche, e con gradi di gravità molto diversi da persona a persona. La manifestazione della malattia avviene solamente quando entrambi le copie del gene *CFTR* presentano mutazioni. Nel caso in cui solo una delle copie del gene risultasse mutata, l'individuo risulterebbe un portatore sano della malattia, capace di trasmettere il gene mutato ai figli in caso di riproduzione.

Indagini di popolazione riportano un tasso del portatore sano di 1 soggetto ogni 30. Per tale motivo è offerta la possibilità di verificare in epoca preconcezionale l'eventualità per entrambi i membri della coppia di essere portatore sano della patologia.

A chi è rivolto il test:

L'esame è consigliato a chi presenta familiarità con la patologia e ai rispettivi partner e alle coppie che vogliono verificare il proprio stato di portatore in fase preconcezionale.

Risultati:

Il saggio prevede il sequenziamento NGS delle porzioni codificanti del gene *CFTR* e delle relative regioni fiancheggianti. Su richiesta è possibile avere un esito in merito alle variazioni del numero di copie del gene o parti di esso.

Sindrome dell'X fragile

La sindrome dell'X fragile è una malattia ereditaria causata dall'alterazione del gene *FMR1* (Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1), situato nel cromosoma X, codificante per la proteina FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), di fondamentale importanza per il normale sviluppo cognitivo dell'individuo e per la riproduzione femminile. La regione 5'UTR del gene *FMR1* presenta al suo interno una sequenza di triplette CGG ripetuta. In condizioni normali, il numero di ripetizioni di queste triplette oscilla tra 5 e 44 (con 29 e 30 le ripetizioni più comuni). Superate le 44 ripetizioni, si può essere in presenza di diversi tipi di variazioni, con diversi livelli di rischio.

- **Zona grigia:** tra le 45 alle 55 ripetizioni CGG.
- **Premutazione:** tra le 56 alle 200 ripetizioni CGG.
- **Mutazione completa (Full mutation):** superiori a 200 ripetizioni CGG.

L'analisi genetica rileva il numero di ripetizioni della tripletta CGG in prossimità del gene *FMR1*, ed è particolarmente importante, in epoca preconcezionale, osservare la presenza di premutazioni. Infatti, circa 1 donna su 259 presenta premutazioni, rendendola così portatrice sana della malattia. Le premutazioni, infatti, tendono ad espandersi nella generazione successiva, aumentando così le probabilità che il corredo genetico dei figli presenti una mutazione completa responsabile di sindrome della X fragile, con conseguenti disturbi cognitivi e dello sviluppo. La probabilità che la premutazione si espanda nella riproduzione è solitamente proporzionale alla dimensione della premutazione.

A chi è rivolto il test:

L'esame è consigliato a donne e rispettivi partner con storia familiare positiva per la sindrome dell'X fragile, per coppie che vogliono determinare il rischio di generare figli/e affetti/e dalla sindrome dell'X fragile, a donne con problemi riproduttivi e di fertilità.

Risultati:

Il saggio prevede l'amplificazione tramite PCR della regione contenente la ripetizione di triplette CGG, discriminandone il numero di ripetizioni causa di anomalia.

Distrofia miotonica

La distrofia miotonica di tipo 1 (DM1) è una malattia muscolare ereditaria, caratterizzata da progressiva debolezza muscolare e miotonia, e che, a seconda della gravità, può arrivare a coinvolgere molti organi (cuore, apparato respiratorio, occhi, sistema endocrino, sistema nervoso centrale).

La malattia si verifica quando si presenta un numero anomalo di ripetizioni delle triplette di nucleotidi CTG sul gene *DMPK*. In condizioni normali, le ripetizioni di questa sequenza nucleotidica oscillano tra 5 e 36 ripetizioni. Le ripetizioni che vanno da 37 a 49 sono invece considerate premutazioni, uno stadio per cui la malattia non si presenta, ma si è considerati portatori sani. Un numero delle triplette superiore a 50, a volte raggiungendo anche le migliaia di ripetizioni, comporta la presenza della malattia.

È importante, in epoca preconcezionale, indagare la presenza di premutazioni sul gene a causa del fenomeno dell'anticipazione. Questo prevede infatti la tendenza, da una generazione alla seguente, di un'espansione del numero di triplette, che potrebbe quindi portare al manifestarsi della malattia nei figli/e.

A chi è rivolto il test:

Il test è raccomandato a persone con una storia familiare positiva di distrofia miotonica, a coppie che in fase preconcezionale desiderino verificare il loro stato di portatori sani e del rischio associato alla riproduzione.

Risultati:

L'analisi permette la valutazione del numero di triplette CTG sul gene *DMPK*. Il saggio utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) seguita da elettroforesi capillare. La grandezza del frammento amplificato permette di discriminare il numero di ripetizioni.

Sordità neurosensoriale

La sordità neurosensoriale è una grave forma di patologia multifattoriale che consiste in una ridotta capacità o totale incapacità di udito. Tra le varie cause che possono portare alla sordità, i fattori genetici sembrano ricoprire una percentuale notevole di casi (50-70%). Esistono varie forme di sordità: non sindromica (circa il 70% dei casi), cioè non associata ad altri sintomi e solitamente ad insorgenza precoce (già alla nascita), o sindromica, presente in concomitanza di altri sintomi. La sordità neurosensoriale non sindromica viene diagnosticata tramite analisi genetica dei geni *GJB2* (codificante per la connessina 26) e *GJB6* (codificante per la connessina 30).

Nella sua forma recessiva, entrambe le copie del gene sono alterate. L'analisi genetica ricercherà sui geni citati le varianti più comunemente responsabili della sordità congenita nella popolazione caucasica, con un tasso di portatori sani in Italia di circa 1 soggetto ogni 35.

- Delezione 35delG sul gene *GJB2* (CX26) riscontrata in circa l'80% dei casi.
- Delezione 167delT sul gene *GJB2* (CX26)
- Delezione D13S1830 sul gene *GJB6* (CX30)

A chi è rivolto il test:

L'esame è raccomandato a persone con storia familiare positiva per sordità neurosensoriale

congenita, a coppie che in epoca preconcezionale desiderino verificare il loro stato di portatori sani e del rischio associato alla riproduzione.

Risultati:

Il saggio permette di indagare tre delezioni correlate con sordità neurosensoriale a carico dei geni GJB2 e GJB6 attraverso una PCR multiplex in cui vengono amplificati i tre loci genomici corrispondenti alle tre delezioni. Successivamente, il prodotto di reazione di PCR viene separata in elettroforesi capillare per l'interpretazione dei dati.

Atrofia Muscolare Spinale (SMA)

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia neuromuscolare caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale (deputati al controllo dei muscoli e del movimento). Questa degenerazione causa ipostenia muscolare, ipotonia e paralisi progressiva, ed è la prima causa di morte nell'infanzia per cause genetiche. La SMA è infatti una malattia rara *ereditaria*, e può colpire l'individuo con forme più o meno gravi e in età diverse. L'insorgere della malattia è associato alla presenza di varianti in omozigosi (entrambe le copie del gene mutato) sui geni *SMN1* (Survival Motor Neuron 1), nel 90% dei casi e *SMN2* (Survival Motor Neuron 2). Varianti a carico di questi geni sono responsabili di quantità insufficienti della proteina SMN nell'organismo, a cui segue una degenerazione dei motoneuroni.

A chi è rivolto il test:

L'esame è raccomandato a persone con storia familiare positiva per atrofia muscolare spinale e ai rispettivi partners, a coppie che desiderino verificare il loro stato di portatori sani in fase preconcezionale e del rischio associato alla riproduzione.

Risultati:

Il saggio quantifica il numero di copie dell'esone 7 di *SMN1* e di *SMN2* e rileva la duplicazione del gene *SMN1* e varianti associati alla patologia nel gene *SMN2*, riuscendo a identificare lo stato di portatore sano della malattia (1 soggetto ogni 40 circa). Il test consiste in una reazione PCR seguita da un'analisi di frammenti, tramite elettroforesi capillare.

Alfa-talassemia e beta-talassemia

L'emoglobina è una proteina presente nei globuli rossi, e il suo compito è quello di trasportare l'ossigeno nel sangue a tutto l'organismo. Tra le sue componenti ci sono diversi tipi di catene globiniche (alfa, beta, delta e gamma), codificate dai geni *HBA1* e *HBA2* (catena globinica alfa) e *HBB* (catene globiniche beta, delta e gamma). Mutazioni in entrambe le copie del gene possono portare alla talassemia, una malattia del sangue ereditaria che influisce sulla quantità e sulla tipologia di emoglobina prodotta, compromettendo l'ossigenazione dell'organismo. Questa può presentarsi in forma più o meno grave, con sintomi variabili a seconda del tipo di talassemia (alfa o beta-talassemia).

Il test prevede il sequenziamento delle porzioni codificanti dei geni *HB1*, *HB2* e *HBB* e delle relative regioni fiancheggianti.

A chi è consigliato il test:

Il saggio è raccomandato a persone con una storia familiare positiva per alfa e/o beta talassemia, a coppie che in epoca preconcezionale desiderino verificare il loro stato di portatori sani per valutare il rischio associato alla riproduzione.

Risultati:

L'analisi genetica rileva delezioni e mutazioni sui geni *HBA1*, *HBA2* e *HBB* tramite sequenziamento NGS per individuare portatori sani della malattia (circa 1 soggetto ogni 20 in Italia) o soggetti affetti.

Analisi di mutazione familiare

Nel caso in cui la coppia presenti familiarità per una patologia, per la quale sono già in possesso di una diagnosi molecolare, il laboratorio del Polo GGB offre la possibilità di indagare la regione interessata in via personalizzata.

Infertilità e procreazione medicalmente assistita

Polo GGB offre esami genetici utili per la valutazione dello stato di fertilità femminile e maschile, al fine di fornire un quadro informativo completo per operare scelte riproduttive consapevoli e informate.

CFTR

Ad oggi sono state individuate più di 2000 mutazioni del gene *CFTR*. Molte di queste possono ricondurre a forme più o meno gravi di fibrosi cistica, mentre altre possono incidere sulla funzionalità di molte altre funzioni corporee, come la fertilità. L'infertilità maschile è correlata a mutazioni del gene *CFTR* (sindrome correlata al gene della fibrosi cistica), che comportano l'assenza di spermatozoi nel liquido seminale (azoospermia) e la malformazione/occlusione dei dotti deferenti. In questi casi, è possibile il recupero degli spermatozoi per poter procedere alla fecondazione medicalmente assistita.

A chi è consigliato il test:

Il test è raccomandato a uomini che sospettano uno stato di infertilità, a persone con una storia familiare positiva per la fibrosi cistica e mutazioni correlate al gene *CFTR*.

Risultati:

Il saggio prevede il sequenziamento NGS delle porzioni codificanti del gene *CFTR* e delle relative regioni fiancheggianti. Su richiesta è possibile avere un esito in merito alle variazioni del numero di copie del gene o parti di esso.

Esaurimento ovarico precoce (*FMR1*)

L'esaurimento ovarico precoce consiste in un'insufficienza ovarica associata alla X fragile (FXPOI), caratterizzato da sintomi spesso simili a quelli tipici della menopausa. Nonostante la somiglianza di segni e sintomi, l'esaurimento ovarico precoce non è paragonabile ad una menopausa precoce, poiché le donne affette possono ritenere una minima funzionalità ovarica.

L'insufficienza ovarica associata alla sindrome della X fragile (FXPOI) è collegata ad un numero di ripetizioni di triplette CGG tra 56 e 200, un intervallo considerato di premutazione.

L'analisi genetica rileva il numero di ripetizioni della tripletta CGG nella regione 5'UTR del gene *FMR1*.

A chi è rivolto il test:

L'esame è consigliato a donne che sospettano uno stato di infertilità, a donna che hanno incontrato problemi riproduttivi e di infertilità, a donne che presentano sintomi riconducibili alla menopausa prima dei 40 anni

Risultati:

Il saggio, eseguito tramite tecnologia PCR, amplifica e rileva il numero di ripetizioni di triplette causa dell'anomalia

Microdelezione Cromosoma Y (*AZF*)

La spermatogenesi è il processo grazie al quale vengono a maturazione le cellule germinali maschili, gli spermatozoi, ed è un processo di fondamentale importanza per la fertilità maschile. Un'alterazione della spermatogenesi può compromettere infatti la fertilità dell'individuo. L'azoospermia (assenza di spermatozoi nel liquido seminale) e l'oligospermia (concentrazione ridotta di spermatozoi nel liquido seminale) rappresentano una delle cause più frequenti di infertilità maschile, e possono essere ricondotte a delezioni, cioè perdite di regioni di DNA, a carico del braccio lungo del cromosoma Y, in particolare della regione AZF (azoospermia factor). Microdelezioni a carico di questa regione possono risultare in anomalie diverse e più o meno gravi a seconda della subregione coinvolta.

A chi è rivolto il test:

Il test è consigliato a chi sta programmando una gravidanza, a uomini che stanno trovando difficoltà nel concepimento e sospettano uno stato di infertilità.

Risultati:

Il saggio eseguito tramite tecnologia PCR è seguito da una rilevazione con tecnologia *reverse line blot* per individuare le microdelezioni del cromosoma Y.

Genetica prenatale

Polo GGB offre analisi genetiche prenatali con l'obiettivo di valutare la salute del feto in modo tempestivo volendo assicurare alle gestanti e ai futuri genitori un'esperienza di gravidanza il più possibile sicura e serena.

Fattore RH

Il Fattore Rhesus D (RhD) è un antigene proteico che si trova sulla superficie dei globuli rossi. L'antigene (antigene D) può essere presente o assente, e a seconda di questo il gruppo sanguigno di ognuno sarà definito Rh positivo (RhD+) o Rh negativo (RhD -).

Durante la gravidanza e in particolare durante il parto, il sangue fetale e quello materno potrebbero entrare in contatto. In caso di madre RhD - e feto RhD+, questo potrebbe creare una situazione di incompatibilità materno-fetale, e portare ad una sensibilizzazione dell'organismo materno all'antigene D proveniente dal feto. Nonostante questa incompatibilità (se presente) non costituisca una preoccupazione durante la prima gravidanza, potrebbe creare problemi in gestazioni successive. Il sistema immunitario materno, infatti, reagisce all'introduzione dell'antigene D, un fattore esterno e sconosciuto al suo organismo, con la produzione di anticorpi preposti ad attaccarlo. Questi, in caso di una seconda gravidanza con feto RhD+, potrebbero attaccare i globuli rossi fetali, causando la malattia emolitica del feto e del neonato (HDFN).

L'esame ricerca la delezione del gene *RhD* per determinare lo stato del fattore Rh nel feto (positivo o negativo), consentendo di identificare le gravidanze a rischio di malattia emolitica. L'analisi non è invasiva, e si effettua a partire da un campione di sangue materno da cui viene isolato il DNA fetale libero circolante, su cui verrà condotta l'analisi.

A chi è rivolto il test:

Il test è consigliato a gestanti con RhD negativo (-).

Risultati:

Il test permette una rilevazione rapida, sensibile e non invasiva del gene del fattore RhD (*RHD*) tramite tecnologia RealTime-PCR.

NIPT (Test prenatale non invasivo)

Il test prenatale non invasivo (anche NIPT – Non Invasive Prenatal Test) è un'analisi genetica di screening delle alterazioni cromosomiche maggiormente evidenziate in epoca prenatale tramite le tradizionali tecniche di villocentesi e amniocentesi, e correlate a patologie genetiche, causa di danni alla salute del nascituro.

L'analisi prenatale non invasiva è così chiamata proprio perché è sufficiente un semplice prelievo di sangue periferico della gestante dal quale si isola il DNA libero circolante proveniente dal feto per poter effettuare l'analisi.

È possibile eseguire la NIPT già dalla nona settimana di gravidanza per una precoce e tempestiva valutazione sulla salute del feto e garantendo così un quadro informativo affidabile e puntuale, capace di guidare la gestione della gravidanza e permettere

l'assunzione di decisioni personalizzate e adeguate alle singole necessità della gestante e del feto.

Polo GGB offre tre diversi livelli di approfondimento della NIPT, con indagini più o meno estese a seconda delle necessità del cliente.

NIPT Test

- Trisomia 21, nota anche come sindrome di Down, causata da una copia extra del cromosoma 21.
- Trisomia 18, nota anche come sindrome di Edwards, è causata da una copia extra del cromosoma 18.
- Trisomia 13, nota anche come sindrome di Patau, è causata da una copia extra del cromosoma 13.
- Monosomia X, nota anche come sindrome di Turner, causata da una copia mancante del cromosoma X.
- Triploidia, causata da una copia extra di tutti i cromosomi.
- Se identificate, saranno riportate anche trisomie dei cromosomi sessuali (XXY, XXX e XYY).

Se desiderato, potrà essere comunicato il sesso fetale (opzionale).

NIPT PRO Test

- Trisomia 21;
- Trisomia 18;
- Trisomia 13;
- Monosomia X;
- Triploidia;
- Se identificate, saranno riportate anche trisomie cromosomi sessuali (XXY, XXX e XYY);
- Microdelezione del 22q11.2, nota anche come sindrome di velo-cardio-facciale o sindrome di Di George, causata dalla mancanza di una piccola parte del cromosoma 22;

Se desiderato, potrà essere comunicato il sesso fetale (opzionale).

NIPT PRO 5 Test

- Trisomia 21
- Trisomia 18;
- Trisomia 13;
- Monosomia X;
- Triploidia;
- Se identificate, saranno riportate anche trisomie cromosomi sessuali (XXY, XXX e XYY);
- Microdelezione del 22q11.2;
- Microdelezione del 1p36, nota anche come Monosomia 1p36, causata dalla mancanza di una piccola parte del cromosoma 1;

- **Sindrome da delezione 5p-**, nota anche come **sindrome Cri du chat**, causata dalla mancanza di una piccola parte del cromosoma 5;
- **Sindrome di Angelman**, (Microdelezione materna della regione 15q11.2), causata principalmente dalla mancanza di una piccola parte del cromosoma 15 materno, o per aver ereditato entrambe le copie del cromosoma 15 da un solo genitore e nessuna dall'altro (in questo caso, due copie del cromosoma 15 paterno e nessuna copia del cromosoma 15 materno);
- **Sindrome Prader-Willi** (Microdelezione paterna della regione 15q11.2), causata dalla mancanza di una piccola parte del cromosoma 15 paterno, o per aver ereditato entrambe le copie del cromosoma 15 da un genitore e nessuna dall'altro (in questo caso, due copie del cromosoma 15 materno, e nessuna copia del cromosoma 15 paterno);

Se desiderato, potrà essere comunicato il sesso fetale (opzionale).

A chi è rivolto il test:

Il test è consigliato a donne in gravidanza per cui la diagnosi prenatale invasiva è controindicata (donne ad alto rischio di aborto spontaneo o di poliabortività), donne in gravidanza che hanno avuto esiti positivi agli esami di screening del primo o secondo trimestre, donne in gravidanza di età superiore ai 35 anni, donne in gravidanza con familiarità di anomalie cromosomiche.

Risultati:

Il saggio NIPT è un test di screening che indaga la presenza di anomalie cromosomiche tramite sequenziamento NGS, mirato all'amplificazione del DNA libero circolante del feto. Le decisioni sulla gravidanza devono essere prese sempre consultando il ginecologo di riferimento.

Esclusione di contaminazione materna

Il test di esclusione di contaminazione materna consente di escludere una contaminazione di DNA materno nel campione prelevato a seguito di tecniche prenatali invasive quali amniocentesi o villocentesi garantendo la sola origine fetale.

A chi è rivolto il test:

L'esame è raccomandato per coppie e donne che hanno dovuto fare ricorso a tecniche di diagnosi prenatale invasive, quali amniocentesi e villocentesi.

Risultati:

La tecnica prevede l'amplificazione di marker genetici polimorfici al fine di discriminare l'identità del materiale biologico della madre e del feto.