

# Orizzonti FC

Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica

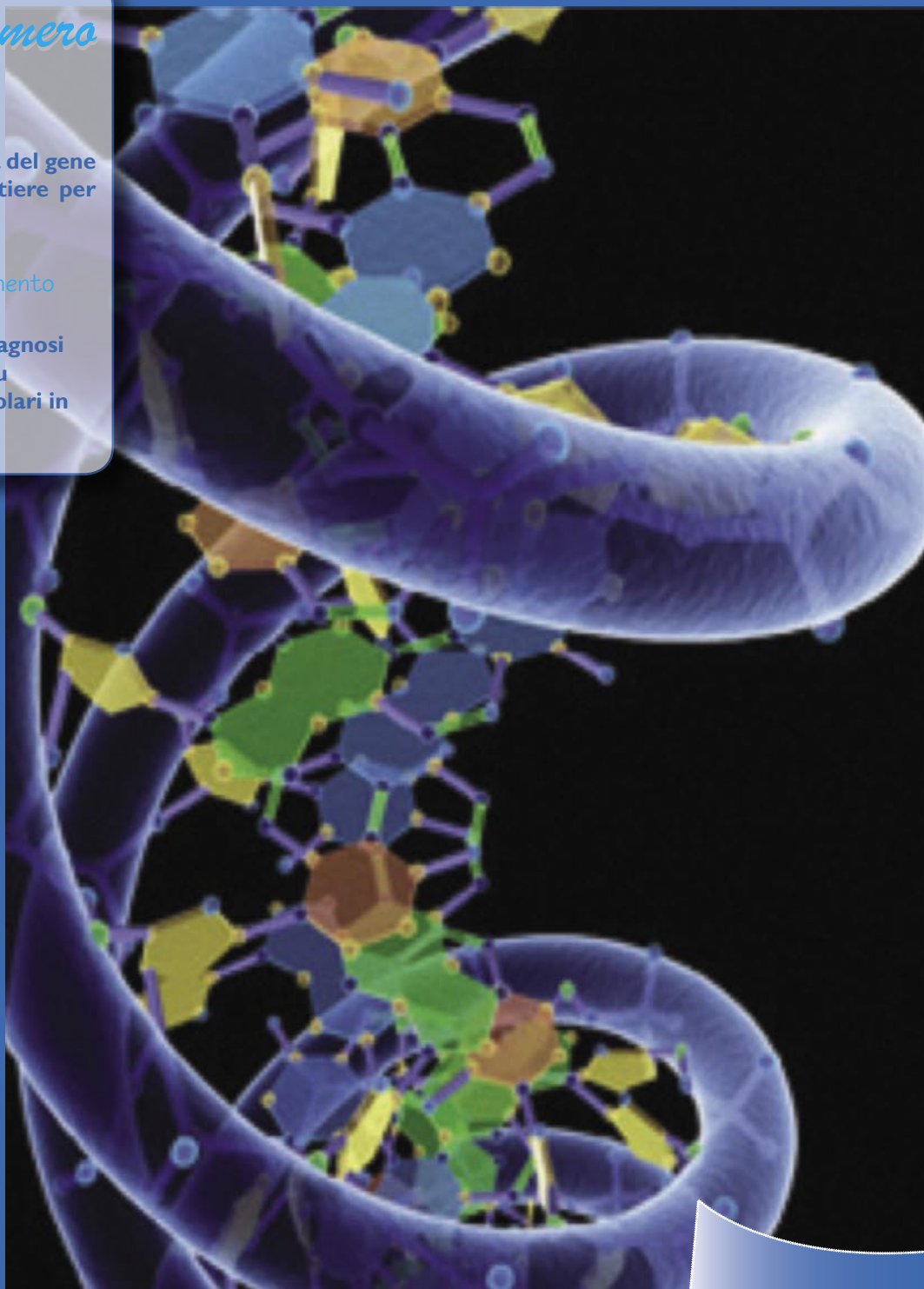
## *in questo numero*

Editoriale

**20 anni dopo la scoperta del gene CFTR: quali nuove frontiere per la genetica?**

Documento di aggiornamento della SIFC:

**Aggiornamento sulla Diagnosi Genetica Preimpianto su Embrioni e su Globuli Polari in Fibrosi Cistica**





# Orizzonti FC

Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica

*in questo numero*

Editoriale

**20 anni dopo la scoperta del gene CFTR: quali nuove frontiere per la genetica?**

G. Castaldo

Pag. 119

Documento di aggiornamento della SIFC:

**Aggiornamento sulla Diagnosi Genetica Preimpianto su Embrioni e su Globuli Polari in Fibrosi Cistica** Pag. 121

## Orizzonti FC

Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica

### Direttore Editoriale

Cesare Braggion

### Comitato editoriale

Ermanno Baldo

Lorella Bergamin

Massimo Conese

Rosaria Casciaro

Giuseppe Vieni

Luigi Ratclif

Mirco Ros

### Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica

**Presidente:** Carla Colombo

**Consiglio Direttivo:** Silvana Ballarin, Valeria Casavola, Angelo Cosimi, Vincenzina Lucidi,

Giuseppe Magazzù, Teresa Repetto, Sergio Zuffo.

email: [sifc@sifc.it](mailto:sifc@sifc.it); [segreteria@sifc.it](mailto:segreteria@sifc.it)

Tel. +39 0259902320

### Proprietario della Testata:

Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica

### Direzione, Redazione, Impaginazione, Amministrazione:

Scientific Publications s.r.l. via Sannio, 4 20137 Milano Tel. 0259902320, Fax 0259900758,

[scientific.publications@eac.it](mailto:scientific.publications@eac.it)

### Stampa:

Tipografia Pesatori s.n.c., Via Quintiliano, 37-41, 20138 Milano, Tel. 0258011931 Fax 0258011951

### Abbonamento:

gratuito ai Soci in regola con il pagamento della quota annuale

© Scientific Publications s.r.l., Milano

Tutti i diritti sono riservati. Nessuna parte di questa pubblicazione può essere riprodotta, trasmessa o memorizzata in qualsiasi forma e con qualsiasi mezzo



SOmmario





## 20 anni dopo la scoperta del gene CFTR: quali nuove frontiere per la genetica?

**N**el 1989 è stato identificato il gene “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator” (CFTR), gene-malattia della Fibrosi Cistica (FC). Questa scoperta ha avuto un impatto rilevante sulla ricerca e sull’approccio diagnostico della FC. Sinora sono state identificate oltre 1500 mutazioni nel gene; per alcune, è noto l’effetto sulla proteina e sulla gravità della malattia: ad esempio sono note mutazioni associate a sufficienza pancreatico; poco chiare, invece, le correlazioni tra mutazione e fenotipo polmonare, gastrointestinale, epatico, etc.

Lo sviluppo tecnologico ha reso disponibili metodiche accurate per l’analisi molecolare, a costi contenuti. In molti laboratori oggi viene analizzata l’intera regione codificante del gene. Ciò permette di migliorare la “detection rate” dell’analisi, e non v’è dubbio che il futuro sarà spostato verso questa tipologia d’analisi. Tuttavia l’analisi di “scanning” a volte identifica mutazioni non note, e può essere difficile interpretare il dato e fornire al paziente e alla famiglia una risposta chiara sul carattere “causativo” della mutazione. Una priorità dei prossimi anni sarà quella di definire (attraverso database internazionali e studi funzionali sull’effetto delle mutazioni) quali mutazioni siano effettivamente causali di malattia e i meccanismi attraverso cui agiscono.

Altro problema aperto riguarda la qualità globale della diagnostica molecolare. Occorrerà definire programmi idonei di controllo di qualità e uniformare l’efficienza delle metodologie, anche per consentire il confronto dei risultati ottenuti da laboratori diversi. Andranno inoltre definite le indicazioni all’analisi molecolare (attraverso linee guida di Società Scientifiche), poiché a volte l’analisi viene richiesta (o proposta) in assenza di indicazioni.

La disponibilità dell’analisi molecolare si riverbera anche sulla famiglia, attraverso gli “screening a cascata” e la diagnosi prenatale. Ciò merita alcune considerazioni: 1) la disponibilità della diagnosi prenatale garantisce alle coppie a rischio una valutazione consapevole delle proprie scelte riproduttive; 2) potenzialità e limiti (errore analitico, danno al feto connesso al prelievo di villi, etc.) della diagnosi prenatale vanno presentate con chiarezza attraverso una consulenza multidisciplinare che offra tutte le informazioni necessarie; 3) va assolutamente preservato il diritto di scelta delle coppie in ogni fase dello screening a cascata.

La diagnosi prenatale può essere effettuata oggi con elevati livelli di efficienza e sicurezza analitica, in tempi rapidissimi, su DNA da villi coriali o amniociti. La diagnosi prenatale su villi coriali consente di ottenere il risultato nel I trimestre permettendo, in caso di esito sfavorevole e nelle coppie che lo decidano, l’interruzione di gravidanza in un’epoca in cui la legislazione italiana ammette l’interruzione volontaria. La diagnosi su amniociti invece viene effettuata nel II trimestre, un’epoca in cui la nostra legislazione limita l’interruzione a condizioni che pongano in pericolo la salute fisica o mentale del nascituro o della madre. Una recente valutazione delle

diagnosi prenatali in Italia negli ultimi anni, ha dimostrato che in oltre il 95% dei casi si ricorre all’amniocentesi, una tendenza che andrà sicuramente modificata. Sempre in tema di diagnosi prenatale, è noto che nelle prime settimane di gravidanza cellule (o tracce di DNA) fetali passano nel circolo sanguigno della madre. E’ probabile che le tecniche tradizionali di villocentesi o amniocentesi vengano prima o poi sostituite (almeno in una parte dei casi, quando ad esempio la mutazione paterna è diversa da quella materna) dall’analisi del DNA fetale nel sangue materno (1), come già avviene in alcuni laboratori per la diagnosi di sesso.

Altra prospettiva riguarda la diagnosi preimpianto o quella sul I globulo polare. Tecnicamente è possibile effettuare diagnosi molecolari attendibili su blastomero (prelevato da un embrione allo stadio di 8 cellule prima dell’impianto) oppure (meno attendibile) analizzare il I globulo polare espulso dall’ovocita prima della fecondazione. Tuttavia la legislazione italiana pone alcuni limiti: il principale è quello di consentire l’accesso alla procreazione medicalmente assistita (e quindi alla diagnosi preimpianto) soltanto alle coppie che non riescono a procreare per vie naturali (escludendo, quindi, la maggior parte delle coppie di portatori di FC o di altre malattie genetiche). Queste procedure sono invece ammesse e percorse dalle coppie che ne facciano richiesta in altri paesi. Sarebbe auspicabile pervenire a regole condivise, almeno nei paesi europei.

Lo screening neonatale per FC è uno dei fiori all’occhiello in Italia essendo iniziato, in Veneto, già negli anni ’70. L’analisi molecolare ha portato vantaggi allo screening neonatale, riducendo ad esempio il numero dei falsi positivi all’analisi del tripsinogeno. Tuttavia ha anche contribuito a creare alcune fasce “d’ambiguità” diagnostica rappresentati dai casi in cui il dosaggio del tripsinogeno, l’analisi molecolare ed il test del sudore forniscono dati contrastanti. In futuro sarà necessario inquadrare correttamente queste categorie di soggetti (2).

Lo studio del gene CFTR ha rivelato la presenza di mutazioni anche in malattie diverse dalla “classica” FC (3), ad esempio pazienti monosintomatici (agenesia dei dotti deferenti, pancreatiti ricorrenti, bronchiectasie disseminate, ed almeno altre 10 forme diverse), definite “forme atipiche” di FC. Mutazioni di CFTR si ritrovano anche in forme ad esordio tardivo, spesso a genesi multifattoriale (CFTR related diseases). Di fatto oggi la FC non è più d’interesse

esclusivamente pediatrico ma coinvolge professionalità specialistiche diverse che andranno adeguatamente formate.

Altra area della ricerca riguarda i geni modulatori del fenotipo (4). Pazienti FC con le stesse mutazioni, o coppie di fratelli affetti, possono presentare una notevole discordanza nella severità della malattia a livello respiratorio, epatico, gastrointestinale, etc. Modelli animali hanno mostrato risultati analoghi. Si è quindi aperta la strada verso la ricerca di geni, ereditati indipendentemente da CFTR, che possano modulare la gravità del fenotipo FC. A tutt'oggi sono stati studiati almeno 20 potenziali modulatori; per alcuni i risultati sono discordanti (a causa delle scarse casistiche studiate, della diversa classificazione dei pazienti, etc.). Qualcuno sembra invece davvero in grado di modulare il fenotipo FC: ad esempio MBL (proteina dell'immunità innata) o TGF-beta-1 (mediatore dell'infiammazione) quando sono mutati funzionano meno, e ciò contribuisce a rendere più severo il fenotipo FC. Questi studi potrebbero avere un impatto terapeutico: ad esempio è disponibile la proteina MBL ricombinante, che potrebbe essere usata nei casi in cui la proteina non funziona. Tuttavia, l'impressione è che ognuno dei geni modulatori sinora studiati abbia un effetto modesto (in termini di numero di pazienti in cui agisce), e che probabilmente non esista un gene in grado di influenzare significativamente l'espressione clinica in ampie coorti di pazienti FC.

Infine la terapia. La conoscenza del gene-malattia ha

stimolato la ricerca sulla terapia genica. Sono stati studiati vettori diversi per il trasferimento del gene, tra cui adenovirus ricombinanti, virus adeno-associati, liposomi, polimeri; sono stati valutati differenti protocolli per il trasferimento del gene soprattutto a livello delle cellule dell'apparato respiratorio; è stata studiata l'efficienza del trasferimento del gene, e i tempi e i livelli di espressione del gene trasferito. Per ora siamo lontani da risultati applicativi, tuttavia la mole di dati ottenuti negli ultimi 20 anni sicuramente sarà di ausilio nel proseguimento di questi studi (5). Intanto, la conoscenza delle mutazioni del gene CFTR, e del meccanismo attraverso cui causano l'alterato funzionamento della proteina, ha aperto la strada allo studio di nuovi farmaci, un campo nel quale il gruppo di L. Galiotta, a Genova, sta fornendo un contributo sostanziale (6). Tra queste i "correttori", molecole che aiutano la proteina CFTR colpita da mutazioni di classe 2 (che rallentano l'arrivo della proteina in membrana) a raggiungere la membrana, o i "potenziatori" che facilitano l'attivazione della proteina nei casi di mutazioni che ne riducono l'attivazione. Alcune molecole sono già in fase di valutazione sull'uomo e sicuramente questo è uno degli aspetti più promettenti della ricerca in FC.

#### **Giuseppe Castaldo**

*Ceinge-Biotecnologie avanzate, Napoli; Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II (castaldo@dbbm.unina.it)*

#### **Riferimenti bibliografici:**

- 1) Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we? *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13:76-83
- 2) Comeau AM, Parad RB, Dorkin HL, et al. Population-based newborn screening for genetic disorder when multiple mutation DNA testing is incorporated: cystic fibrosis newborn screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections. *Pediatrics* 2004; 113:1573-1581
- 3) Moskowitz SM, Chmiel JF, Stern DL, et al. Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med* 2008; 10:851-868
- 4) Collaco JM, Cutting GR. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14:559-566
- 5) Griesenbach U, Geddes DM, Alton EW. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther* 2006; 13:1061-1067
- 6) Verkman AS, Galiotta LJ. Chloride channels as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8:153-171



## Aggiornamento sulla Diagnosi Genetica Preimpianto su Embrioni e su Globuli Polari in Fibrosi Cistica

*Questo documento è stato elaborato da un gruppo di esperti che la Società Italiana Fibrosi Cistica ha consultato allo scopo di offrire informazioni aggiornate sulla Diagnosi Genetica Preimpianto ed in particolare sulla possibilità di eseguire tale diagnosi su Embrioni, su entrambi i Globuli Polari o esclusivamente sul Primo Globulo Polare dell'ovocita.*

*Il documento è rivolto agli operatori sanitari che a vario titolo si occupano di fibrosi cistica e più in generale alle persone interessate a questi argomenti per esigenze professionali o personali. Per facilitarne la comprensione è allegato alla fine un breve glossario.*

*E' stato scritto da Maria Cristina Rosatelli, Graziella Borgo e Manuela Seia. Vi hanno contribuito Beatrice Fuzzi, Giuseppe Castaldo e Francesca Torricelli.*

**Ottobre 2009**

### Sintesi del documento

Per Diagnosi Genetica Preimpianto (PGD) si intende l'insieme di quelle procedure che consentono di diagnosticare una malattia genetica nell'embrione, prima del suo impianto nell'utero materno.

Per accedere alla PGD è necessario il ricorso a tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA), in particolare alla fecondazione in vitro mediante ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection). Per molte coppie la PGD offre una alternativa più accettabile rispetto alla diagnosi prenatale e all'interruzione di una gravidanza già avviata, a seguito di esito sfavorevole; tuttavia non solo gli aspetti tecnico-scientifici, ma anche quelli giuridici ed etico-religiosi delle procedure inerenti la PGD sono ancora molto dibattuti.

La PGD può essere applicata alle malattie monogeniche per le quali sia possibile l'analisi molecolare basata sull'amplificazione enzimatica in vitro del DNA e alle anomalie cromosomiche che riguardano il numero dei cromosomi ad eccezione dei mosaicismi. Negli ultimi anni, questa seconda applicazione è stata ampiamente utilizzata nel tentativo di aumentare la percentuale di successo delle tecniche di procreazione in vitro nelle coppie sterili (è chiamata PGS, Preimplantation Genetic Screening). A seconda del momento in cui viene effettuata la PGD si può distinguere in: "diagnosi preconcezionale" che si esegue sul I Globulo Polare, in epoca preconcezionale, seguita dall'analisi del II Globulo Polare (che avviene in epoca postconcezionale), e diagnosi "postconcezionale", che utilizza per l'indagine 1-2 cellule (blastomeri) ottenute da un embrione allo stadio di 6-8 cellule; meno frequentemente si ricorre a cellule ottenute attraverso biopsia del trofotoderma della blastocisti (embrione allo stadio di 100 cellule).

La diagnosi preconcezionale limitata al I Globulo Polare, è stata recentemente proposta perché eviterebbe la

manipolazione e l'eventuale selezione degli embrioni e i problemi giuridici ed etico-religiosi ad essa legati; presenta un rischio di errore diagnostico molto elevato, che si riduce considerevolmente se viene seguita dall'analisi del II Globulo Polare. Questo però viene prodotto una volta che l'ovocita prescelto è già stato fertilizzato: presenta pertanto gli stessi problemi giuridici ed etico-religiosi dell'analisi postconcezionale (vedi Capitoli 3 e 4). Per la sua complessità e per i suoi limitati vantaggi l'analisi del solo I Globulo Polare è stata proposta solo in Italia come soluzione ai divieti posti all'esecuzione di procedure classiche di diagnosi preimpianto dall'attuale legislazione. Nella maggior parte dei centri, nazionali ed internazionali, il protocollo diagnostico d'elezione prevede la diagnosi postconcezionale, attraverso l'analisi di uno o due blastomeri prelevati da embrioni allo stadio di 6-8 cellule.

In generale, sia che venga eseguita su embrioni sia che venga eseguita su Globuli Polari, la Diagnosi Genetica Preimpianto da un punto di vista tecnico ha un'attendibilità diagnostica variabile ma sicuramente inferiore rispetto alle procedure tradizionali di diagnosi prenatale (1, 2, 3). I rischi diagnostici della PGD (vedi Capitolo 2 e 3) sono da imputare essenzialmente alle quantità esigue di DNA da esaminare e ai limiti delle tecniche diagnostiche ed in particolare sono rappresentati da:

- Rischio di fallimento dell'analisi, valutabile in circa 10-15% per blastomero
- Rischio di errore diagnostico valutabile in circa il 2-5% dei casi e dovuto principalmente a contaminazione del DNA o perdita casuale di un allele (allele drop-out, ADO) durante i cicli di amplificazione enzimatica del DNA (PCR, Polymerase Chain Reaction).
- Rischi connessi alle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (4)

La Diagnosi Preimpianto rappresenta un approccio "di

Maria Cristina Rosatelli, Dipartimento Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università di Cagliari

Graziella Borgo, Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona

Manuela Seia, IRCCS- Fondazione Policlinico Mangiagalli-Regina Elena, Milano

Beatrice Fuzzi, Dipartimento di Ginecologia, Perinatologia e Riproduzione Umana, Università di Firenze

Giuseppe Castaldo, CEINGE-Biotecnologie Avanzate e Università Federico II, Napoli

Francesca Torricelli, Struttura Organizzativa Dipartimentale di Diagnostica Genetica, Azienda Ospedaliero Universitaria Carreggi, Firenze



nicchia” dal momento che le tecniche di PMA hanno ancora oggi una bassa percentuale di successo in termini di nascite (circa il 20-25% di gravidanze per ogni ciclo di PMA) (5), legato essenzialmente alle fasi della fertilizzazione in vitro ed alle procedure di manipolazione dell’embrione. Inoltre i suoi costi elevati e la necessità di essere applicata in centri con alta specializzazione sia nel campo della fertilizzazione in vitro che in quello delle analisi genetiche molecolari ne limitano fortemente l’applicazione.

In Italia, le procedure di PGD sono state interrotte a seguito della promulgazione della Legge 40 del 19 febbraio 2004 e delle relative linee guida che, nel tentativo di regolare le attività di Procreazione Medicalmente Assistita, hanno posto dei veti che rendevano tali procedure inapplicabili (vedi paragrafo 4). Negli ultimi anni numerose sentenze sono state emesse a favore di singole coppie ricorrenti che hanno annullato di fatto il divieto all’accesso alla PGD. Queste rappresentano delle importanti premesse e pongono le basi per una doverosa revisione della Legge 40.

Al di là della possibilità attuale di eseguire la PGD, ancora molto dibattuta e per la quale i pareri non sono univoci, un’altra importante limitazione, questa volta molto esplicita, introdotta dalla Legge 40, alla PGD per le coppie portatrici di malattie genetiche come la fibrosi cistica (FC) è rappresentata dal fatto che l’accesso alle tecniche di PMA è consentito solo alle coppie infertili, come recita l’Art. 4 della suddetta legge (vedi Capitolo 5).

## CAPITOLO I. Tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita

### Induzione multipla dell’ovulazione (stimolazione ovarica)

La procedura di PMA inizia con l’intervento mirato ad ottenere nella donna una superovulazione. Durante l’età fertile la donna produce naturalmente, ogni mese, un ovocita maturo che può essere fecondato. Nella PMA, l’ovaio della donna viene stimolato farmacologicamente al fine di produrre più ovociti maturi, in seguito ad una crescita follicolare multipla. Per ottenerla si ricorre in primo luogo all’utilizzo di farmaci (analoghi o antagonisti del GnRH, ormone stimolante il rilascio di gonadotropine), che devono ridurre l’attività ipofisaria e quindi la produzione endogena di ormoni e in secondo luogo alla somministrazione di farmaci (gonadotropine) per stimolare la crescita di più follicoli. In questo modo si induce il reclutamento contemporaneo e la maturazione di numerosi follicoli ovarici (crescita follicolare multipla). La risposta agli ormoni e quindi il numero di follicoli in crescita è soggettiva e viene controllata con monitoraggio ecografico e/o ormonale.

### Prelievo degli ovociti

I liquidi follicolari contenenti gli ovociti vengono aspirati per via transvaginale, sotto guida ecografica, in analgesia; in passato erano talvolta prelevati per via laparoscopica. Vengono quindi trasferiti al laboratorio di fecondazione in vitro (generalmente contiguo al punto di prelievo ovocitario), dove sono esaminati allo stereomicroscopio per ricercare gli ovociti.

Per avviare un ciclo di PGD è necessario poter raccogliere almeno 6-10 ovociti. Una volta recuperati, gli ovociti vengono posti in coltura in attesa dell’inseminazione.

Il giorno del prelievo degli ovociti è detto giorno 0 della procedura di PMA. Gli ovociti prelevati possono seguire due strade: essere inseminati nello stesso giorno oppure essere sottoposti a crioconservazione. Gli ovociti vengono generalmente inseminati con spermatozoi selezionati dal liquido seminale o, in alcuni casi di azoospermia, con spermatozoi prelevati microchirurgicamente dal testicolo (TESA, TESE) o dall’epididimo (PESA, MESA) (vedi Glossario).

### Fecondazione in Vitro

L’inseminazione avviene attraverso ICSI (Intracitoplasmatic Sperm Injection), tecnica che consiste nell’iniezione diretta di un solo spermatozoo nel citoplasma dell’ovulo. Questa tecnica ha risultati uguali o superiori alla FIV (Fertilizzazione in Vitro) classica, e rappresenta la tecnica di fertilizzazione d’elezione per la PGD perché evita la contaminazione dovuta alla presenza di spermatozoi adesi alla zona pellucida dell’ovocita, che può essere causa di errore diagnostico. A partire dal momento in cui avviene la fusione del patrimonio genetico dell’ovocita e dello spermatozoo, l’ovocita è fertilizzato, prende il nome di zigote e inizia il processo di divisione cellulare che porta alla formazione dell’embrione.

### Biopsia dei blastomeri

La crescita dell’embrione viene attentamente controllata in prima, seconda e terza giornata dalla fecondazione. L’embrione raggiunge generalmente lo stadio di 8 cellule, considerato ottimale per il prelievo, in terza giornata. Una crescita rallentata dell’embrione è considerata un elemento negativo, correlato con una più alta possibilità di interruzione della stessa e fallimento della procedura. Perciò la disponibilità

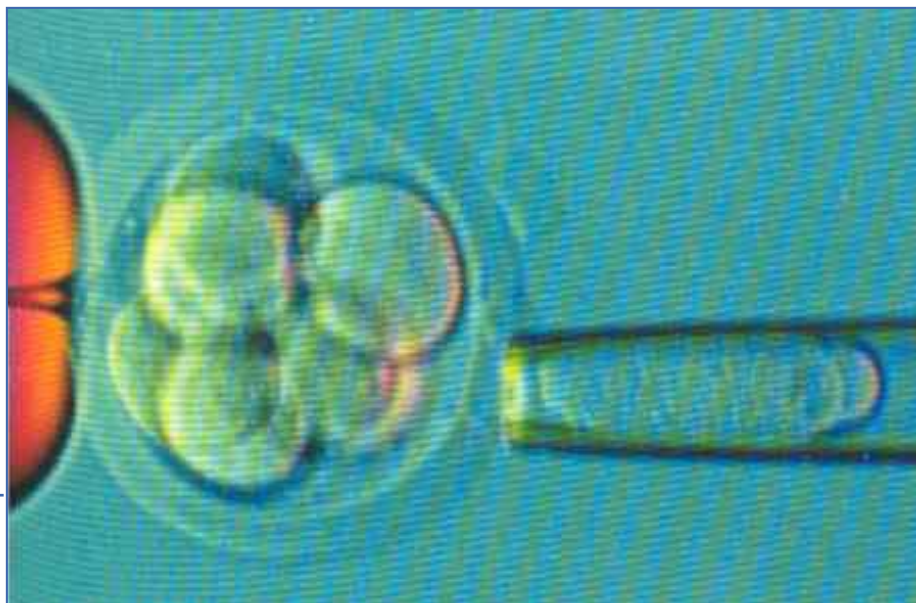


Figura 1 - Prelievo di un blastomero da un pre-embrione allo stadio di 8 cellule





### BIOPSIA I GLOBULO POLARE (I GP)

- viene effettuata sull'ovocita
- previa rimozione delle cellule del cumulo ooforo e della radiata (con ialuronidasi)
- micromanipolatore (con laser)
- viene prelevato il I GP espulso dall'ovocita alla ripresa della meiosi

Figura 2 - Prelievo del primo Globulo Polare

di un numero adeguato di embrioni, che consenta una attenta selezione dei più vitali, è di fondamentale importanza per il successo della procedura. Dall'embrione allo stadio di 8 cellule vengono prelevate 1-2 cellule (blastomeri) che verranno sottoposti all'analisi genetica (Figura 1). Il prelievo di un singolo blastomero è meno dannoso per l'embrione, per contro il prelievo di due cellule aumenta le probabilità di successo della diagnosi. Il dibattito su quale sia la procedura più appropriata è attualmente in corso.

Entro il quinto giorno dalla fertilizzazione l'embrione deve essere trasferito in utero, perciò la diagnosi deve essere effettuata entro 24-48 ore dalla biopsia.

Il trasferimento in utero dell'embrione viene effettuato con catetere per via transvaginale.

#### Prelievo dei globuli polari

L'ovocita compie una parte del suo processo maturativo nell'ovaio, all'interno del follicolo in cui è contenuto. Quando il follicolo viene sottoposto a stimolazione ormonale, l'ovocita passa dallo stadio di quiescenza in cui si trova dall'epoca prenatale ad una fase "maturativa". Questa fase lo rende adatto ad essere fertilizzato e, prima della penetrazione dello spermatozoo, emette ("estrude") il Primo Globulo Polare (I GP), che è una cellula 100 volte più piccola dell'ovocita, che contiene la metà del patrimonio genetico (Figura 2). Il Primo Globulo Polare può essere prelevato subito dopo il recupero dell'ovocita dall'ovaio, previa rimozione delle cellule del cumulo, prima che sia effettuata l'inseminazione. Il Secondo Globulo Polare (II GP) viene estruso dopo l'ingresso dello spermatozoo nell'ovocita, prima che i pronuclei maschile e femminile si fondano unendo i corredi genetici materno e paterno (con formazione dello "zigote").

**Approfondimento:** In ogni cellula, e quindi anche negli ovociti primari, ogni informazione genetica è portata da due cromosomi omologhi. Durante la maturazione dell'ovocita, che porterà a ottenere gameti con corredo cromosomico dimezzato (aploide) i due cromosomi omologhi si separano: uno viene a trovarsi nell'ovocita mentre l'altro sarà contenuto nel primo globulo polare (prima divisione meiotica) (Figura 3). Questa è la ragione per

cui si dice che il I GP possiede un corredo genetico speculare a quello dell'ovocita e questo è il principio su cui si basa la diagnosi su I GP: una volta identificati gli ovociti normali (nel caso di FC, privi di mutazione CFTR di derivazione materna) saranno quelli ad essere usati per la fertilizzazione. In questo modo gli embrioni ottenuti potranno al massimo essere portatori della mutazione paterna.

Il II GP, che viene espulso dopo la fertilizzazione, ha corredo cromosomico uguale (e non "complementare") rispetto a quello dell'ovocita e deriva da quel processo

di divisione dei cromosomi chiamato seconda divisione meiotica.

## CAPITOLO 2. Diagnosi Genetica su Embrioni

La diagnosi genetica su embrioni viene realizzata attraverso la tecnica della PCR che permette di ottenere una quantità di DNA idonea, a partire dalla minima quantità presente in una singola cellula. I prodotti della PCR sono analizzati mediante tecniche molecolari dirette (ricerca della/e mutazione causale di malattia) o indirette (analisi di polimorfismi del DNA associati al locus malattia) (6).

Le possibilità di errore diagnostico sono dovute principalmente a tre fattori: la contaminazione del DNA della cellula in esame con DNA estraneo; il fallimento della PCR; il fenomeno ADO (Allele Drop Out, cioè perdita di un allele) che consiste nell'amplificazione casuale di uno solo dei due alleli con conseguente errata genotipizzazione dell'embrione.

Per ridurre il rischio di errore è necessario effettuare contemporaneamente al test diagnostico un monitoraggio del rischio contaminazione e ADO attraverso l'analisi di polimorfismi del DNA (7).

## CAPITOLO 3. Diagnosi Genetica su Globuli Polari

Per effettuare la diagnosi genetica sui Globuli Polari si applicano le stesse tecniche molecolari utilizzate sulle cellule embrionali.

### Diagnosi Genetica su Primo Globulo Polare (Diagnosi "preconcezionale")

Lo studio genetico del I GP può fornire per via indiretta informazioni sul patrimonio genetico dell'ovocita: si dice "per via indiretta" in quanto la diagnosi si effettua sul contenuto genetico del I GP, che è "complementare" (speculare) a quello dell'ovocita (Figura 3). Se il I GP presenta la mutazione materna ne consegue che l'ovocita ne risulterà invece privo (quindi normale). La diagnosi sul I GP può portare a selezionare pertanto gli ovociti utili a generare solo embrioni



Figura 3 - Maturazione dell'ovocita, Meiosi ed espulsione dei Globuli Polari

sani; e quindi può portare ad evitare l'indagine sugli embrioni stessi (8).

#### Limiti tecnici della Diagnosi Genetica su Primo Globulo Polare

Un evento importante limita la possibilità di diagnosi su I GP: la ricombinazione genetica. La ricombinazione è dovuta allo scambio di porzioni cromosomiche ("crossing over") che avviene regolarmente tra due cromosomi omologhi durante la prima divisione meiotica. Se questa ricombinazione coinvolge la regione cromosomica contenente il gene causa della malattia, il primo globulo polare potrebbe portare sia la copia normale del gene sia la copia contenente la mutazione materna (Figura 4). In tal caso la diagnosi genetica sul I GP risulterà non informativa e l'ovocita da cui esso proviene non potrà essere considerato utile per la fecondazione.

Il fenomeno della ricombinazione attraverso crossing over ha una frequenza variabile che dipende dalla localizzazione cromosomica del gene in esame e può interessare sino al 50-60% degli ovociti, rendendo inutilizzabile ai fini diagnostici più della metà di questi. Inoltre non tutti gli ovociti producono un globulo polare di qualità utile per essere analizzato. Per queste ragioni, perché l'indagine abbia successo, si rende necessario sottoporre la donna ad un trattamento di stimolazione ovarica importante che consenta di

ottenere un numero molto elevato di ovociti.

In analogia con quanto avviene per l'analisi genetica su blastomeri, l'accuratezza diagnostica dell'analisi del I GP è limitata dal rischio di ADO (Allele Drop Out) e di contaminazione. Altro limite associato alla diagnosi su I GP è la difficoltà di eseguire l'intera procedura (isolamento del I GP e analisi genetica) nei tempi richiesti per evitare l'invecchiamento dell'ovocita (4-6 ore dal prelievo). Ulteriore limite è che l'analisi sul I GP non permette di effettuare la diagnosi di malattie genetiche a trasmissione autosomica

dominante di origine paterna in quanto la procedura prevede solo l'analisi del patrimonio genetico di origine materna. Per tutte le ragioni su esposte, tale procedura non è utilizzata singolarmente ma sempre accompagnata dallo studio del II GP, così come anche chiaramente esposto nelle Linee Guida emesse dalla Società Europea di Riproduzione Umana ed Embriologia (ESHRE)(7).

In Italia, a seguito del divieto alla PGD contenuto nella Legge 40, è stato proposto di utilizzare l'analisi sul solo I GP, che rappresenta l'unico approccio consentito, perché effettuato in epoca preconcezionale, in grado di ridurre considerevolmente il rischio di generare embrioni affetti. Tuttavia al momento attuale, come già ribadito, la diagnosi sul I GP è una tecnica da valutare con riserva.

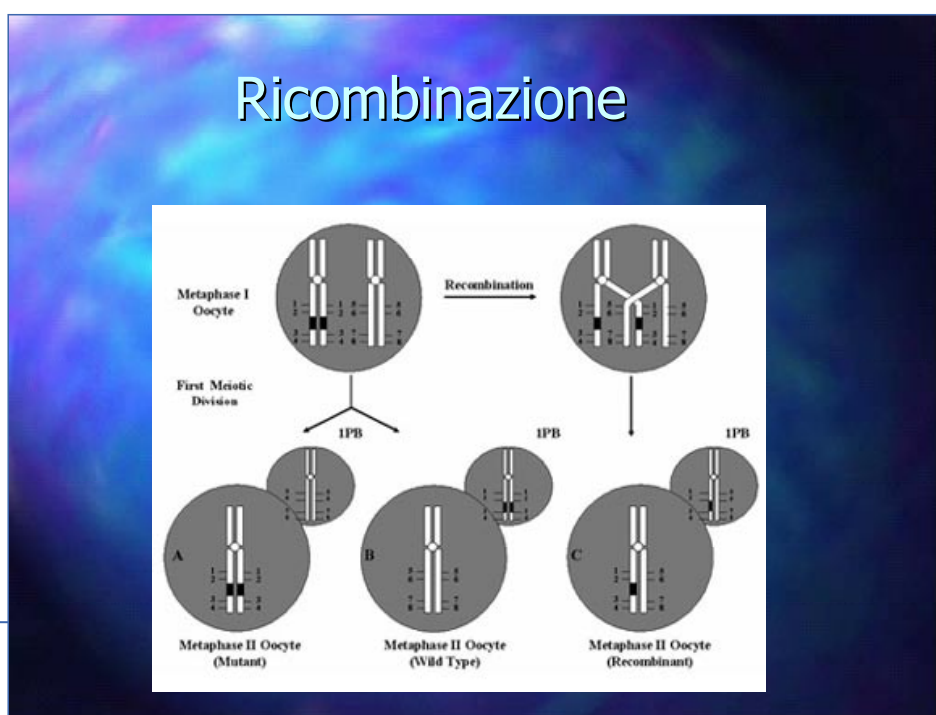


Figura 4 - Ricombinazione genetica durante la I divisione meiotica

**Approfondimento:** L'ESRHE, è la Società scientifica che si è proposta il monitoraggio delle procedure di PGD in Europa e gestisce un registro che riporta le attività dei centri qualificati, tassi di successo, errori diagnostici, ecc. (5). Gli esperti dell'ESRHE hanno elaborato Linee Guida per la miglior pratica di PGD (7). In queste Linee Guida alcune procedure sono raccomandate (quando esistono dati pubblicati sufficienti per valutare la procedura come sicura ed efficace), altre sono valutate come accettabili (quando ci sono evidenze limitate e/o discrepanze di risultati fra i centri). La procedura di PGD raccomandata dalla Società ed adottata dalla maggior parte dei centri prevede il prelievo e l'analisi genetica dei blastomeri in III giornata di sviluppo dell'embrione. Viceversa, il prelievo e l'analisi genetica su I GP è considerata accettabile purché la diagnosi venga confermata anche sul II GP.

### Diagnosi Genetica su Primo e Secondo Globulo Polare

Per aumentare l'accuratezza della diagnosi, la diagnosi cosiddetta "preconcezionale" prevede di estendere l'analisi al II GP, che viene espulso alcune ore dopo la fecondazione, passando pertanto ad una fase postconcezionale. In Europa questo approccio diagnostico è poco usato (è adottato in Germania, per ragioni legislative, e in Svizzera), mentre è utilizzato negli Stati Uniti sin dal 1990 al Illinois Masonic Medical Center di Chicago dal gruppo del prof Verlinsky) (9). Il razionale alla base della tecnica sarebbe aumentare le probabilità di avere embrioni sani, selezionando all'origine ovociti che non portano nel loro genoma il gene mutato.

### CAPITOLO 4: Coppie a rischio elevato per FC, ricorso a Diagnosi Prenatale e a Diagnosi Genetica Preimpianto

#### Come vengono diagnosticate le coppie a rischio elevato per FC

In Italia la maggior parte delle coppie che hanno rischio elevato di generare un figlio affetto da fibrosi cistica (1:4 = 25%) viene a saperlo dopo la nascita di un figlio malato. Lo screening del portatore secondo la strategia detta "a cascata" è suggerito ai consanguinei del malato FC, che sono più a rischio di essere portatori rispetto alla popolazione generale e rappresenta il sistema più diffuso per la diagnosi dello stato di portatore (10). Per eseguire il test nel familiare è necessario aver prima identificato la mutazione del gene CFTR presente nel malato. Se il familiare risulta portatore, l'analisi viene estesa al partner, nel quale è necessario utilizzare tecniche di screening molecolare del gene CFTR per la ricerca delle mutazioni più frequenti nella regione geografica di origine. Tali tecniche hanno una capacità variabile (tra il 70-90%, in relazione all'origine geografica) di svelare lo stato di portatore. In caso di esito negativo è perciò necessario comunque esprimere il referto in termini di rischio residuo di coppia di generare un figlio affetto. Il test per il portatore FC viene anche spesso eseguito nelle coppie infertili che accedono alla PMA. In realtà l'analisi andrebbe effettuata nei pochi casi in cui esiste una chiara correlazione tra la causa dell'infertilità e il gene CFTR, come ad esempio nell'agenesia dei dotti deferenti (11).

Per le coppie che sanno di essere a rischio elevato di generare un figlio FC (entrambi, quindi, portatori di una mutazione del gene CFTR), e che richiedono di conoscere lo

stato di un figlio in epoca prenatale, sono, da un punto di vista tecnico disponibili due approcci:

1) La Diagnosi Prenatale mediante villocentesi e ricerca nel DNA fetale delle mutazioni CFTR presenti nel genotipo di entrambi i partner. Questa procedura si attua in undicesima settimana di gravidanza e fornisce risultati accurati in tempi rapidi. Si ricorda che la legge 194 del 1978 che regola l'interruzione di gravidanza in Italia, prevede che l'interruzione possa essere effettuata su base volontaria nel I trimestre di gravidanza. Quindi, in caso di esito sfavorevole della diagnosi prenatale, è possibile per la coppia scegliere l'interruzione di gravidanza.

Un esame della situazione italiana come si presentava nel 2004 (12), indicava notevoli differenze tra le diverse regioni italiane per quanto riguarda il numero di diagnosi prenatali FC eseguite, e segnalava il ricorso, in una elevatissima percentuale di casi, all'amniocentesi (che viene effettuata nel II trimestre di gravidanza), piuttosto che alla villocentesi. La spiegazione del ricorso all'amniocentesi piuttosto che alla villocentesi è sicuramente che la diagnosi prenatale per FC viene offerta come "test di accompagnamento" ad altri test, soprattutto in accompagnamento all'indagine del cariotipo nei casi di età materna elevata. Questa offerta avviene spesso in centri privati, ed è rivolta a coppie della popolazione generale che non hanno un rischio specifico per FC. Nella gravidanza di queste coppie il test genetico prenatale ha un'accuratezza modesta (è in grado di diagnosticare solo poco più della metà dei feti realmente affetti da FC) ed è fonte di problemi di varia natura quando diagnostica lo stato di eterozigosi. E' pertanto una pratica poco raccomandabile. Nelle coppie a rischio elevato per FC, vi sono ben pochi dubbi che la villocentesi, data l'epoca precoce in cui può essere eseguita, sia la procedura elettiva di prelievo per realizzare una diagnosi prenatale, così come in tutte le diagnosi prenatali in cui il rischio di malattia sia alto. Nella gravidanza di queste coppie ad alto rischio, con genotipo definito, l'accuratezza della diagnosi prenatale FC è superiore al 99%. Se comunque la diagnosi prenatale è compiuta dopo il primo trimestre, si ricorda che la legge 194 del 1978 prevede la possibilità dell'interruzione di gravidanza nel II trimestre qualora la malattia diagnosticata esponga ad alto rischio la salute fisica o psichica della madre.

2) La Diagnosi Genetica Preimpianto, pur con i limiti tecnici di cui si discute nel presente documento. In Italia tale procedura è stata di fatto proibita dalla promulgazione della Legge 40/2004, ma è comunemente effettuata nelle Strutture specializzate di numerosi paesi europei.

#### Ricorso alla Diagnosi Prenatale e alla Diagnosi Genetica Preimpianto

Non conosciamo quante siano in Italia le coppie con rischio elevato per FC che decidono di avere figli, e quante ricorrano alla diagnosi prenatale. L'inchiesta della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) citata sopra, comprende anche le diagnosi prenatali effettuate in assenza di specifico rischio per FC e quindi non è utile alla conoscenza del dato.

All'estero, nei centri in cui viene realizzata la PGD, la richiesta di diagnosi di FC non è modesta: presso un centro di Parigi (13) che riporta cinque anni di esperienza di PGD (2000-2004), su 56 coppie a rischio per malattia genetica che chiedono PGD, in oltre la metà dei casi la malattia genetica è la FC. Nell'esperienza di un grosso centro belga (14) in 10



anni sono 69 le coppie che hanno fatto richiesta di PGD per FC e l'8% di queste sono coppie FC italiane.

### CAPITOLO 5: Legislazione in vigore in Italia

In Italia la legge 40 del 19 febbraio 2004 regola la materia della Procreazione Medicalmente Assistita. Il testo integrale della legge è disponibile all'indirizzo <http://www.parlamento.it/parlam/leggi/040401.htm> (15). L'articolo 1 della legge recita che "è consentito il ricorso alla procreazione medicalmente assistita per favorire la soluzione dei problemi derivanti dalla sterilità o infertilità umana". Nel testo delle Linee Guida alla legge, emesse il 21 luglio 2004 e modificate con Decreto 11 Aprile 2008, disponibili all'indirizzo <http://gazzette.comune.jesi.an.it/2008/101/4htm> (Gazzetta Ufficiale n.101 del 30 Aprile 2008)(16), vengono precisati i significati di sterilità e infertilità, condizioni che restano comunque indispensabili per accedere alle procedure di PMA. Pertanto l'accesso alla PGD nelle coppie a rischio per FC (e per altre malattie genetiche), è limitato a una minoranza di queste che presenta accertati problemi di infertilità.

Nel corso dell'ultimo triennio numerosi Tribunali in diverse sedi hanno disposto interventi che consentivano a coppie portatrici di gravi malattie genetiche che avevano presentato ricorso, di accedere alle tecniche di PGD e/o di rifiutare l'impianto di embrioni risultati affetti. In particolare:

- il Tribunale di Cagliari (sentenza del 22 settembre 2007) disponeva l'accertamento diagnostico pre-impianto dell'embrione, di tipo non puramente osservazionale;
- il Tribunale di Firenze (sentenza 17 dicembre 2007) disponeva il divieto dell'impianto di embrioni che fossero risultati affetti ad una indagine preimpianto;
- il TAR del Lazio (sentenza n. 398/2008) annullava la disposizione contenuta nelle Linee Guida del 21.07.2004 che consentiva la sola indagine osservazionale negli embrioni prima dell'impianto in utero.

A seguito di tali sentenze nel 2008 è stata apportata una modifica alle LG /DM 11.04.2008) che ha di fatto cancellato tale disposizione (17).

Inoltre nel 2009 altri due interventi, uno della Corte Costituzionale ed uno del Tribunale di Bologna hanno introdotto importanti dubbi sulla liceità e applicabilità della legge 40. La Corte Costituzionale, con la sentenza n° 151/2009 (18), ha dichiarato l'illegittimità costituzionale della

disposizione che imponeva limiti numerici sia alla produzione di embrioni che al loro reimpianto, contenuta nell'art. 14, comma 2, della legge n. 40, limitatamente alle parole "ad un unico e contemporaneo impianto, comunque non superiore a tre". Pertanto la nuova formulazione della legge prevede che "Le tecniche di produzione degli embrioni, tenuto conto dell'evoluzione tecnico-scientifica e di quanto previsto dall'articolo 7, comma 3, non devono creare un numero di embrioni superiore a quello strettamente necessario". Nella decisione della Corte Costituzionale è dato per presupposto, sulla base di una interpretazione conforme a Costituzione reputata implicitamente valida, che la diagnosi "genetica" preimpianto sia lecita. La diagnosi genetica sarebbe dunque possibile nel caso in cui sia rivolta a dare informazioni alla coppia infertile sullo stato di salute degli embrioni ai sensi dell'art. 14, comma 5. L'art. 14, comma 1, continua a sancire il principio del divieto di crioconservazione. Tuttavia, le conclusioni raggiunte dalla Corte impongono di "introdurre una deroga al principio generale di divieto di crioconservazione". Embrioni diagnosticati come non sani possono essere crioconservati e non trasferiti, almeno fino al momento in cui si possa effettuare una terapia sugli stessi, a salvaguardia della salute del feto e della madre.

Il Tribunale di Bologna, d'altro canto, ha ai primi di luglio, depositato un'ordinanza che oltre a ribadire la liceità della diagnosi preimpianto, riconosce, per la prima volta alla coppia non sterile, che abbia avuto un figlio affetto da grave malattia genetica, l'accesso a tale procedura.

Da quanto su esposto si evince che tutti i pronunciamenti dei Tribunali interpellati sono favorevoli alla rimozione dei divieti che gravano sulle procedure di PGD rivolta a gravi patologie genetiche. Un passo molto importante è stato il pronunciamento della Corte costituzionale in quanto la restrizione del numero degli embrioni rappresentava comunque, al di là dei divieti, un ostacolo insormontabile per l'applicazione della PGD. La sentenza del Tribunale di Bologna infine pone dubbi sulla liceità della preclusione alle coppie fertili dell'accesso alla PMA e quindi alla PGD. Per porre la parola fine ad un dibattito dai toni accesi e dai risultati non del tutto certi, si auspica che sia quanto prima rivisto il testo delle Linee Guida che potrebbero, recependo le indicazioni dei numerosi giudici che hanno espresso autorevole parere, rimuovere gli ostacoli all'attuazione di procedure che sono in tutto il mondo accettate e ritenute eticamente valide, ponendo pazienti e operatori in condizione di agire in serenità e nel rispetto delle leggi.

### Riferimenti bibliografici:

1. Basille C, Frydman R, El Aly A, Hesters L, Franchin R, Tachdjian G, Steffann J, LeLorc'h M, Achour-Frydman N. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 145(1):9-13
2. Renwick P, Ogilvie CM. Preimplantation Genetic Diagnosis for monogenic diseases: overview and emerging issues. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7:33-43
3. Bower C, Hansen M. Assisted reproductive technologies and birth outcomes: overview of recent systematic reviews. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17(3):329-333
4. Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama P. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *J Ass Reprod Gen* 2004; 21:437-443

5. Nyboe Andersen N, Gossens V, Bhattacharya S, Ferraretti AP, Kupka MS, de Mouzon J, Nygren KG; European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod* 2009; 24(6):1267-1287
6. Tomi D, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Eckhold J, Schöpfer B, Al-Hasani S, Diedrich K, Schwinger E. Polar body diagnosis for hemophilia A using multiplex PCR for linked polymorphic markers. *J Histochem Cytochem* 2005; 53:277-280
7. ESHRE-European Society Human Reproduction Embryology-PGD Consortium. Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS). *Hum Reprod* 2005; 20:35-48
8. Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Sertyel S, Karadayi H, Cottone G, Baldi M, Caserta D and Moscarini M Rapid protocol for pre-conception genetic diagnosis of single gene mutations by first polar body analysis: a possible solution for the Italian patients. *Prenat Diagn* 2008; 28:62-64
9. Strom CM, Levin R, Strom S, Masciangelo C, Kuliev A and Verlinsky Y. Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: the first 109 infants. *Pediatrics* 2000; 106: 650-653
10. Borgo G, Castellani C, Bonizzato A, Mastella G. Carrier testing program in a high-risk cystic fibrosis population from Northeastern Italy. *Community Genetics* 1999; 2:82-90
11. Riccaboni A, Lalatta F, Caliarì I. Genetic Screening in 2,710 infertile candidate couples for assisted reproductive techniques: results of application of Italian guidelines for the appropriate use of genetic tests. *Fertil Steril* 2008; 89:800-808
12. Dallapiccola B, Torrente I, Morena A, Dagna-Bricarelli F, Mingarelli R. Genetic testing in Italy, year 2004. *Eur J Hum Genet* 2006; 14:911-916
13. Feyereisen E, Steffan J, Romana S. Five years' experience of preimplantation genetic diagnosis in the Parisian Center: outcome of the first 441 started cycles. *Fertil Steril* 2007; 87(1):60-73
14. Keymolen K, Gossens V, De Rycke M, Sermon K. Clinical outcome of Preimplantation Genetic Diagnosis for cystic fibrosis: the Brussels' experience. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:752-758
15. Legge 19 Febbraio 2004, n.40 "Norme in materia di procreazione medicalmente assistita" *Gazzetta Ufficiale* n. 45, 24 Febbraio 2004, <http://www.parlamento.it/parlam/leggi/040401.htm>
16. Decreto 21 Luglio 2004 "Linee Guida in materia di procreazione medicalmente assistita" *Gazzetta Ufficiale* n. 191, 16 Agosto 2004. <http://www.parlamento.it/>
17. Decreto 11 Aprile 2008 "Linee Guida in materia di procreazione medicalmente assistita" *Gazzetta Ufficiale* n. 101, 30 Aprile 2008 <http://www.parlamento.it/>
18. Sentenza n.151/2009 della Corte Costituzionale Italiana (*Gazzetta Ufficiale* 13 maggio 2009) <http://www.cortecostituzionale.it/>

## GLOSSARIO

**Allele** = ogni gene è presente nell'individuo in due copie, una ereditata dalla madre e una ereditata dal padre. Le due copie del gene sono dette alleli. Ogni allele risiede in un punto preciso, detto locus, su di un cromosoma. Su cromosomi omologhi gli alleli occupano lo stesso locus e rappresentano il genotipo di un determinato individuo per quel locus.

**ADO = Allele Drop Out** = Perdita casuale di un allele, fenomeno che può intervenire nel corso dell'analisi genetica. Il risultato è che uno solo dei due alleli viene amplificato, attraverso PCR, per cui può essere diagnosticato come omozigote sano o malato un embrione che è eterozigote.

**Analisi molecolare** = indagine eseguita a livello del DNA.

**Aploide** = viene così definito il numero dei cromosomi nei gameti (23). Ogni cromosoma rappresenta un solo elemento di ogni coppia di cromosomi omologhi. Ogni cromosoma infatti ha un suo omologo e forma con questo la coppia di cromosomi omologhi. Le coppie di cromosomi omologhi

sono 23, perciò in tutto i cromosomi del corredo presente nelle cellule somatiche sono 46. Il corredo di cromosomi delle cellule somatiche è detto diploide.

**Blastocisti** = l'insieme delle cellule embrionarie (chiamate blastomeri) che derivano dallo zigote nel processo di formazione dell'embrione.

**Blastomero** = cellula che deriva dallo zigote nel suo processo di divisione cellulare. I primi due blastomeri si formano 35 ore dopo la fecondazione, le successive suddivisioni si hanno con intervalli di 10 ore l'una dall'altra e in ognuna di esse il numero dei blastomeri raddoppia. A 72 ore dalla fecondazione i blastomeri sono in genere 8.

**Cellule somatiche** = tutte le cellule che formano un organismo, escluse le cellule destinate alla riproduzione

**Cariotipo** = il corredo cromosomico di un individuo o di una cellula. La scienza che lo studia, la citogenetica, ha messo

a punto uno schema ordinato nel quale i singoli cromosomi che costituiscono il cariotipo sono identificati in base alle loro caratteristiche morfologiche.

**Cromosomi omologhi** = sono i cromosomi che hanno forma e funzione simili, derivano uno dal padre e uno dalla madre e si appaiano all'inizio della divisione cellulare (meiosi o mitosi).

**Diploide** = il numero dei cromosomi nelle cellule somatiche (46). Ogni cromosoma ha un suo omologo e forma con questo la coppia di cromosomi omologhi. Le coppie di cromosomi omologhi sono 23, perciò in tutto i cromosomi del corredo diploide sono 46. Vedi anche sopra **Aploide**.

**Embrione** = secondo alcune definizioni è l'organismo che si è sviluppato dallo zigote e che ha superato il quattordicesimo giorno dal concepimento. Prima di questa data andrebbe chiamato con il termine di **Preembrione**. **Nel testo il termine embrione è sempre usato nel significato di preembrione.**

**Gameti** = cellule particolari destinate alla riproduzione (spermatozoo nel maschio, ovocita nella femmina). Ogni gamete contiene 23 cromosomi. Quando lo spermatozoo ha fecondato l'ovocita, si forma una nuova cellula, lo zigote, che contiene 46 cromosomi (23 dello spermatozoo + 23 dell'ovocita).

**Locus** = l'esatta posizione di un gene su di un cromosoma.

**Malattie monogeniche** = malattie dovute a difetti di un singolo gene (fibrosi cistica, talassemia). Il gene può essere localizzato su uno dei cromosomi autosomici (esempio: fibrosi cistica, talassemia, acondroplasia) o su di un cromosoma sessuale (Distrofia Muscolare di Duchenne). Sono trasmesse secondo le leggi di Mendel (dominanza, recessività, codominanza).

**MESA** = Microsurgical Epidymal Sperm Aspiration. **TESA** = Testicular Sperm Extraction, **PESA** = Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration. Sono tecniche di recupero degli spermatozoi a livello dell'epididimo o del testicolo attraverso ago percutaneo o intervento di microchirurgica.

**Meiosi** = processo di divisione cellulare che porta alla produzione dei gameti maschili e femminili (spermatozoi e ovociti). Nella meiosi il numero dei cromosomi della cellula di partenza si dimezza, per cui ogni gamete contiene 23 cromosomi.

**Mitosi** = processo di divisione delle cellule somatiche, che sono tutte le cellule del corpo umano ad esclusione di quelle destinate alla riproduzione (chiamate gameti). Con la mitosi una cellula si divide per dare origine a due cellule identiche alla cellula progenitrice, con stesso numero di cromosomi e stessi geni.

**Mosaico** = individuo che è derivato da un unico zigote ma contiene cellule che hanno un corredo cromosomico diverso fra di loro.

**Preembrione** = l'embrione prima del quattordicesimo giorno dal concepimento. Prima di questo giorno l'embrione è composto da cellule altamente indifferenziate, tutte uguali, tutte totipotenti, in cui non si possono distinguere quelle che daranno luogo agli annessi da quelle che daranno luogo al neonato. Dopo il quattordicesimo giorno compare nel disco bilaminare (costituito da ectoderma ed endoderma) la "linea primitiva", che costituisce l'inizio della differenziazione cellulare. **Nel testo il termine embrione è sempre usato nel significato di preembrione.**

**PCR** = Polymerase Chain Reaction = Reazione a Catena della Polimerasi, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione ("amplificazione") di frammenti di DNA dei quali si conoscano le sequenze iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico sufficiente per l'indagine che si vuole eseguire, pur partendo da una piccolissima quantità di DNA.

**Polimorfismo** = variazione della sequenza del DNA comune nella popolazione.

**Trofoectoderma** = strato esterno delle cellule che formano la blastocisti.





# xTAG<sup>®</sup> Cystic Fibrosis

The broadest choice in CFTR mutation coverage



## xTAG<sup>®</sup> Cystic Fibrosis 39 kit v2\*

ΔF508	A455E	R1162X	1078delT	1898+5G>T
Δ1507	1717-1G>A	3659delC	394delTT	2183AA>G
G542X	R560T	3849+10kbC>T	Y122X	2307insA
G85E	R553X	W1282X	R347H	Y1092X
R117H	G551D	N1303K	V520F	M1101K
621+1G>T	1898+1G>A	<i>5/7/9T</i>	A559T	S1255X
711+1G>T	2184delA	<i>F508C</i>	S549N	3876delA
R334W	2789+5G>A	<i>I507V</i>	S549R	3905insT
R347P	3120+1G>A	<i>I506V</i>		

ACMG recommended mutations<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Genet Med. 2004 Sep-Oct; 6(5):387-91.

16 most common  
 additional mutations

## xTAG<sup>®</sup> Cystic Fibrosis 71 kit v2\*

E60X	444delA	2055del9>A
R352Q	G622D	S1196X
2869insG	W1089X	935delA
R75X	R117C	2143delT
S364P	1677delTA	CFTRdel2,3
3120G>A	D1152H	ΔF311
405+3A>C	R1158X	K710X
G480C	G178R	R1066C
3199del6	1812-1G>A	G330X
406-1G>A	3791delC	Q890X
Q493X	L206W	



List of mutations or variants (in italics) identified in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene.  
 \* For *In Vitro Diagnostics* Use Only, CE-Marked

## The benefits of xTAG<sup>®</sup> Cystic Fibrosis:



**Comprehensive:** Most comprehensive mutation coverage, including ACMG/ACOG recommended panel

**Flexibility:** Sample type between blood sample or blood spot  
 Mutation panel selection through the software

**Confidence:** Second generation of CE-Marked IVD assay  
 >99.9% Precision and Reproducibility

**Ease of use:** Streamlined protocol with minimal hands-on time  
 No handling of strips or subjective interpretations

**Cost-effective:** Multiplex genotyping - Reduced repeat rate  
 No reflex testing is necessary

**diAx**  
 Your link to Biotech Advanced Technologies

www.diAx.it  
 info@diAx.it

**Luminex**<sup>®</sup>

www.luminexcorp.com  
 info@luminexcorp.com