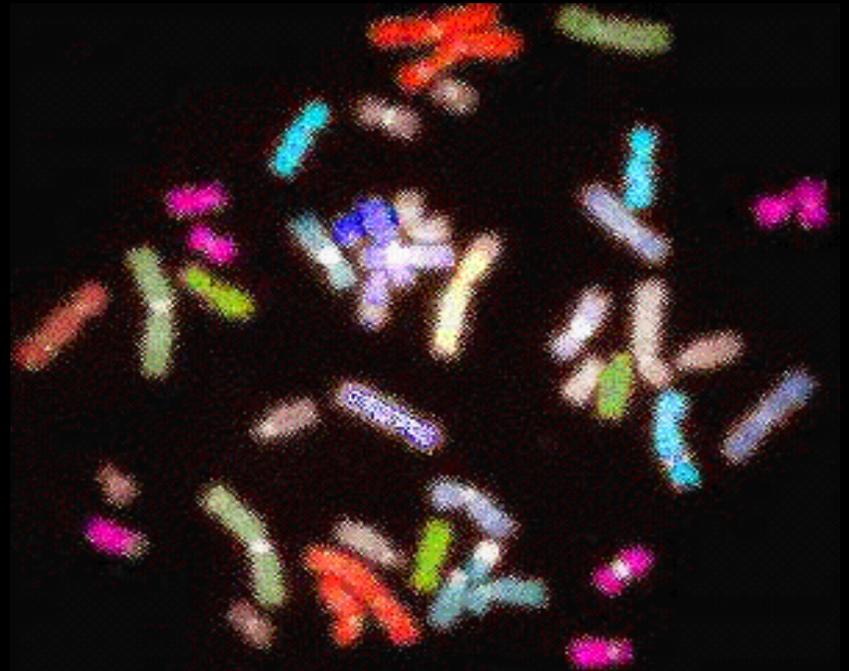


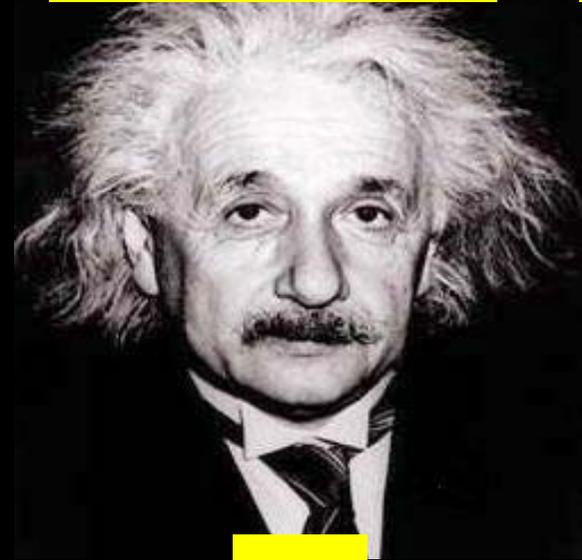
# Riarrangiamenti cromosomici e polimorfismi del numero di copie: alterazioni dell'espressione genica nella patologia umana.

Emiliano Gardina  
emiliano.giardina@uniroma2.it



# Paradosso del valore K: La complessità non correla con il numero di cromosomi

*Homo sapiens*



46

*Lysandra atlantica*



250

*Ophioglossum reticulatum*



1260

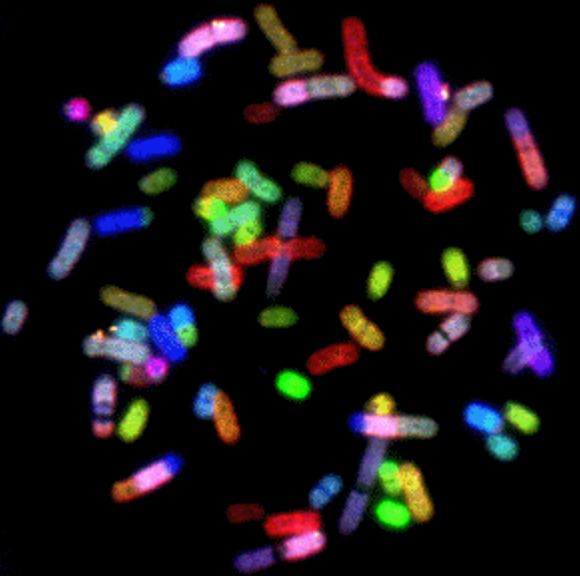
- ⌚ Si può affermare che la ricerca sulla citogenetica umana sia iniziata con gli studi di Arnold (1879) e Flemming (1882) che esaminarono i cromosomi mitotici umani.
- ⌚ Negli anni seguenti apparvero numerose pubblicazioni con diverse stime del numero di cromosomi umani.
- ⌚ Rilevante, tra questi primi contributi, fu il lavoro di Von Winiwater nel 1912. Egli esaminò preparati istologici testicolari di quattro uomini di 21,23, 25 e 41 anni, fissati e tagliati in sezioni di soli 7,5  $\mu\text{m}$  di diametro, il che impediva di contare i cromosomi. Fu possibile esaminare 32 mitosi spermatogoniche: in 29 egli contò 47 elementi, in 2, 46 e in una,49. Furono valutate 60 piastre diploteniche: 57 mostrarono 24 elementi, due sembravano averne 25 e una 23.
- ⌚ La pubblicazione che suscitò maggiormente l'interesse scientifico fu quella di Painter (1921,1923). Egli esaminò i testicoli di tre persone ricoverate al Texas State Insane Asylum e sottoposte a castrazione che, a detta dei medici, si era resa necessaria a causa della loro condizione di pazzia. I risultati si basarono principalmente sulle analisi effettuate su due dei tre individui. In un lavoro preliminare l'autore affermò che il numero di cromosomi era 46 o 48, ma nella relazione finale (1923) decise in favore di 48 cromosomi.

## **...preconcetti**

**⌚ Anche trent'anni dopo, la stima di 48 cromosomi effettuata da Painter era tanto profondamente radicata nella mente dei ricercatori, che nei primi studi sui cromosomi umani che utilizzarono nuove tecniche, il numero dei cromosomi umani fu riconfermato in 48.**



Il 22 Dicembre 1955 Tjio stava cercando di estrarre i cromosomi dal nucleo di alcuni fibroblasti provando un personale metodo per fissare i cromosomi sui vetrini. Una volta analizzati i preparati al microscopio si rese conto di aver fatto una scoperta sorprendente. Nella maggior parte delle 261 metafasi di fibroblasti embrionali analizzate si potevano contare chiaramente 46 cromosomi e non 48 come era allora sostenuto dalla comunità scientifica.



**"Non vogliamo generalizzare le nostre scoperte con l'affermazione che il numero cromosomico nell'uomo è  $2n = 46$ , prima di aver effettuato un nuovo accurato controllo del numero cromosomico nelle mitosi spermatogoniche nell'uomo, ma è difficile non concludere che questa sembrerebbe la spiegazione più naturale delle nostre osservazioni".**

# Nasce la citogenetica clinica

- ∞ Nel frattempo, iniziò la fase dello sviluppo della citogenetica clinica. Trascorsero circa tre anni prima che fosse descritto il primo cariotipo anomalo nell'uomo. Le Jeune nel 1959 pubblicò uno studio sui cromosomi da colture di fibroblasti in nove bambini affetti dalla sindrome di Down. Cinquantasette cellule diploidi furono considerate tecnicamente perfette. In tutte il numero di cromosomi era 47. Il cromosoma soprannumerario fu descritto come piccolo e "telocentrico". Una non-disgiunzione meiotica fu considerata come il più probabile evento in grado di spiegare l'origine del cromosoma in soprannumero.

# **LO STUDIO DEI CROMOSOMI: CITOGENETICA**

∞ **0.5% DEI NEONATI: MALATTIE  
CROMOSOMICHE**

∞ **ANOMALIE CROMOSOMICHE IN CELLULE  
SOMATICHE: TUMORI**

∞ **TECNICHE PER LO STUDIO DEI CROMOSOMI**

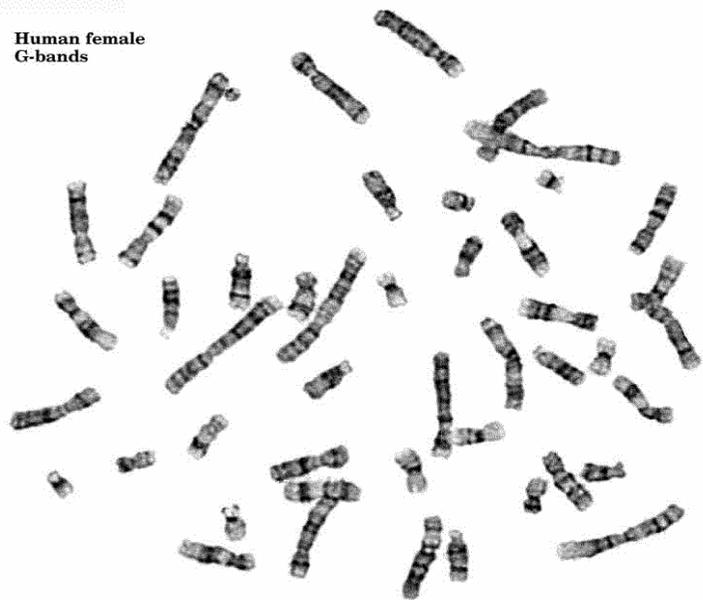
# LA CITOGENETICA

- ∞ **I cromosomi sono visibili soltanto nelle cellule in attiva divisione;**
- ∞ **Fino al 1970 la classificazione dei cromosomi si basava esclusivamente sulla dimensione sulla posizione del centromero;**
- ∞ **L'avvento di raffinate tecniche di bandeggio ha consentito una classificazione e uno studio accurato dei cromosomi**

# TECNICHE DI BANDEGGIO CROMOSOMICO

- ∞ **BANDE G**: trattamento con Tripsina, colorazione con Giemsa. Bande scure ricche in A e T
- ∞ **BANDE Q**: colorazione con Quinacrina (o DAPI o Hoechst), coloranti fluorescenti che si legano preferenzialmente alle zone ricche in A e T
- ∞ **BANDE R**: denaturazione al calore in soluzione salina, poi colorazione con Giemsa. Denaturazione delle zone ricche in A e T, quindi si ottiene un pattern di bandeggio “reverse” rispetto alle bande G
- ∞ **BANDE C**: denaturazione in soluzione satura di idrossido di bario, poi colorazione Giemsa. Mettono in evidenza l’eterocromatina costitutiva
- ∞ **BANDE T**: Trattamento aggressivo con calore e colorazione Giemsa, servono a evidenziare un gruppo di bande R localizzate in prossimità dei telomeri

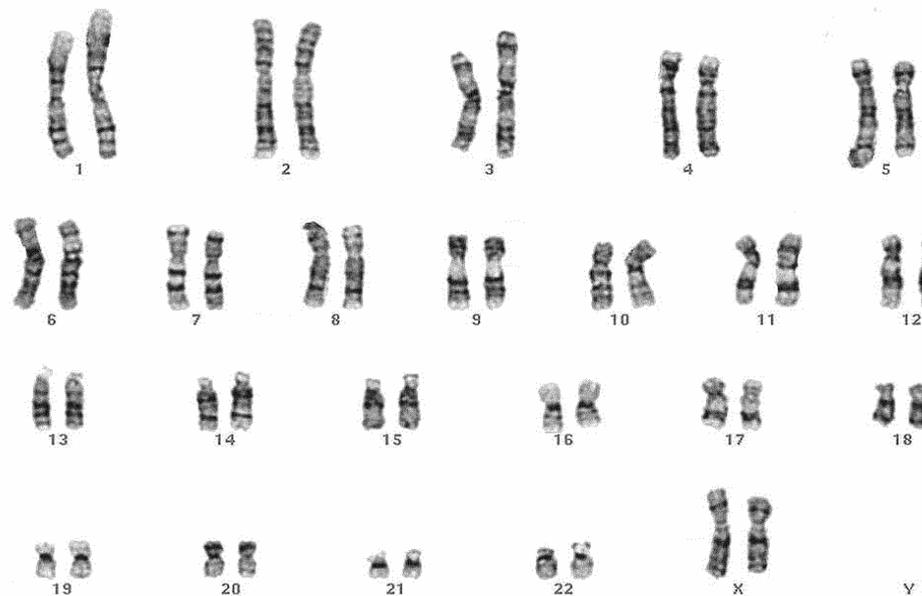
Human female  
G-bands



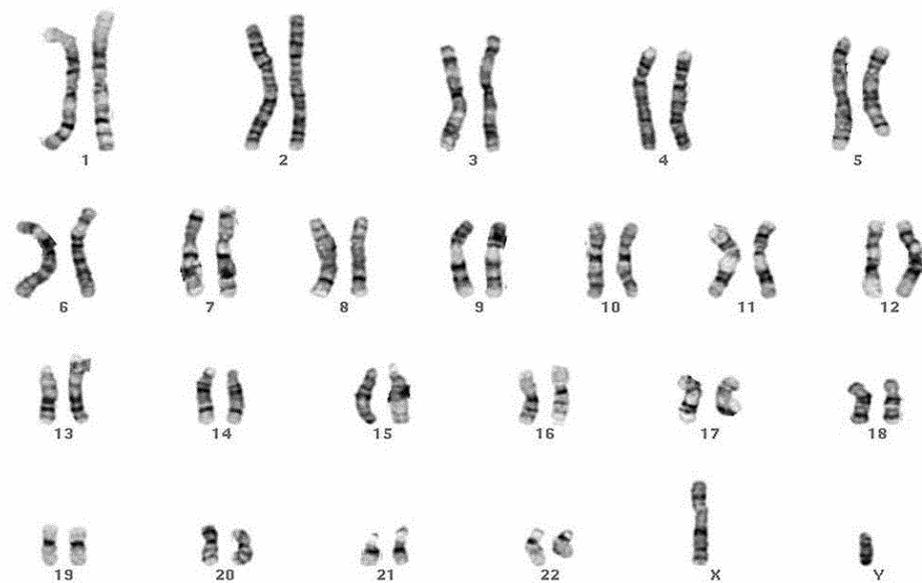
Human male  
G-bands



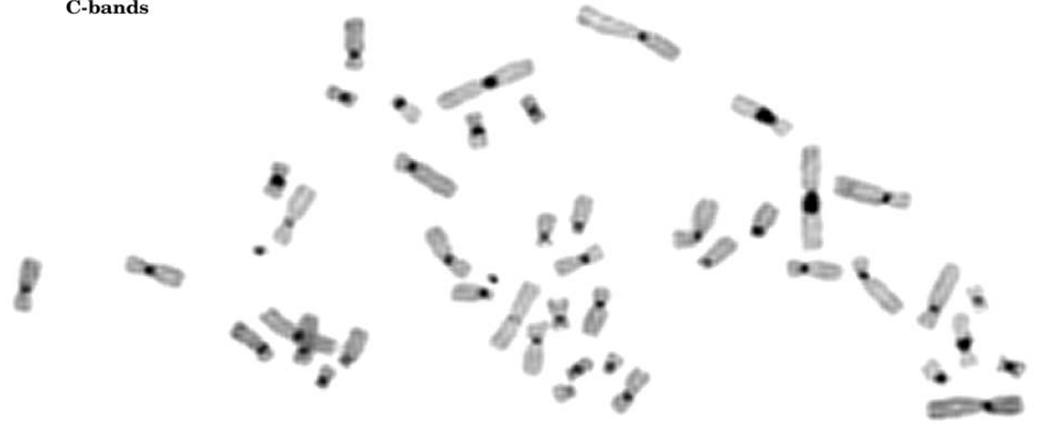
Human female  
G-bands



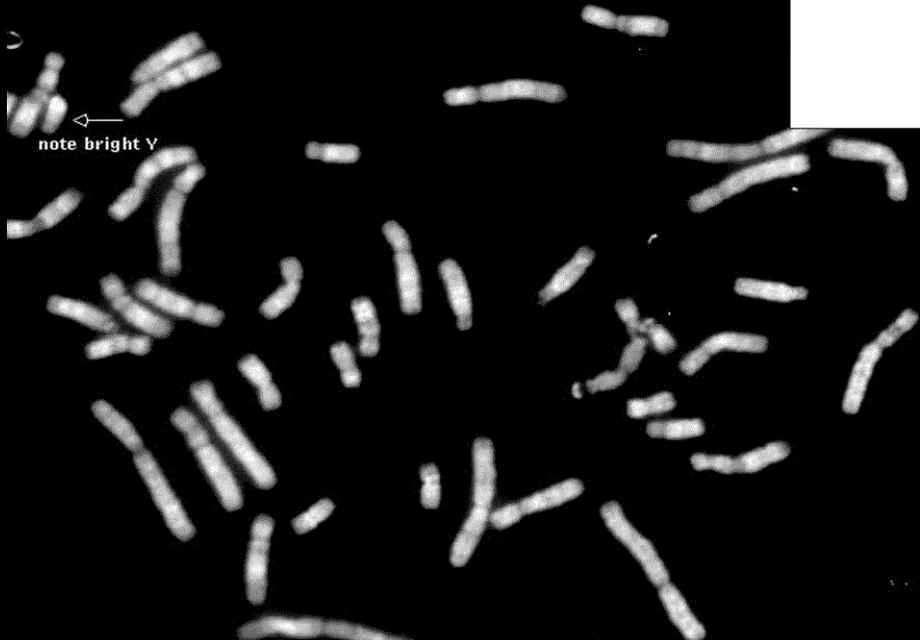
Human male  
G-bands



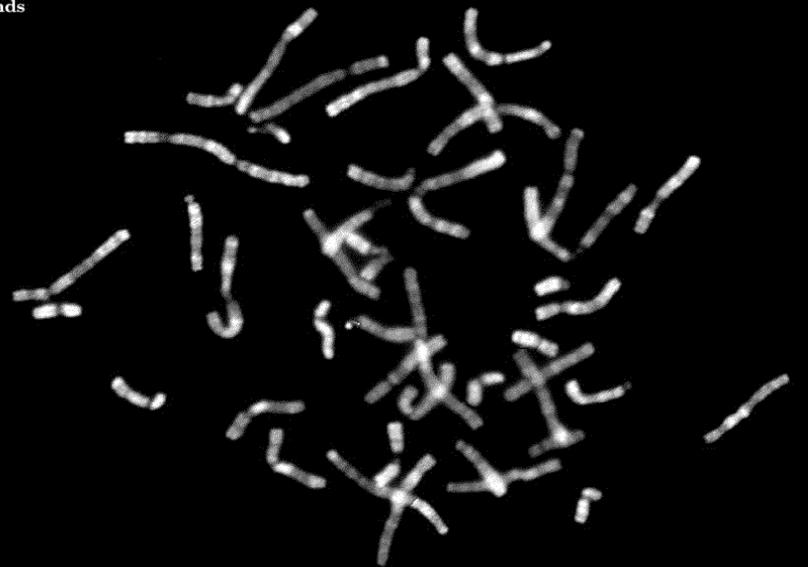
Human female  
C-bands



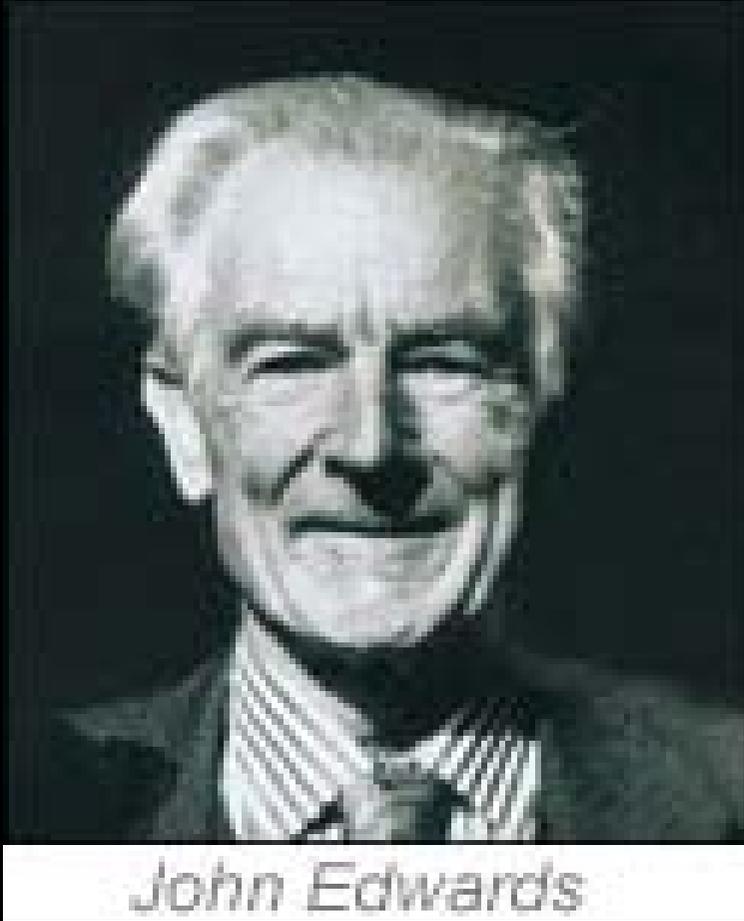
human male  
Q-bands



Human male  
R-bands



# Prof. John Edwards



Professor of Genetics  
at Oxford University  
and  
Fellow of the  
Royal College of Physicians

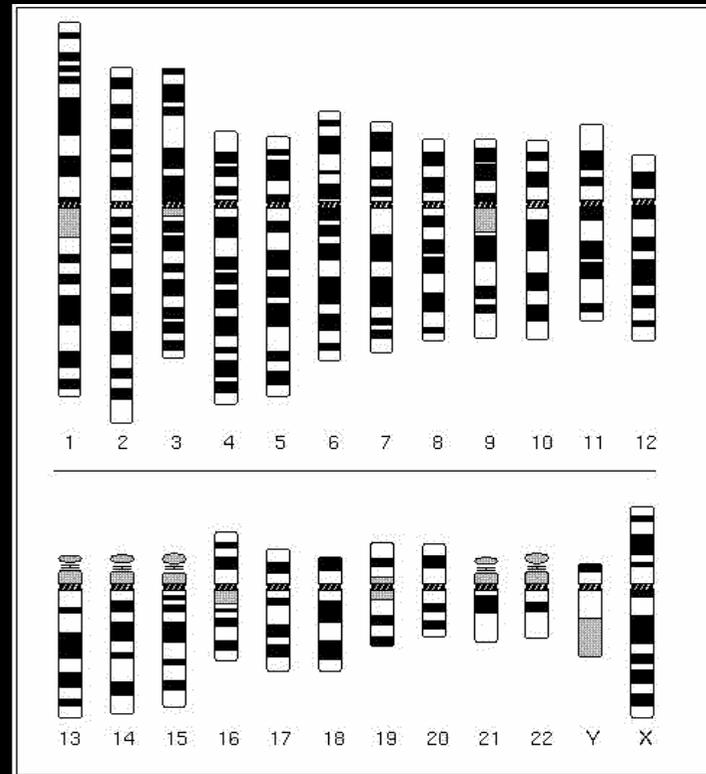
QUOTE:

**“A normal male may well produce a whole of the gene mutation catalogue in every ejaculate”**

# Anomalie cromosomiche

Quali e cosa sono

la loro frequenza



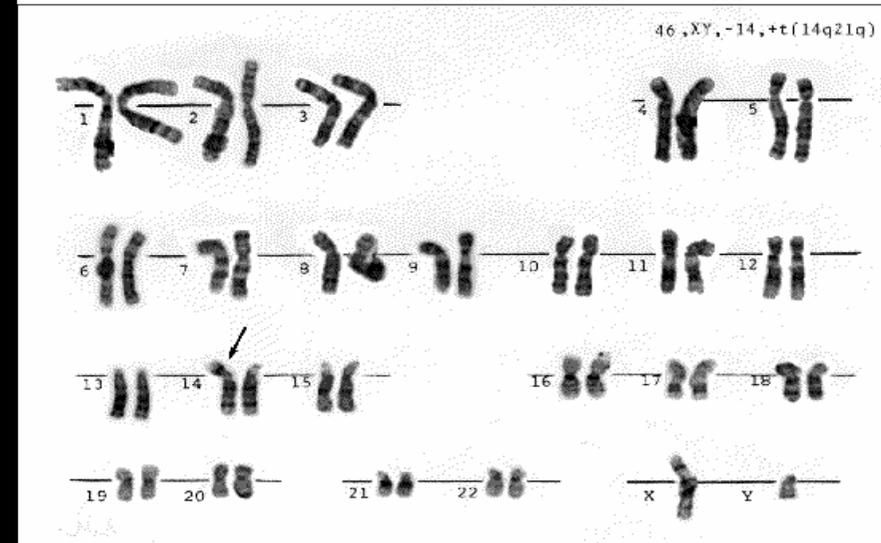
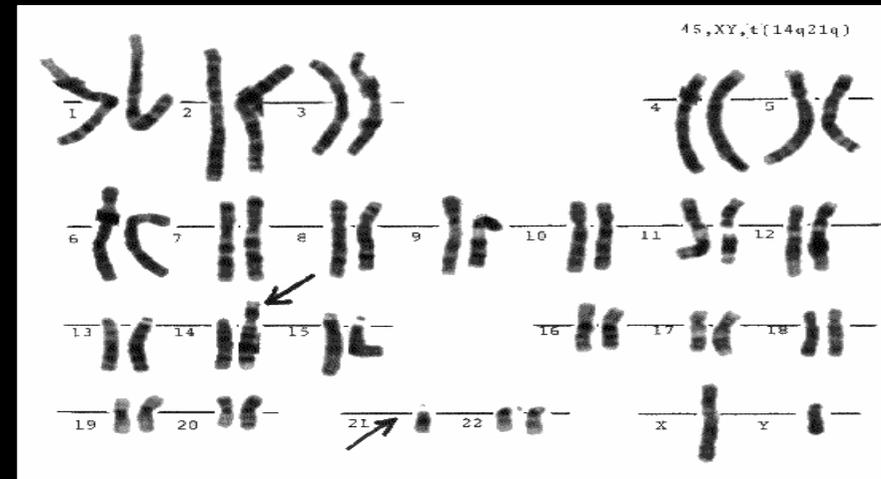
# Anomalie cromosomiche

## ∞ Bilanciate:

∞ nella maggioranza dei casi non sono correlate ad un fenotipo anomalo

## ∞ Sbilanciate:

∞ sono correlate ad un fenotipo anomalo (malformazioni e/o ritardo mentale)



# ANOMALIE CROMOSOMICHE

- ⌚ **Risoluzione Microscopica: 4Mb**
- ⌚ **ANOMALIE COSTITUZIONALI: presenti in cellule di tutto il corpo. Spermatozoo e ovulo normali, fecondazione anomala o evento anomalo nelle prime fasi di sviluppo embrionale**
- ⌚ **ANOMALIE SOMATICHE: presenti in un piccolo sottogruppo di cellule o tessuti. Diverse costituzioni cromosomiche pur derivando tutte le cellule dallo stesso zigote. MOSAICO GENETICO.**
- ⌚ **DIPLOIDIA UNIPARENTALE: prodotto del concepimento in cui tutti i cromosomi derivano da un unico genitore**
- ⌚ **DISOMIA UNIPARENTALE: due omologhi di una specifica coppia di cromosomi derivano da uno solo dei due genitori**

# DIPLOIDIA UNIPARENTALE

## Paterna

(cromosomi paterni raddoppiati negli spermatozoi dopo la fertilizzazione; cromosomi materni eliminati)

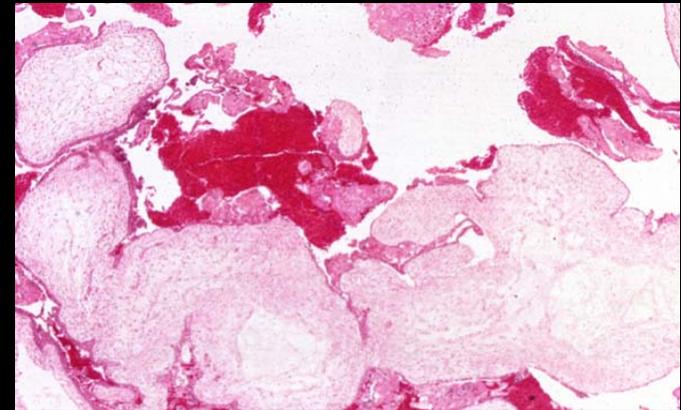
## MOLE IDATIFORME

Proliferazione di tessuto trofoblastico

Ridotta vascolarizzazione dei villi coriali

**No annessi fetali**

Alto rischio di trasformazione  
in coriocarcinoma (20%)



# DIPLOIDIA UNIPARENTALE

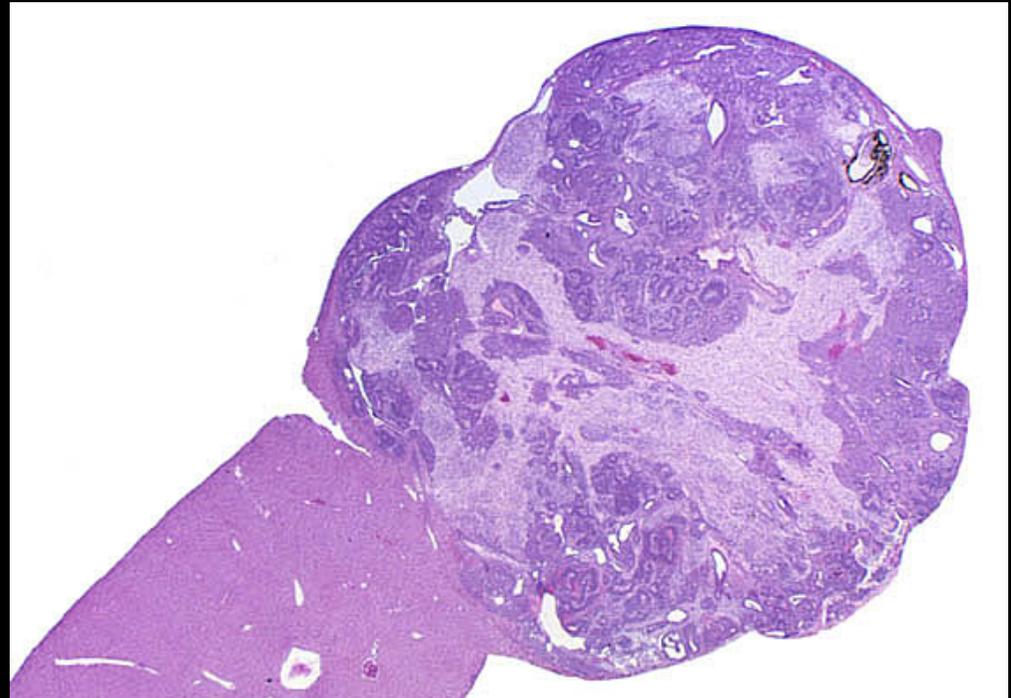
## Materna

attivazione di oociti non ovulati (2n)

Raro, benigno

## Teratoma ovarico

Tessuto embrionale  
disorganizzato  
No placenta



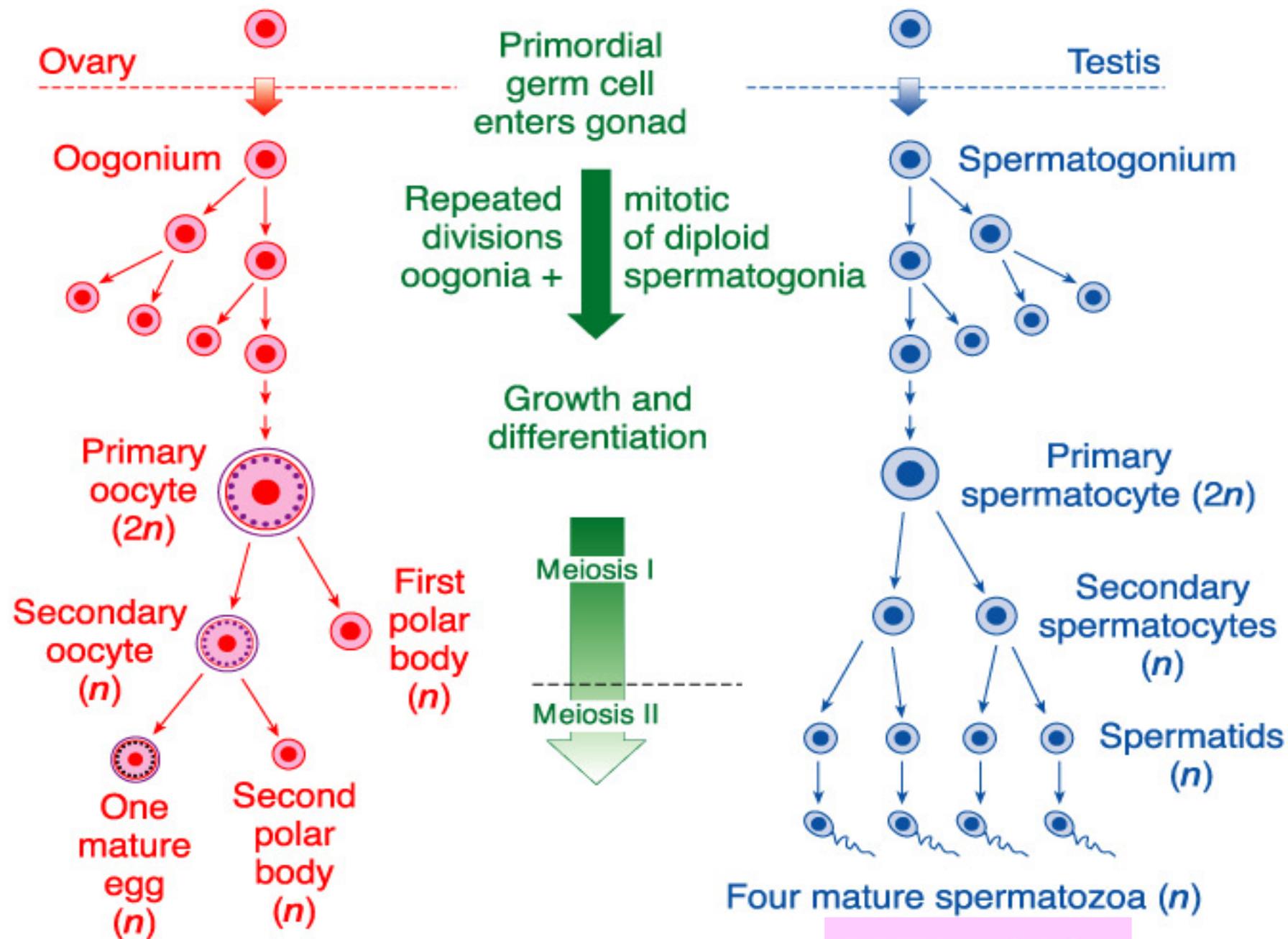


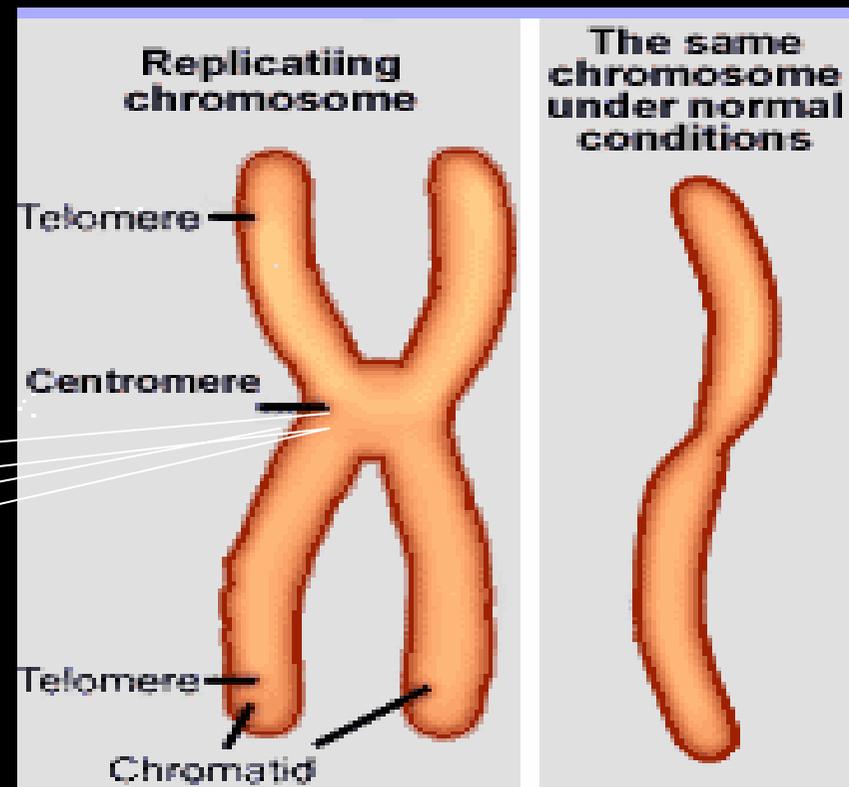
Figure 2-9 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

# I Cromosomi sono un complesso di DNA e proteine

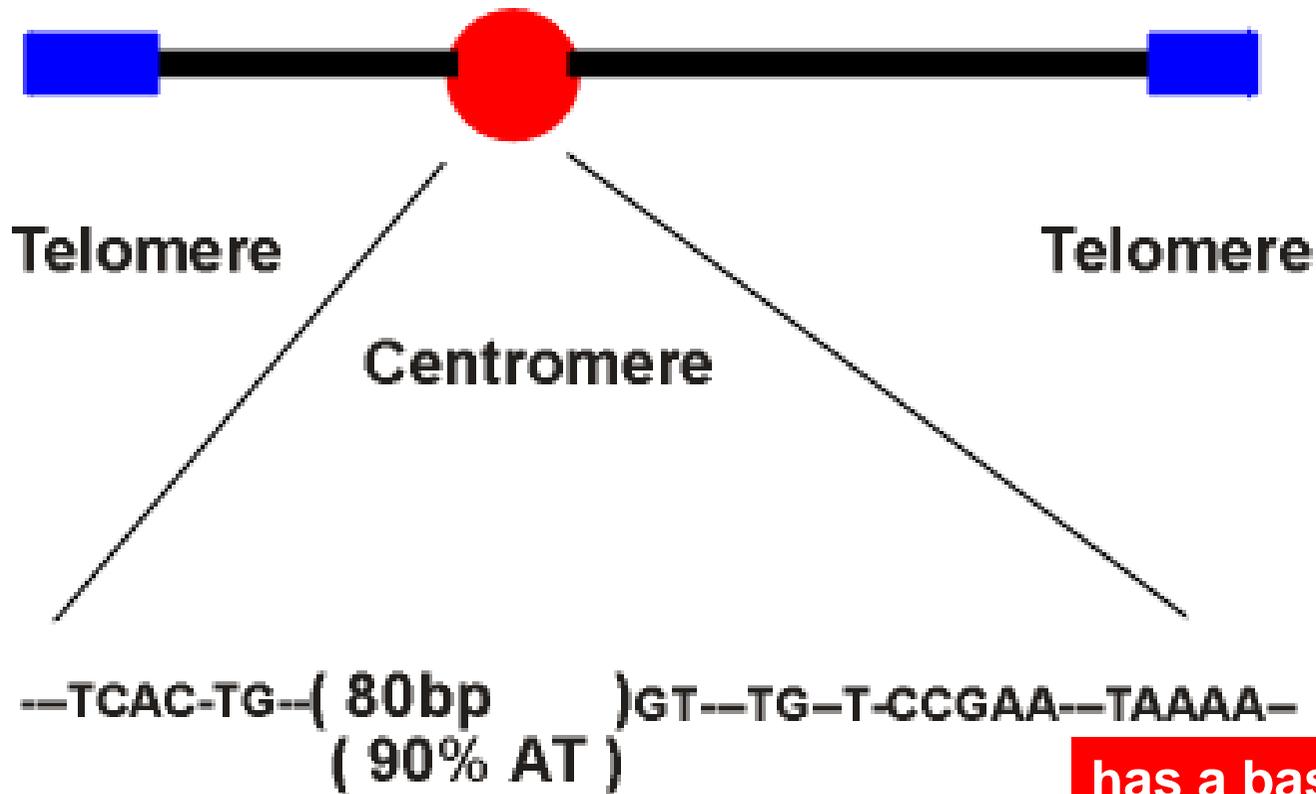
∞ Chromosomes are comprised of a single, uninterrupted DNA molecule complexed with proteins (histones and others).

Telomeres and centromere are demarcating the two "arms" (p and q).

Kinetochores  
microtubules



# Centromero



**Alpha-satellite DNA**

has a basic 170bp unit,  
with variations between species  
and between chromosomes  
in the same species

# Telomeres – Ends of linear chromosomes

Repetitive DNA sequence: **TTAGGG** in vertebrates

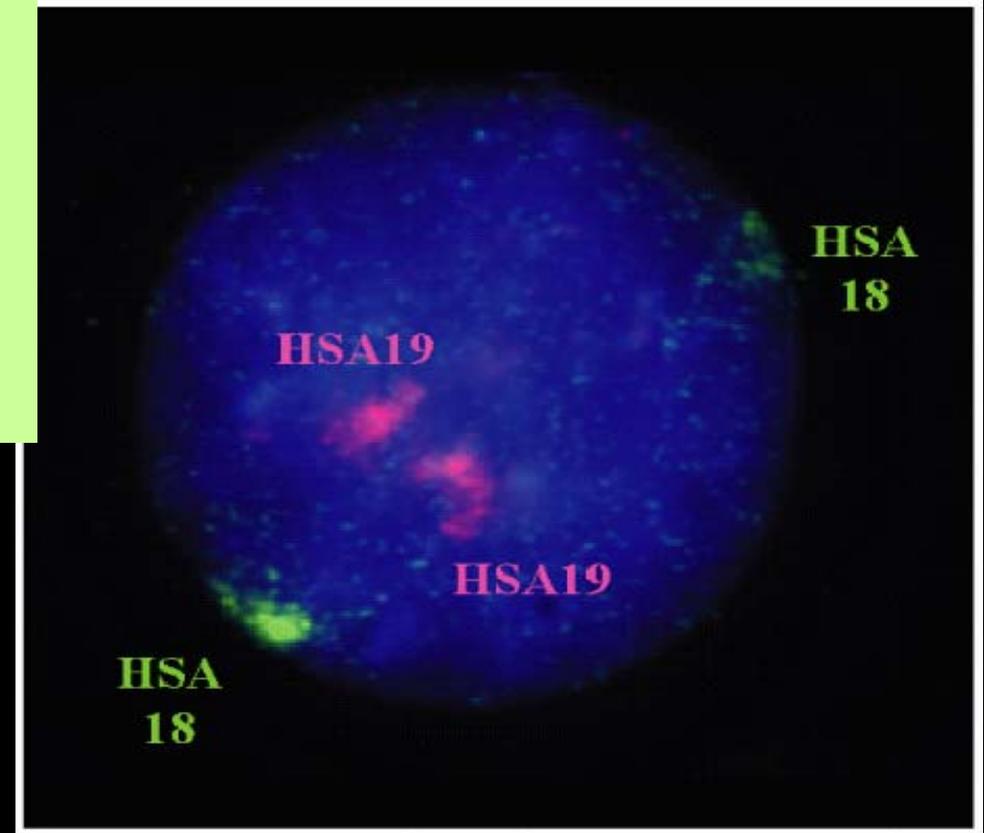
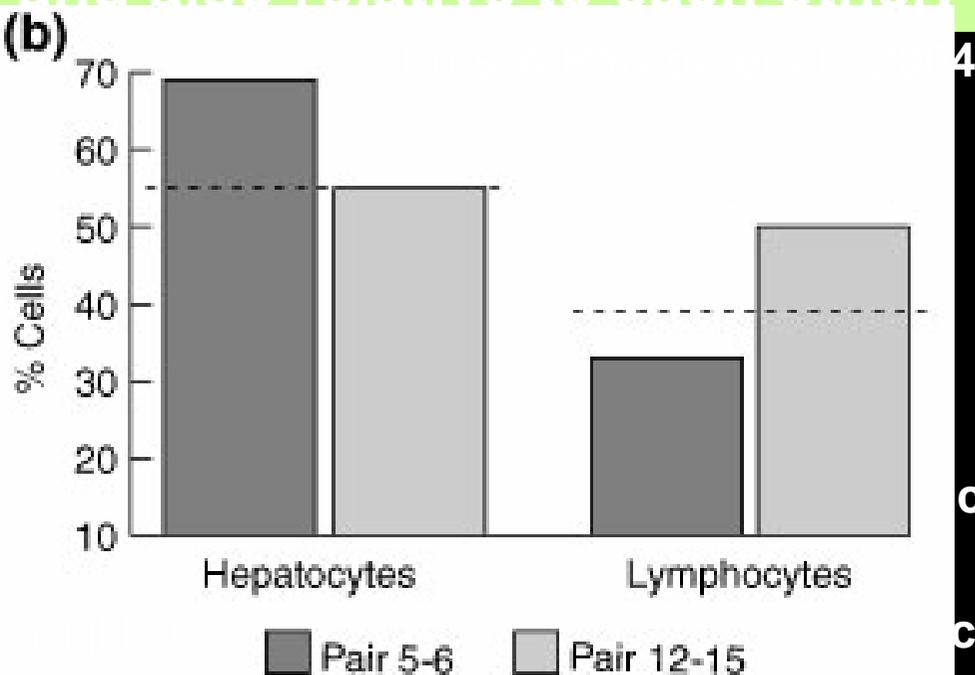
Associated with specialized proteins.

Telomeres:

- allow cells to **distinguish chromosome ends from broken DNA** and prevents chromosomal fusions by non-homologous end-joining (NHEJ) machinery;
- provide a **mechanism for "counting" cell divisions** as they shorten with each cell division (to be discussed in cancer section)
- help to **establish 3D structure** of the nucleus

# Individual chromosomes occupy certain territories in the interphase nucleus

Chromosomes are distributed tissue-specifically with respect to their position relative to the center of the nucleus and also relative to each other.



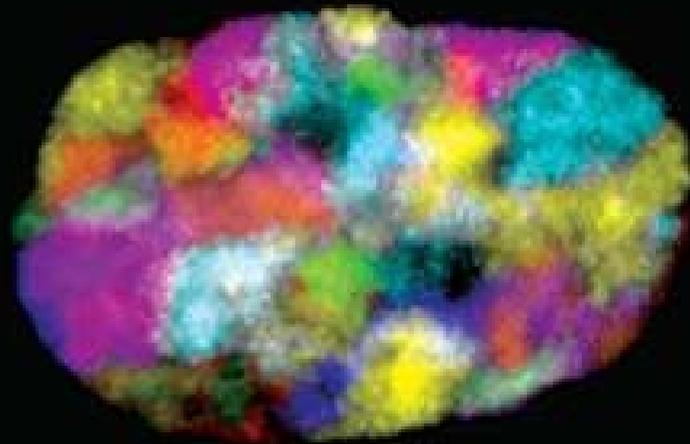
chromosome pairs 5 - 6 (mouse hepatoma)

chromosome pairs 12-15 (mouse lymphoma)

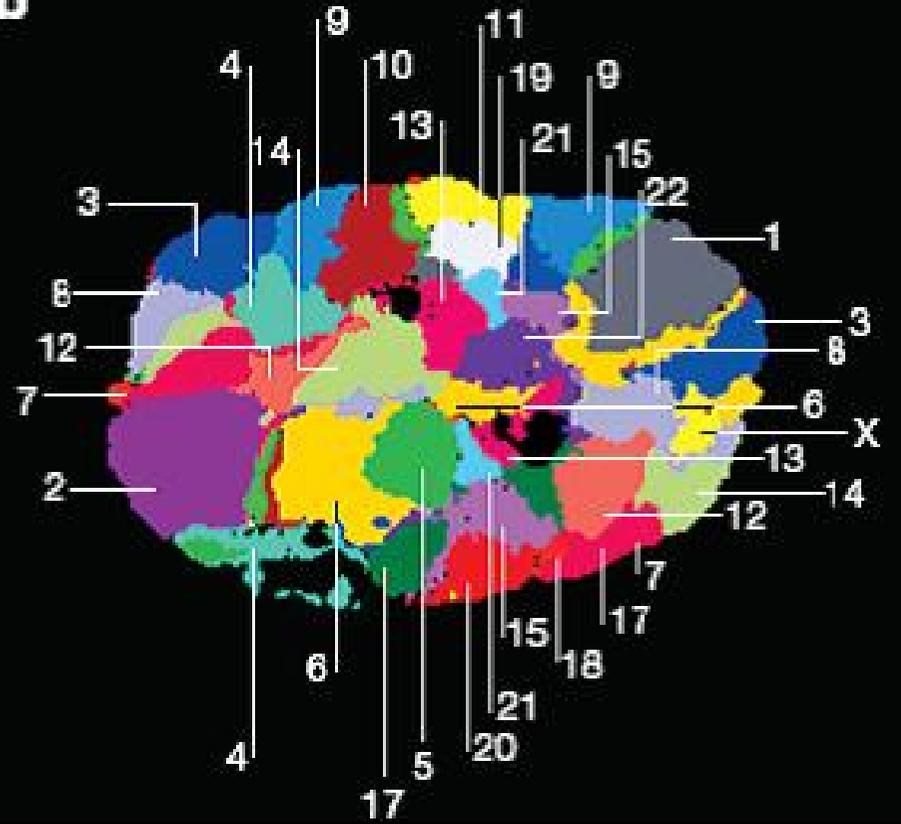
# Geografia del DNA



**a**



**b**



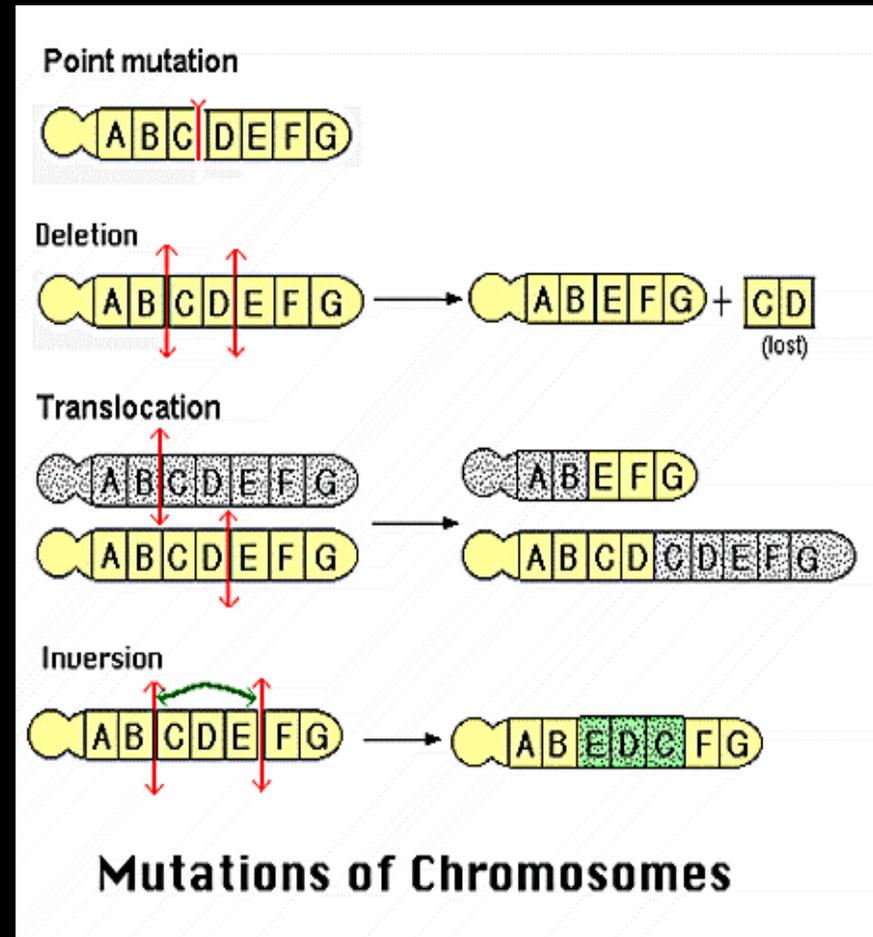
# Quali sono le anomalie cromosomiche

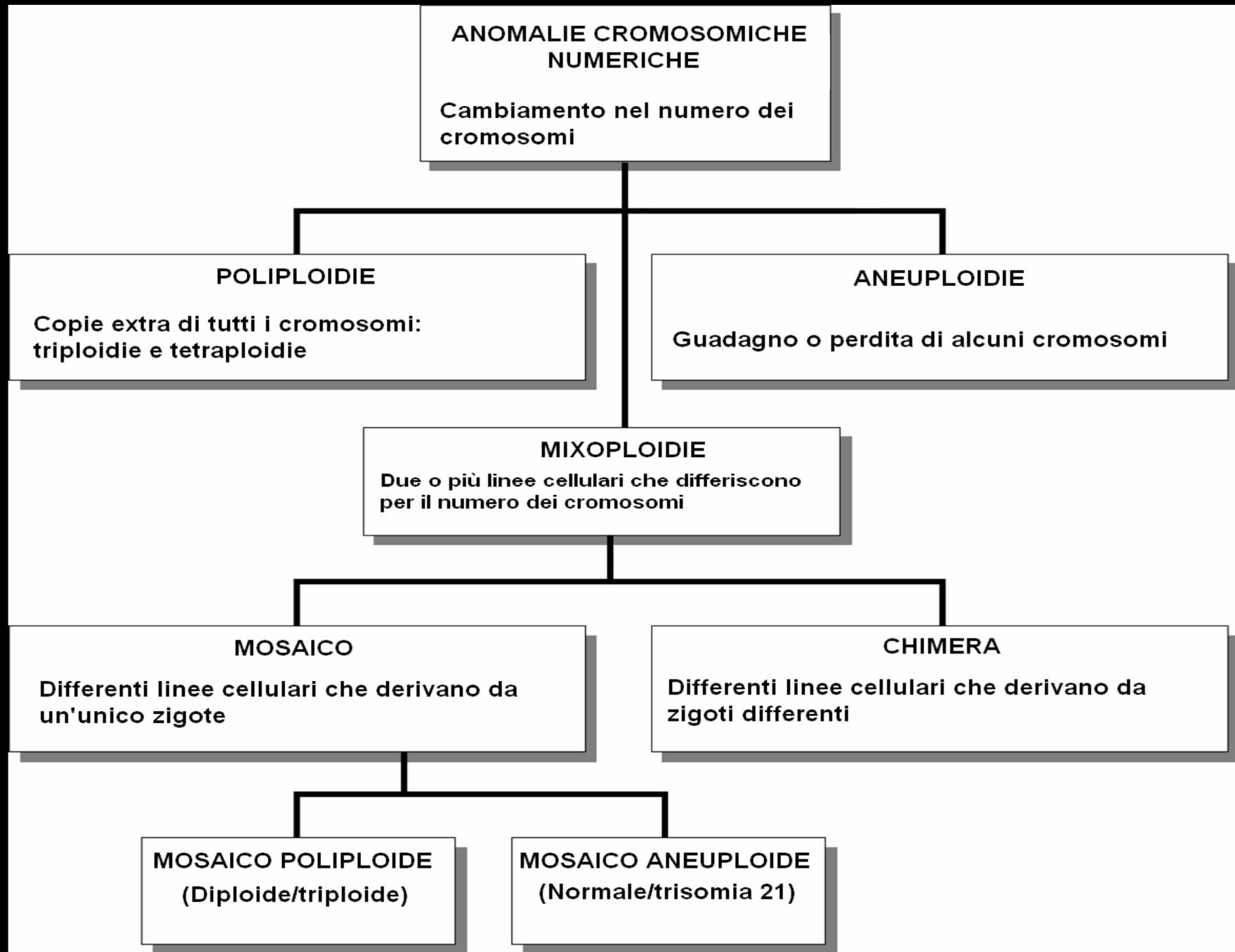
## Di numero

- ∞ trisomie
- ∞ monosomie
- ∞ triploidie
- ∞ tetraploidie

## Di struttura

- ∞ traslocazioni
- ∞ inversioni
- ∞ delezioni
- ∞ duplicazioni



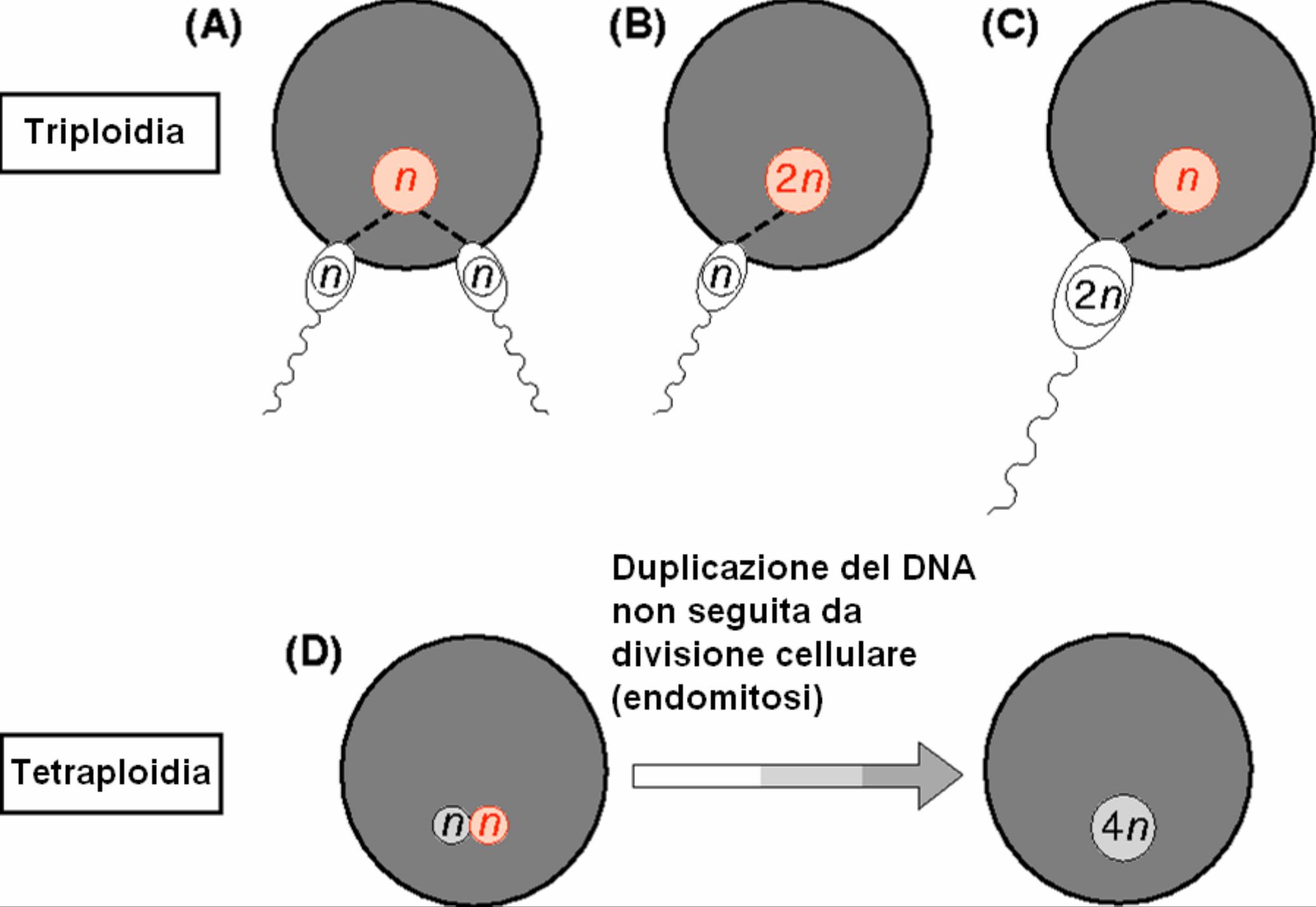


# **ANOMALIE DI NUMERO: CAMBIAMENTO NEL NUMERO DI CROMOSOMI**

## **SENZA ROTTURE CROMOSOMICHE**

### **POLIPLOIDIE**

- ⌚ **TRIPLOIDIA** : dovuta a fecondazione di un singolo ovulo da parte di due spermatozoi (DISPERMIA) o dalla fecondazione che coinvolge un gamete diploide anomalo.
- ⌚ **TETRAPLOIDIA**: dovuta al non completamento della prima divisione zigotica



# **ANOMALIE DI NUMERO: CAMBIAMENTO NEL NUMERO DI CROMOSOMI SENZA ROTTURE CROMOSOMICHE**

- ⌚ **POLIPLOIDIA COSTITUZIONALE: rara, ma cellule del fegato o di tessuti di rigenerazione sono tetraploidi a causa della reduplicazione del DNA della mitosi. Megacariociti, cellule del midollo osseo con nuclei molto grandi: 8-16 volte il numero aploide di cromosomi, sono precursori delle piastrine**
- ⌚ **Piastrine ed altre cellule completamente differenziate (es. eritrociti o cellule epiteliali squamose): NULLIPLOIDI (prive di nucleo)**

# **ANEUPLOIDIA**

## **MONOSOMIE e TRISOMIE**

**Perdita o acquisto di uno o più cromosomi**

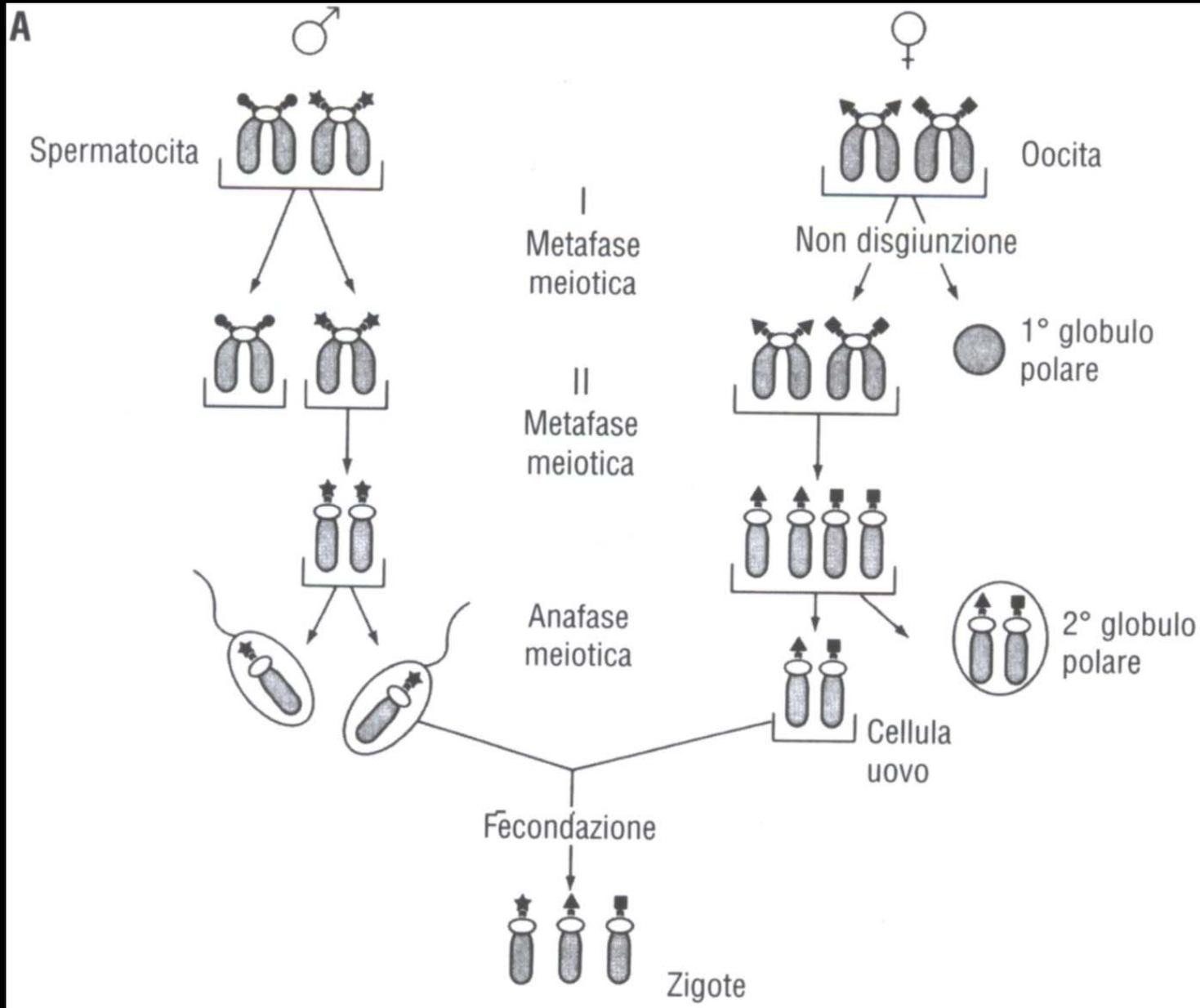
**Presenti nello 0.36% dei nati vivi**

# ANEUPLOIDIA

## CAUSE

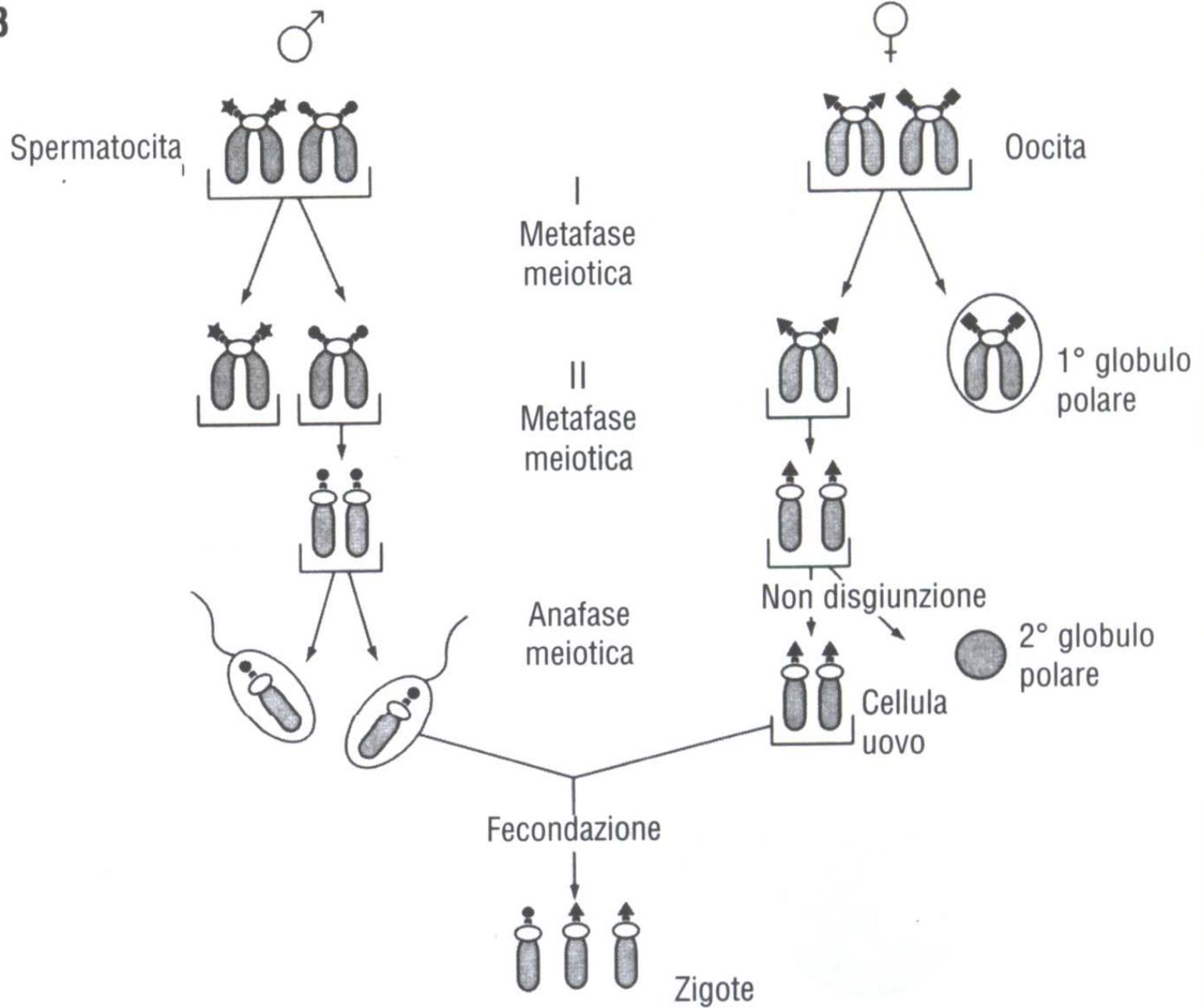
- ∞ **NON-DISGIUNZIONE**: incapacità di cromosomi separati di appaiarsi durante la prima divisione meiotica, o dei cromatidi fratelli appaiati di separarsi nella seconda divisione meiotica. I due cromosomi o cromatidi congiunti migrano ad un polo e vengono inclusi in una sola cellula figlia, mentre l'altra avrà materiale genetico in meno
- ∞ **RITARDO ANAFASICO**: ritardata migrazione del cromosoma durante l'anafase, conseguente perdita del cromosoma. Mancata incorporazione di un cromosoma nel nucleo di una delle cellule figlie.

# Non disgiunzione I



# Non disgiunzione II

B



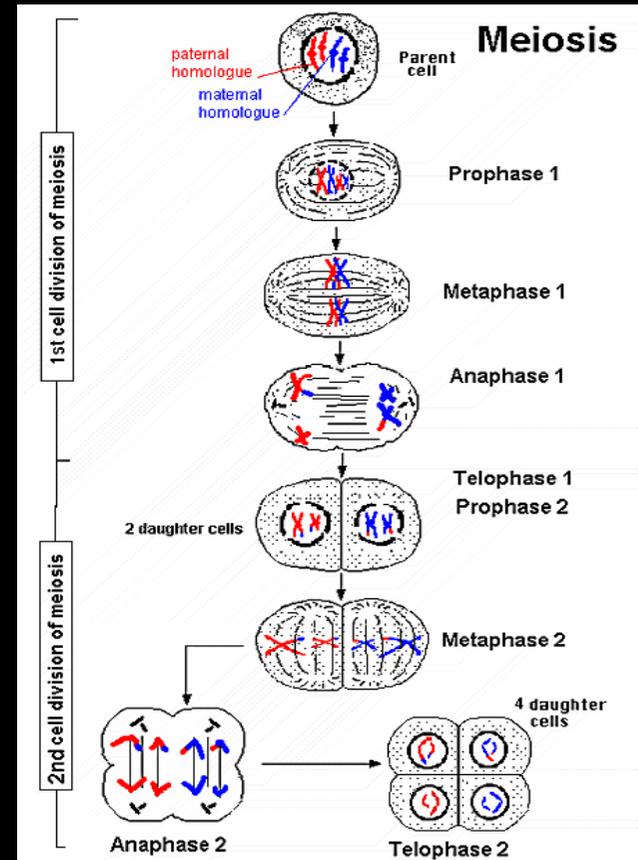
# La non disgiunzione

∞ Esistono fattori che influenzano la non disgiunzione ?

**Non ben conosciuti**

∞ Dove e quando avviene la non disgiunzione ?

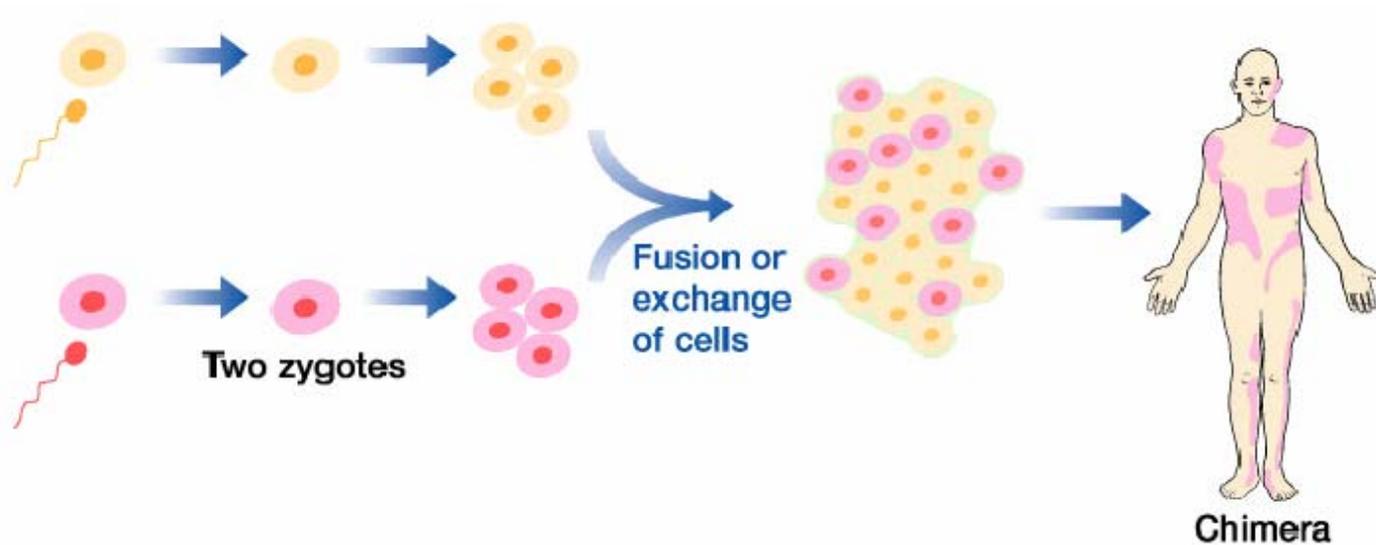
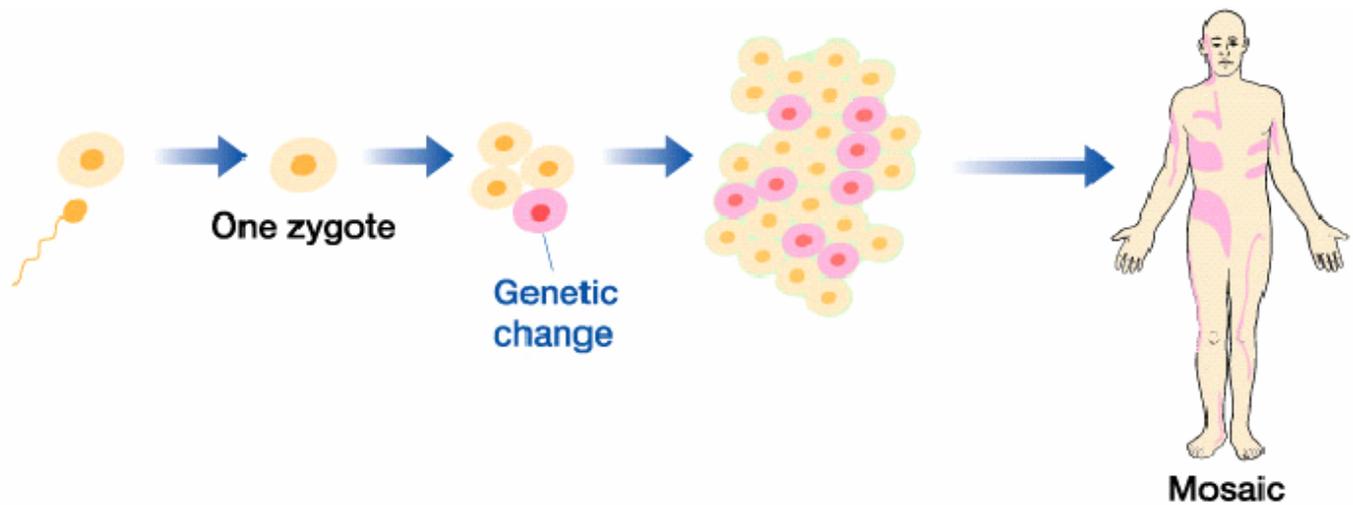
**Più frequentemente nella 1° meiosi materna**



# MIXOPLOIDIA

- ∞ **MOSAICISMO: due o più linee cellulari derivanti dallo stesso zigote**
- ∞ **CHIMERA: due o più linee cellulari diverse che originano da zigoti differenti**
- ∞ **Mosaicismo: non disgiunzione o ritardo cromosomico verificatisi in una delle divisioni mitotiche in fase embrionale precoce. Cellule monosomiche muoiono dopo poco tempo.**
- ∞ **La non disgiunzione mitotica è abbastanza improbabile, i mosaici umani diploidi/triploidi derivano dalla fusione del secondo globulo polare con uno dei nuclei in normale divisione di un normale zigote aploide**

# CHIMERE E MOSAICI



# **DIPLOIDIA UNIPARENTALE E DISOMIA UNIPARENTALE**

- ⌚ **La diploidia uniparentale impedisce lo sviluppo embrionale e la disomia uniparentale o la isodisomia uniparentale (due copie identiche di un unico cromosoma omologo) sono spesso causa di malattia**
- ⌚ **Disomia uniparentale o isodisomia uniparentale: derivano dalla perdita di una copia cromosomica extra-numeraria in uno zigote incompatibile con la vita, che restaura così il normale numero cromosomico.**

**ANOMALIE CROMOSOMICHE STRUTTURALI**  
Prevedono rotture cromosomiche

**SINGOLO EVENTO DI ROTTURA IN UN CROMOSOMA**

**DELEZIONE TERMINALE**

Il frammento acentrico viene perso

**DUE EVENTI DI ROTTURA IN UN CROMOSOMA**

**INVERSIONI**  
La regione tra i due punti di rottura è invertita

**DELEZIONE INTERSTIZIALE**  
La regione tra i due punti di rottura viene persa e le estremità cromosomiche si risaldano

**CROMOSOMA AD ANELLO**  
La regione tra i due punti di rottura forma un anello risultante dalla fusione delle due estremità telomeriche

**DUE EVENTI DI ROTTURA SU DUE CROMOSOMI DIFFERENTI**

**TRASLOCAZIONE RECIPROCA**  
Scambio bilanciato di frammenti acentrici

**TRASLOCAZIONE ROBERTSONIANA**  
Fusione dei frammenti centrici originati da cromosomi acrocentrici

**TRASLOCAZIONI INSERZIONALI**  
La regione compresa tra due punti di rottura di un cromosoma si salda con l'estremità di un terzo punto di rottura sul medesimo cromosoma o su un cromosoma differente

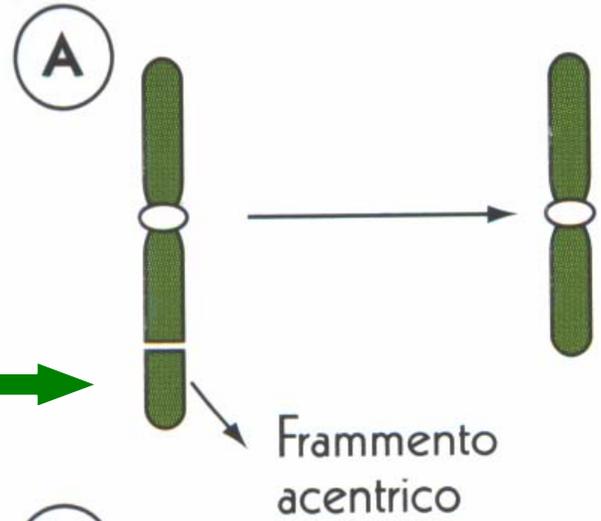
**TRE ROTTURE: ALMENO DUE SUL MEDESIMO CROMOSOMA**

# **ANOMALIE CROMOSOMICHE STRUTTURALI: RISULTATO DI ROTTURE CROMOSOMICHE**

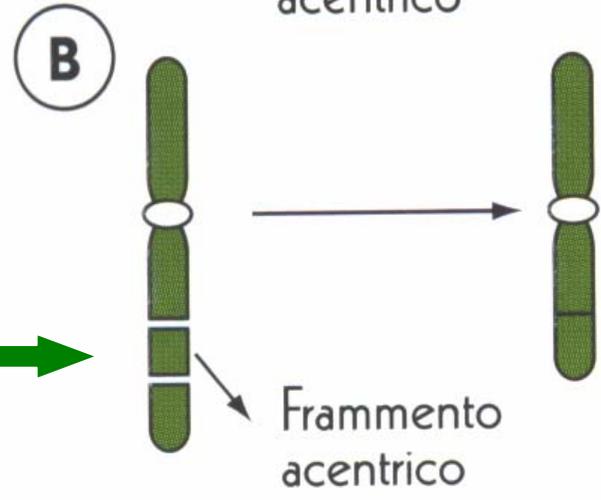
- ⌚ **Se un cromosoma si rompe in un unico punto, le sue estremità del punto di rottura vengono riunite da un enzima di riparazione**
- ⌚ **DELEZIONE TERMINALE: assenza di un telomero funzionale produce instabilità ed il cromosoma viene degradato**
- ⌚ **Rotture in più punti: gli enzimi di riparazione hanno difficoltà a riconoscere le diverse estremità danneggiate ed è possibile che si verifichino le aberrazioni cromosomiche strutturali**
- ⌚ **ANOMALIE CROMOSOMICHE BILANCIATE: se non c'è acquisizione o perdita netta di materiale cromosomico**
- ⌚ **ANOMALIE CROMOSOMICHE SBILANCIATE: se c'è acquisizione o perdita netta di materiale cromosomico**

# DELEZIONI TERMINALI E INTERSTIZIALI

Delezione terminale



Delezione interstiziale



# Delezioni

## ∞ **Terminali**

∞ Cri du chat, 5p15

∞ Wolf-Hirschhorn, 4p36

# Interstiziali

∞ Williams, 7q11.2,

- microdelezioni (FISH)

∞ Retinoblastoma, 13q14

∞ Prader-Willi, 15q11.2

∞ Angelman, 15q11.2

∞ DiGeorge, 22q11.2

# Cri du Chat

∞ Terminal deletion

- 5p15

∞ Cries like cat

∞ Mental retardation



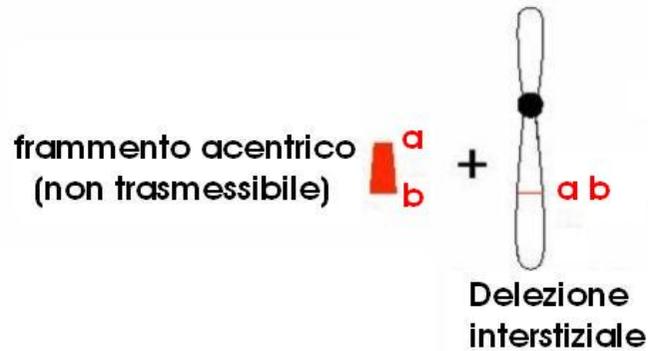
# Cri du Chat

- ⌚ Descritta per la prima volta nel 1963 da Lejeune, è una malattia genetica cromosomica dovuta alla delezione di una porzione variabile (5-40 Mb) del braccio corto del cromosoma 5 (5p-).
- ⌚ I segni clinici principali comprendono il pianto acuto monotono (da cui origina il nome della sindrome del "pianto del gatto"), la microcefalia, l'epicanto, la micrognazia, le anomalie dei dermatoglifi e il grave ritardo psicomotorio e mentale.
- ⌚ **L'incidenza varia tra 1/15.000 e 1/50.000 nati vivi.**
- ⌚ Alcuni studi di correlazione citogenetica-molecolare e genotipo-fenotipo nei pazienti iscritti nel Registro Italiano della sindrome hanno dimostrato variabilità clinica e eterogeneità citogenetica.
- ⌚ L'identificazione di sottogruppi di fenotipi associati a delezioni specifiche è rilevante ai fini diagnostici e prognostici, oltre ad essere utile per il trattamento riabilitativo. Sono stati stabiliti specifici diagrammi di sviluppo fisico e psicomotorio. Interventi precoci riabilitativi e educativi hanno migliorato la prognosi dei pazienti e sono stati ottenuti significativi progressi nella loro integrazione sociale.

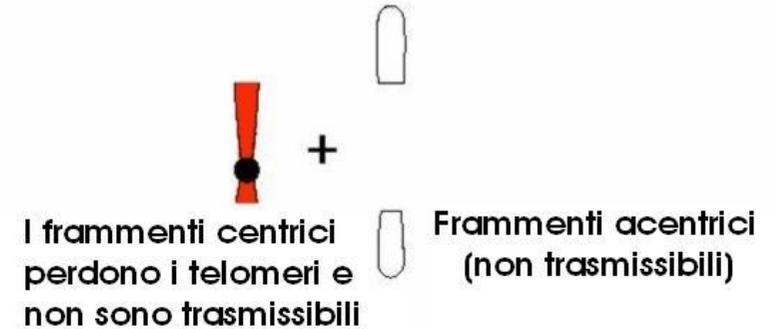
# Cri du Chat

Ω Due geni, potenzialmente coinvolti nello sviluppo cerebrale, la semaforina F (**SEMAF**) e la delta-catenina (**CTNND2**), sono stati mappati nelle regioni critiche e la loro delezione può essere associata a ritardo mentale nei pazienti con la sindrome. Anche la delezione del gene della transcriptasi inversa della telomerasi (**TERT**), localizzato su 5p15.33, potrebbe contribuire ai cambiamenti fenotipici dei pazienti.

# Cromosoma ad anello



## DELEZIONE INTERSTIZIALE

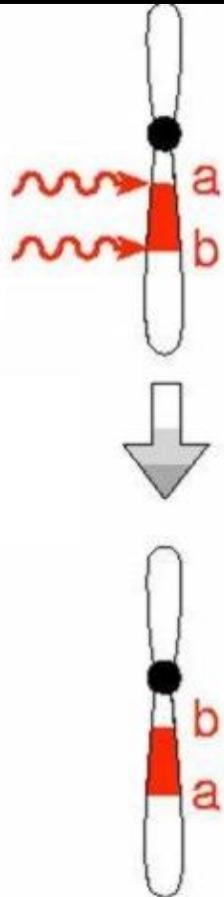


## CROMOSOMA AD ANELLO



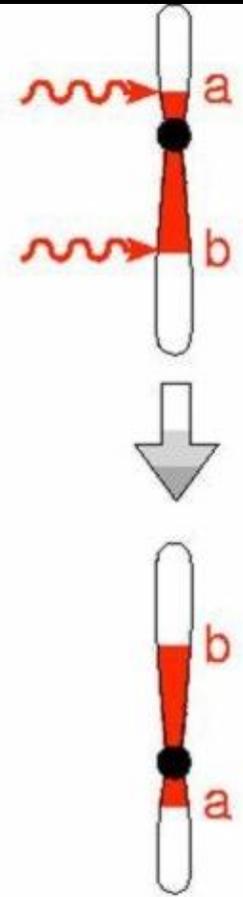
# INVERSIONI

Rotture sullo stesso  
braccio cromosomico



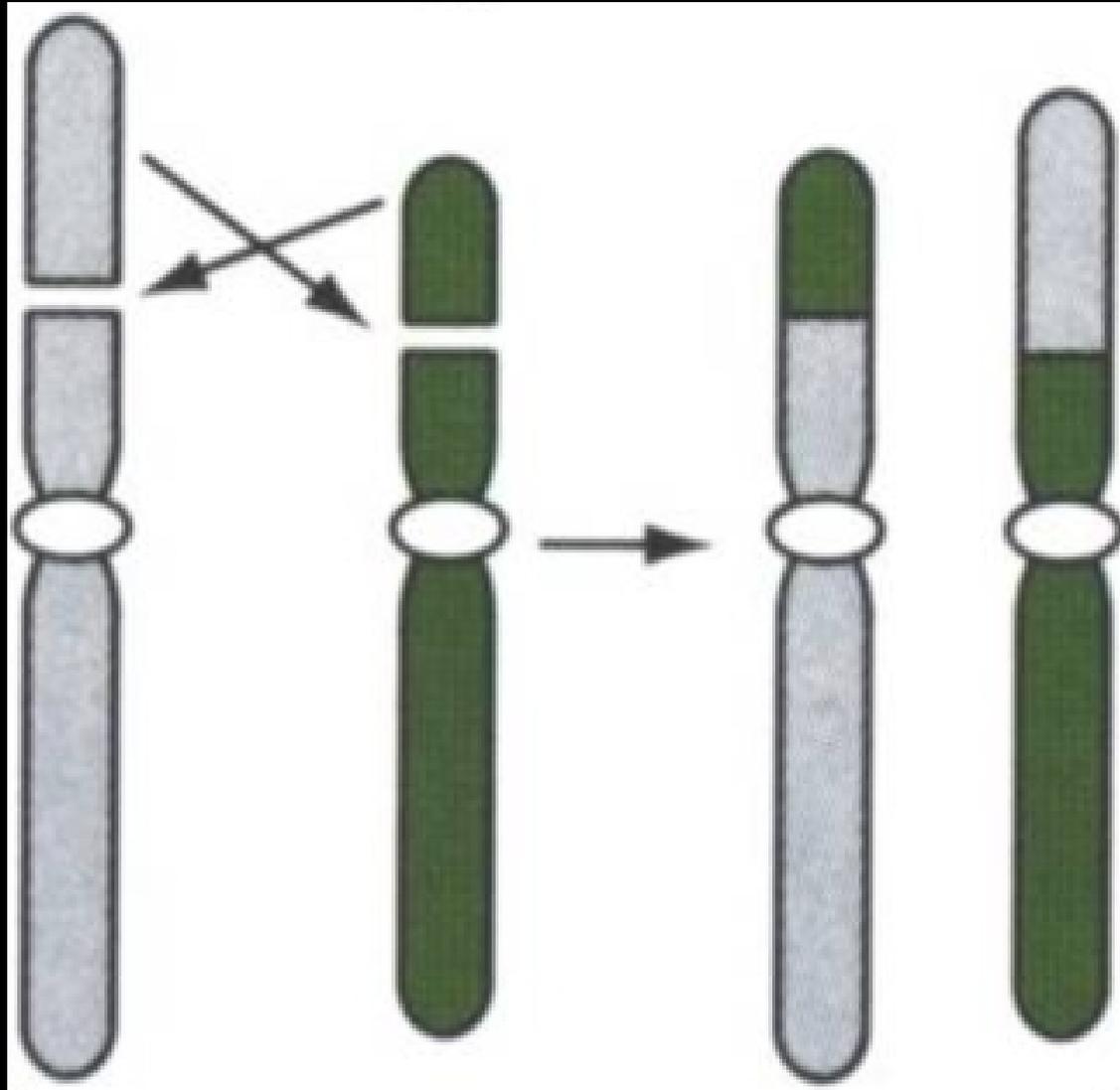
INVERSIONE  
PARACENTRICA

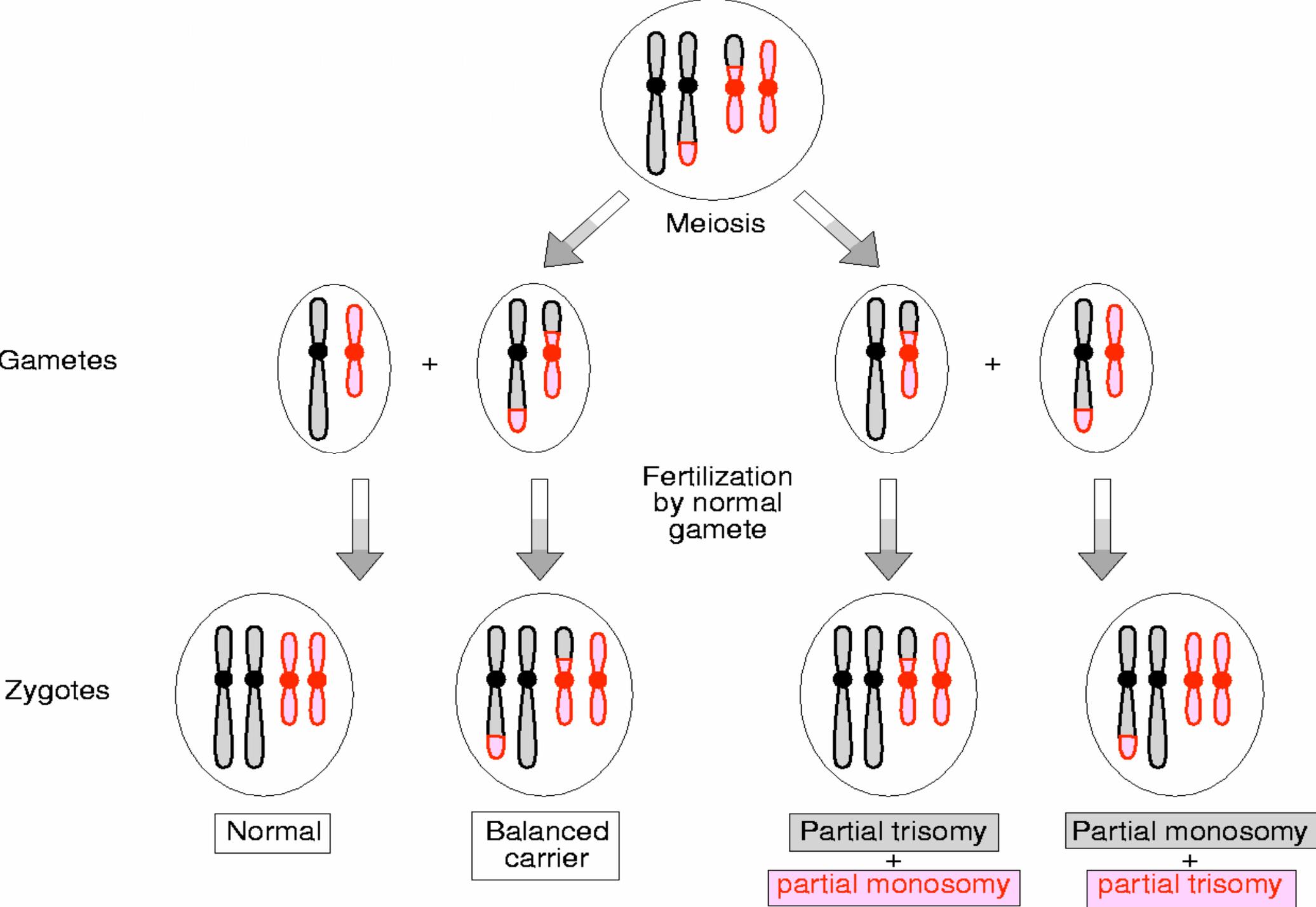
Rotture su bracci  
cromosomici differenti



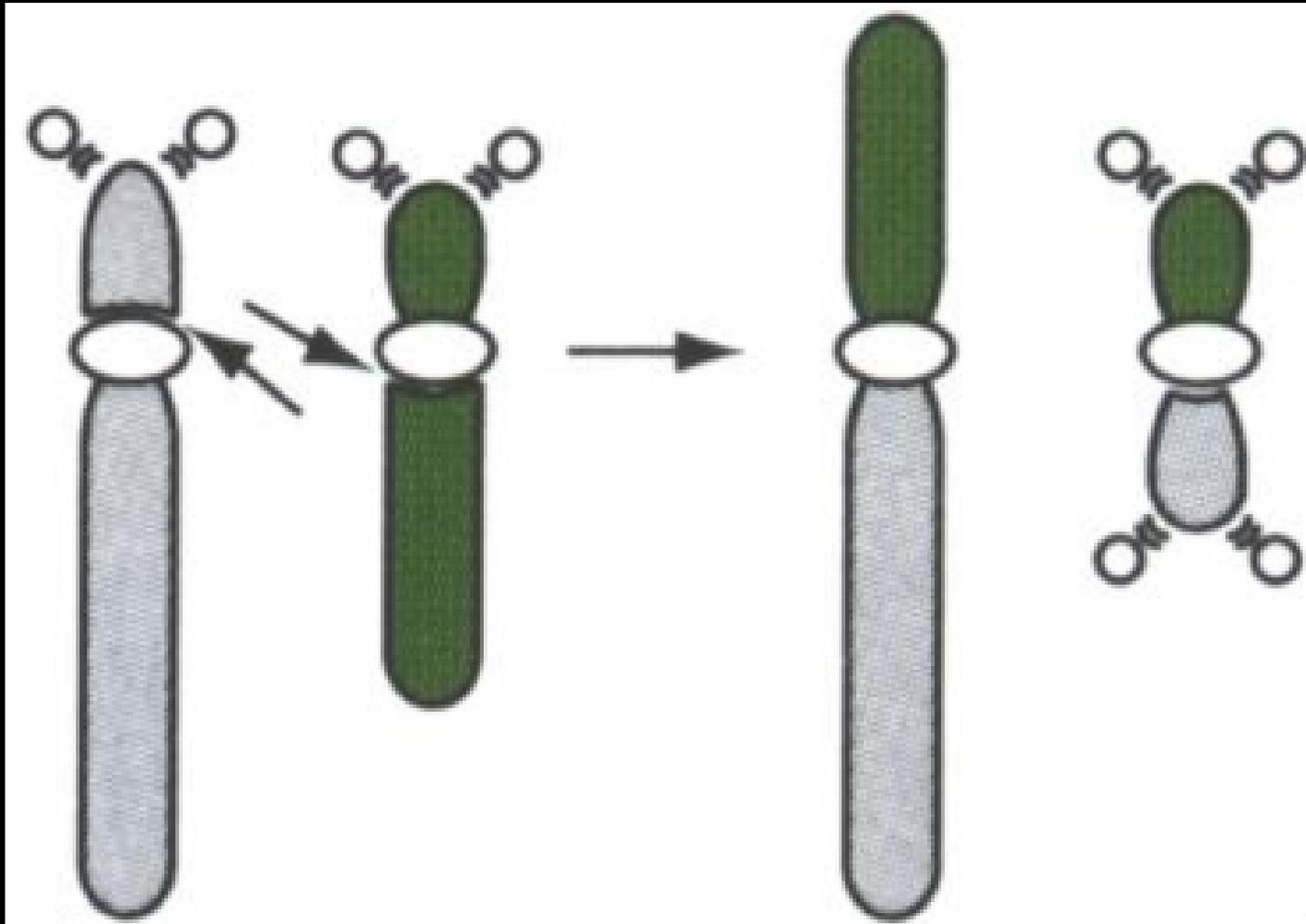
INVERSIONE  
PERICENTRICA

# TRASLOCAZIONE RECIPROCA



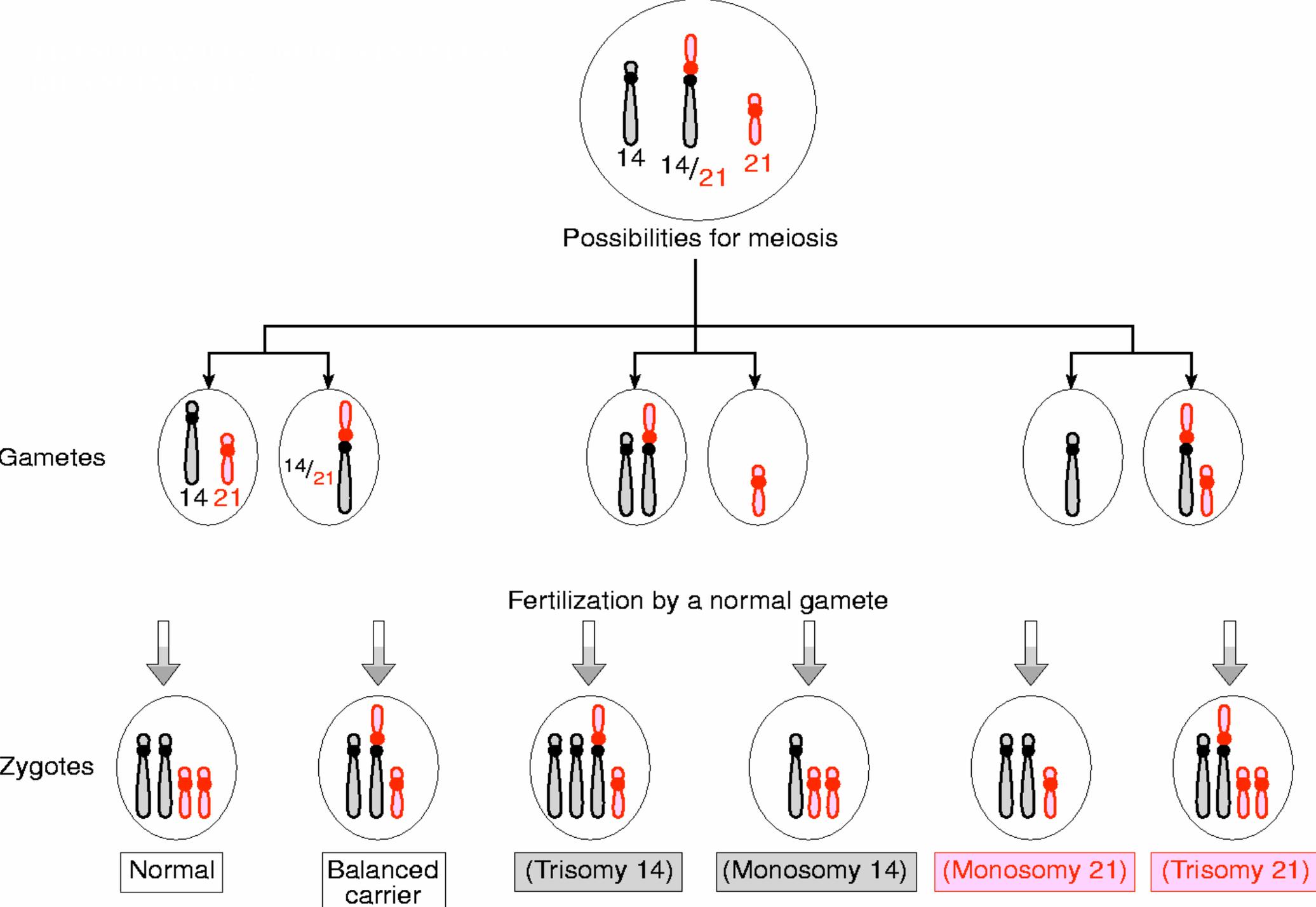


# TRASLOCAZIONE ROBERTSONIANA

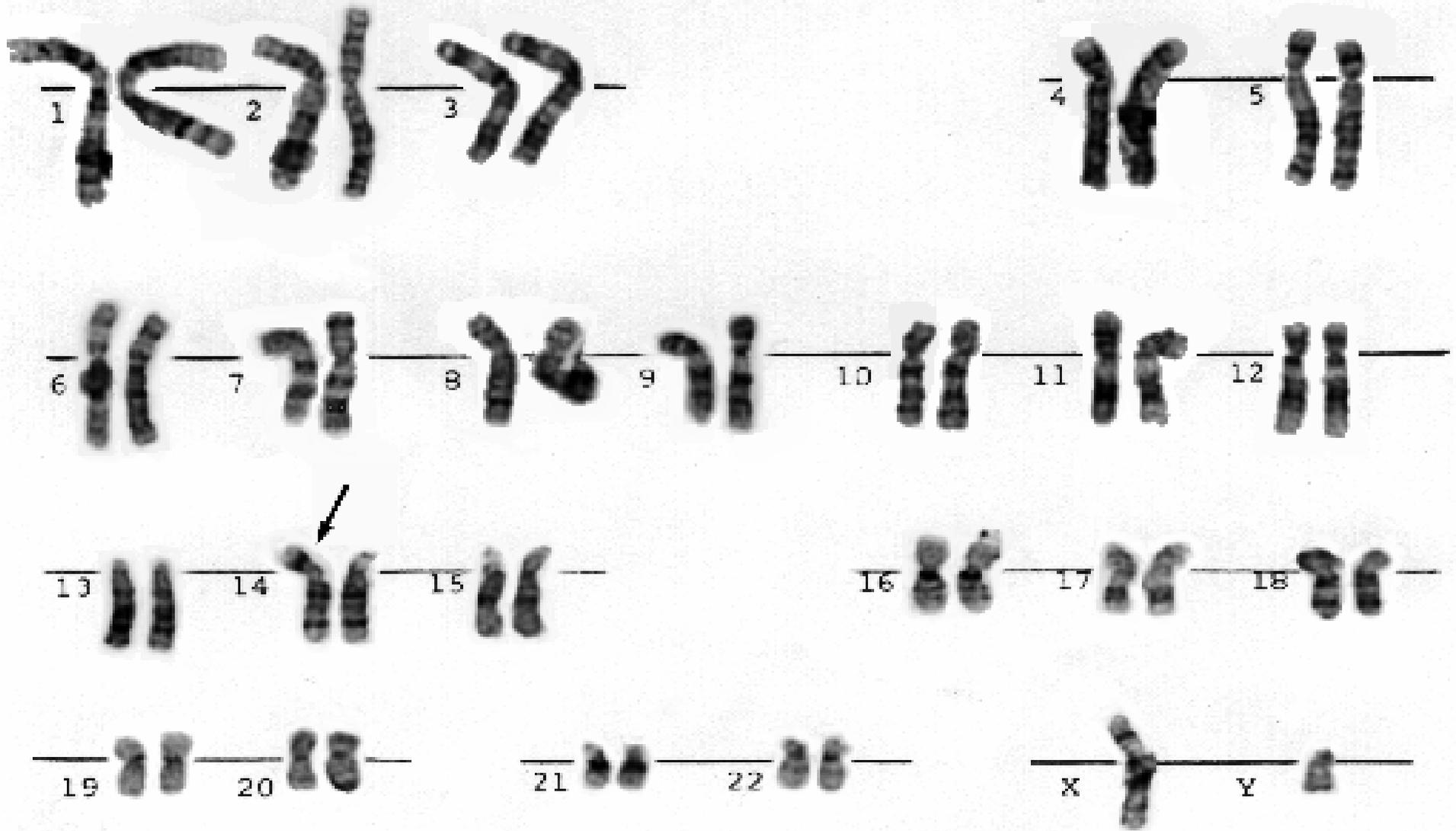


# TRASLOCAZIONE ROBERTSONIANA

- ∞ **Le traslocazioni robertsoniane sono il più frequente riarrangiamento (1 su 1000)**
- ∞ **Interessa i bracci lunghi dei cromosomi acrocentrici, il braccio corto viene perso**
- ∞ **I portatori hanno un cariotipo caratterizzato soltanto da 45 cromosomi**

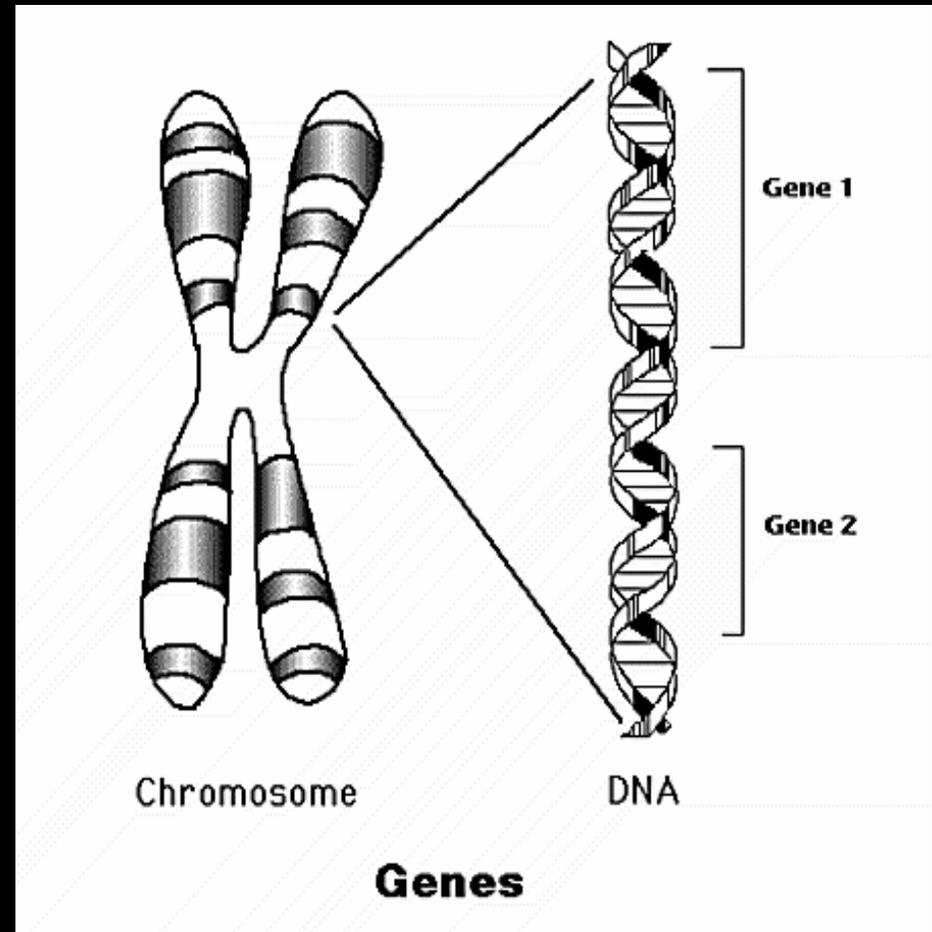


46,XY,-14,+t(14q21q)



# Gravità delle anomalie cromosomiche

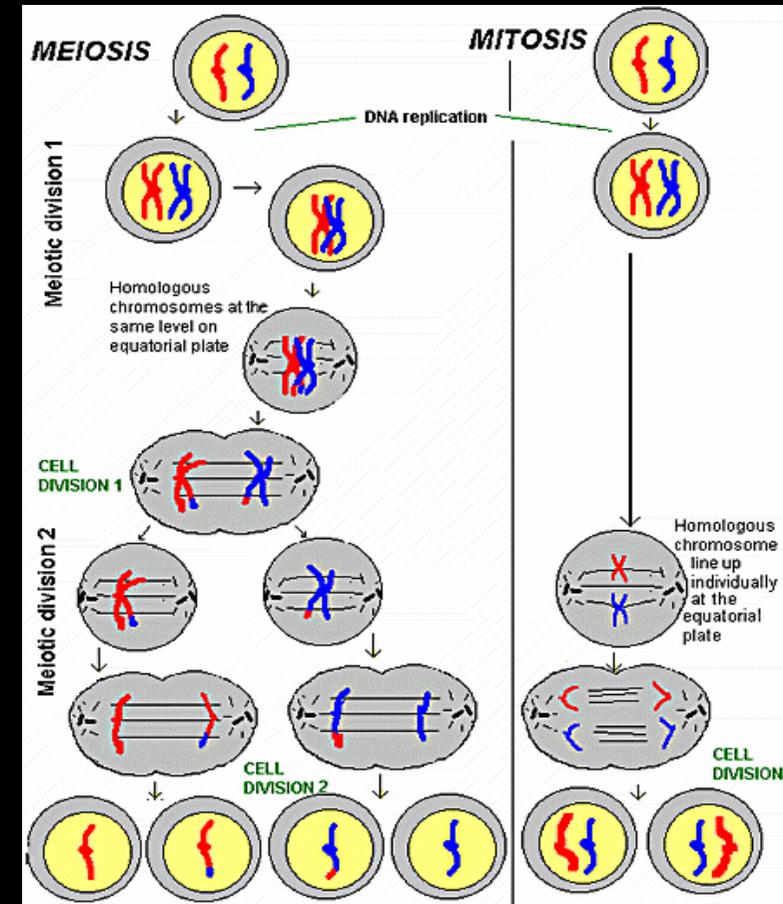
- ⌚ La gravità è correlata al tipo di cromosoma e alla quantità di geni interessati
- ⌚ Tanto più grave è lo sbilanciamento cromosomico tanto più precoce sarà l'interruzione di gravidanza



# La frequenza delle anomalie cromosomiche è:

∞ **Direttamente correlata con l'età materna**

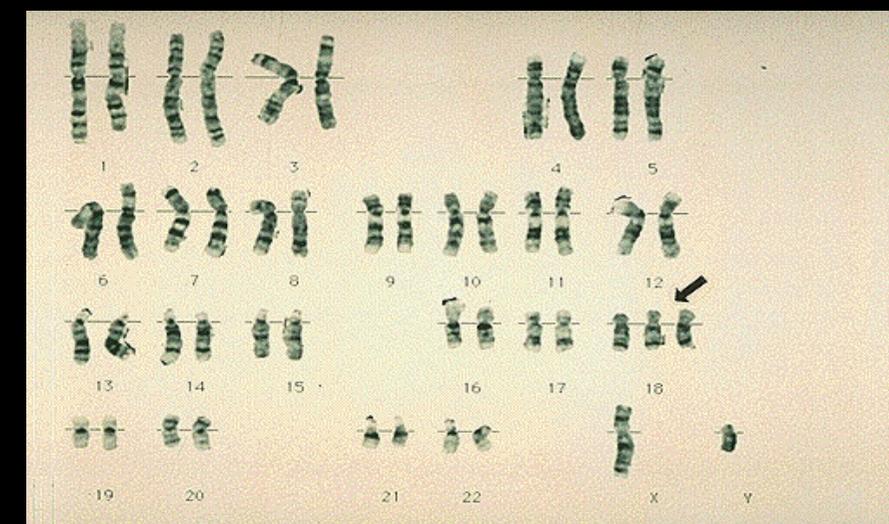
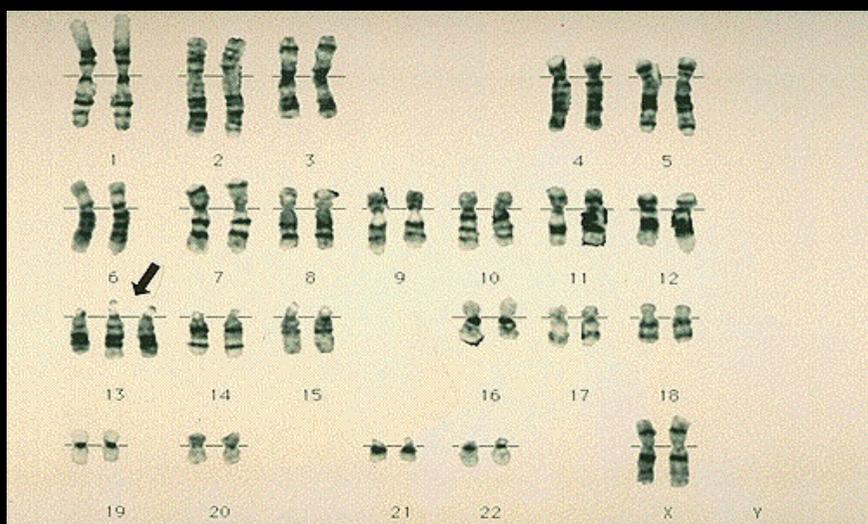
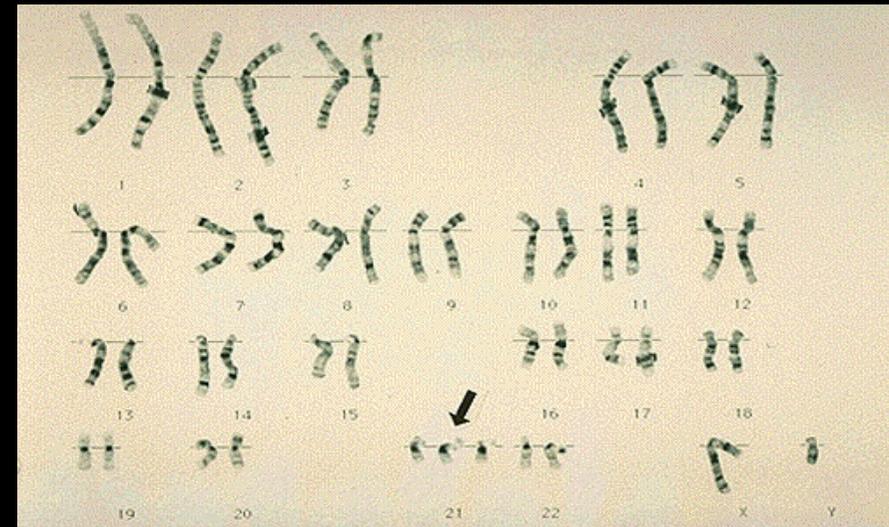
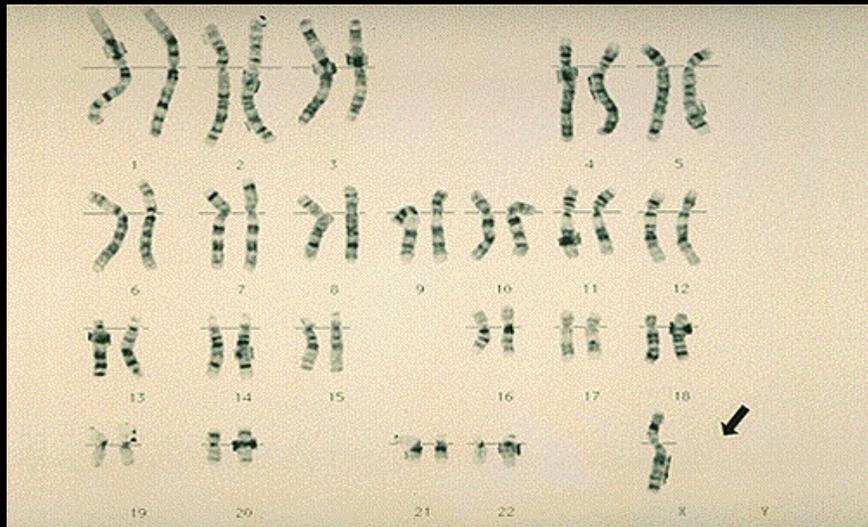
∞ **Inversamente correlata con l'epoca gestazionale**



# La frequenza delle anomalie cromosomiche alla nascita è 0.65%

∩ Trisomie	+21	0.12%	1 su 833
	+18	0.013%	
	+13	0.004%	
∩ Monosomie	45,X	0.024%	
∩ Tr. bilanciate		0.2%	1 su 500
∩ Tr. sbilanciate		0.05%	

# Aneuploidie più frequenti alla nascita

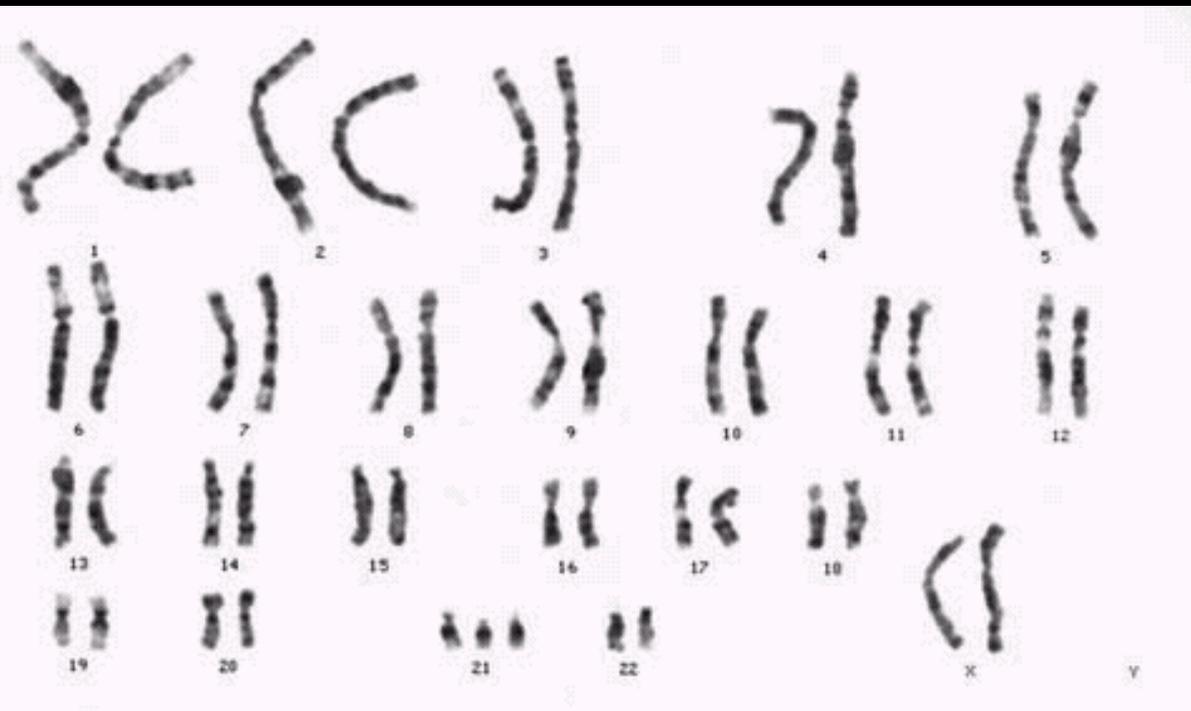


# Malattie dovute ad aberrazioni cromosomiche.



## 1. ANEUPLOIDIE (anomalie numeriche)

- sindrome di Down
- sindrome di Patau (cr.13)
- sindrome di Edwards (cr.18)
- sindrome di Klinefelter
- sindrome di Turner



# Sindrome di Down (trisomia21) – storia

**1859-1869 John Langdon Down**

(Earlswood Asylum for Idiots at Redhill in Surrey)

Paper “Observations on an ethnic classification of idiots” (1866)

*...their resemblance to each other was such that, when placed side by side, it is difficult to believe that they are not the children of the same parents....*

## Descrizione della sindrome come familiare

Down credeva che questi bambini fossero un ritorno ad una razza primitiva (specificamente Mongoli) = mongolismo.

**1965**

**I Mongoli hanno chiesto e ottenuti che il termine fosse abbandonato**



# Jerome Lejeune

(1926-1994).

⌚ il dottor Jerome Lejeune nel 1959, a soli 33 anni, ha pubblicato la scoperta della causa della sindrome di Down, la trisomia 21, per questo è considerato uno dei padri della genetica moderna.

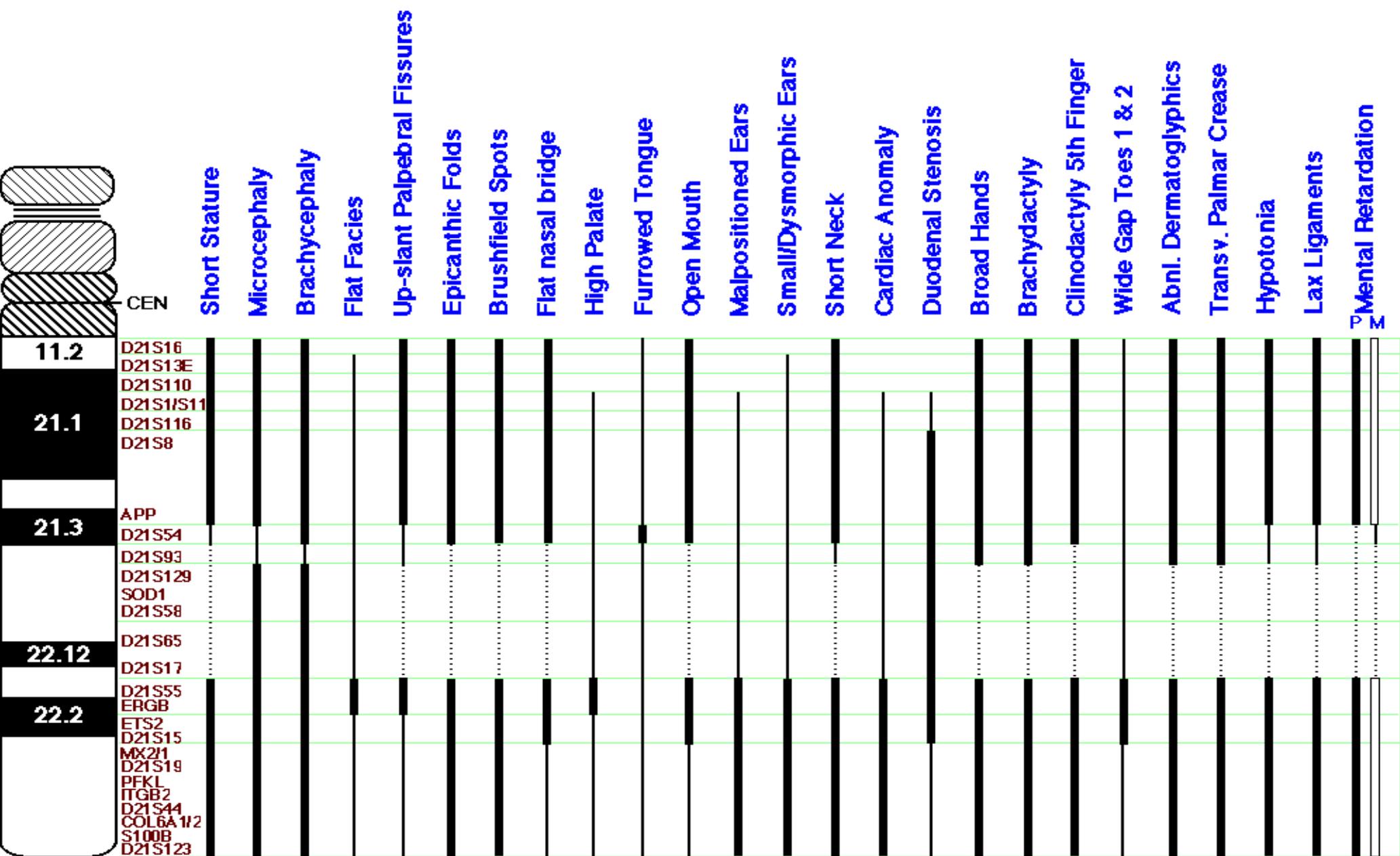
# **SINDROME DI DOWN O TRISOMIA 21**

La SD si associa sovente a complicanze malformative che richiedono interventi chirurgici rilevanti nel corso dei primi anni di vita:

- il 50% presenta malformazioni cardiache,
- il 30% stenosi duodenale,
- l'1% atresia esofagea,
- il 2% malformazioni anorettali.
- La chirurgia oftalmica è richiesta nel 12% dei casi per problemi di cataratta.

Oltre alle malformazioni congenite descritte, il soggetto con SD ha la tendenza a sviluppare patologie secondarie per deficit nel sistema immunitario con particolare predisposizione ad infezioni batteriche; nell'1% poi dei casi compare leucemia acuta. Nel corso della vita il soggetto Down tende anche a sviluppare ipotiroidismo e diabete mellito.

# Phenotypic Map of Down Syndrome



(from Korenberg et al, 1994, PNAS 91: 4997-5001)

# Geni e Sindrome di Down :

<b>Superoxide Dismutase (SOD1)</b>	<b>Invecchiamento precoce e influenzare il sistema immunitario (speculazioni dal ruolo di questo gene nell'Alzheimer)</b>
<b>COL6A1</b>	<b>Difetti cardiaci</b>
<b>ETS2</b>	<b>Anomalie scheletriche</b>
<b>CAF1A</b>	<b>Difetti di sintesi di DNA</b>
<b>Cystation Beta Synthase (CBS)</b>	<b>Difetti di riparo del DNA</b>
<b>DYRK</b>	<b>Ritardo mentale</b>
<b>CRYA1</b>	<b>cataratta</b>
<b>IFNAR</b>	<b>Sistema immunitario</b>



## Sindrome di Down.

TIPO DI ALTERAZIONE		FREQUENZA
<b>LIBERA</b>	47, +21	93 - 96%
<b>MOSAICISMO</b>	47, +21/46	2 - 4%
<b>TRASLOCAZIONI ROBERTSONIANE</b>	t(14;21)	2%
	t(21;21)	3%
	t(13;21)	3%
	t(15;21)	2%
	t(21;22)	1%
<b>ALTRE TRASLOCAZIONI DUPLICAZIONI INTERSTIZIALI</b>		< 1%
		<< 1%



## Sindrome di Down.

<b>ETA' MATERNA</b>	<b>TIPO DI ANOMALIA (in percentuale)</b>		
<b>ANNI</b>	<b>47, +21</b>	<b>MOSAICO</b>	<b>TRASLOCAZIONE</b>
<b>15 -19</b>	<b>85</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>20 - 24</b>	<b>90</b>	<b>1</b>	<b>9</b>
<b>25 -29</b>	<b>91</b>	<b>2</b>	<b>7</b>
<b>30 -34</b>	<b>93</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>34 - 40</b>	<b>97</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>oltre i 40</b>	<b>97</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

**La percentuale di bambini Down con Trisomia 21 libera aumenta progressivamente con l'aumentare dell'età materna al parto. In proporzione diminuisce la percentuale di bambini Down da traslocazione.**



## **ETÀ MATERNA      INCIDENZA**

<b>inferiore a 30anni</b>	<b>1 su 1500</b>
<b>30-34 anni</b>	<b>1 su 580</b>
<b>35-39 anni</b>	<b>1 su 280</b>
<b>40-44 anni</b>	<b>1 su 70</b>
<b>oltre 45 anni</b>	<b>1 su 38</b>

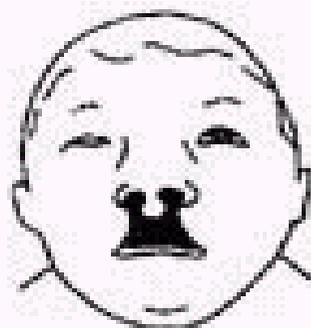
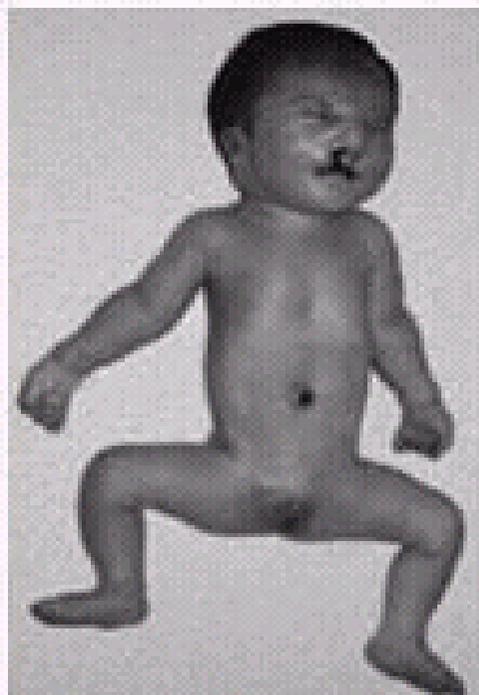
## Trisomy 13 syndrome

= Patau 症候群

脳奇形

口唇／口蓋裂

1/5000～6000



小・無眼球症、虹彩欠損、  
小頭症、無嗅腦症、  
耳介低位、両眼隔離、  
多指、心室中隔欠損、  
心房中隔欠損、囊胎腎、  
重複尿管、臍ヘルニア、  
停留辜丸、發育不全、  
精神発達遲滯、  
白血球核付属物、  
好中球過分葉

1 su 5000

## Trisomy 18 syndrome

= Edward 症候群

手指の重なり

女：男 = 3：1

1/3000～6000



弓状眉、両眼隔離、  
大泉門開大、後頭部突出、  
耳介変形、耳介低位、  
小顎、翼状頸、猿線、  
指の屈曲拘縮、胸骨短小、  
乳頭間開離、動脈管閉存、  
心室中隔欠損、馬蹄腎、  
重複尿管、Meckel 憩室、  
狭骨盤、停留辜丸、  
巨大陰核、筋緊張亢進、  
踵の後方突出、  
短り椅子状足、  
短小背屈第1趾、  
精神発達遲滯

1 su 3500

# SINDROME DI PATAU

Ω Alcune delle principali caratteristiche di questa sindrome sono: ritardo di crescita, grave ritardo mentale, malformazioni multiple: difetti cranio-facciali e malformazioni oculari, polidattilia (presenza di dita sovranumerarie), cardiopatia, anomalie renali, ecc. La sindrome di Patau comporta morte perinatale e solo eccezionalmente si ha il raggiungimento dell'età adulta. Inoltre, una considerevole percentuale degli embrioni e feti con trisomia 13 muore in vari momenti della gravidanza.

# Patau syndrome (trisomy 13)

- Ω sloping forehead,
- Ω Microcephaly
- Ω small or missing eyes
- Ω low set ears
- Ω cleft lip/cleft palate;
- Ω polydactyly;
- Ω abnormal genitalia;
- Ω spinal defects;
- Ω seizures;
- Ω gastrointestinal hernias
- Ω mental retardation (severe).

Only 30% survive 1 year

Only one adult  
is known to have survived  
to age 33.

Some may be able to understand  
words and phrases,  
follow simple commands



# Sindrome di Edwards

Ω I neonati affetti presentano grave ritardo di crescita (anche nel periodo prenatale), grave ritardo mentale, malformazioni multiple: micrognazia (mascella di dimensioni inferiori alla norma), occipite prominente, alterazioni degli arti, cardiopatia, anomalie renali. Alla sindrome sono associati moltissimi difetti che causano morte prematura

# Edwards syndrome (trisomy 18)

Ω 1/6000-8000 live birth (85% do not survive to term)

Ω mental retardation and delayed development

(100% of individuals),

seizures, and physical malformations

Ω Microcephaly

Ω small eyes, wide-set

5% survived

Ω epicanthal folds

to 1 year

Ω small lower jaw

Ω Heart - congenital heart defects (90%)

Ω Severe growth retardation,

clenched hands

with 2nd and 5th fingers on top of the others,

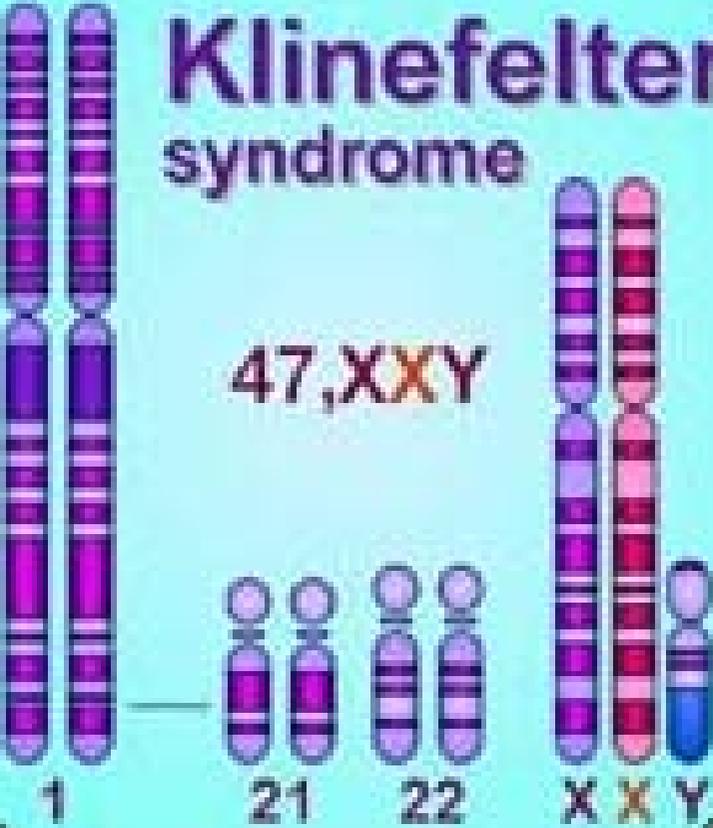
Ω Malformations of the digestive tract, the urinary tract, and genitals

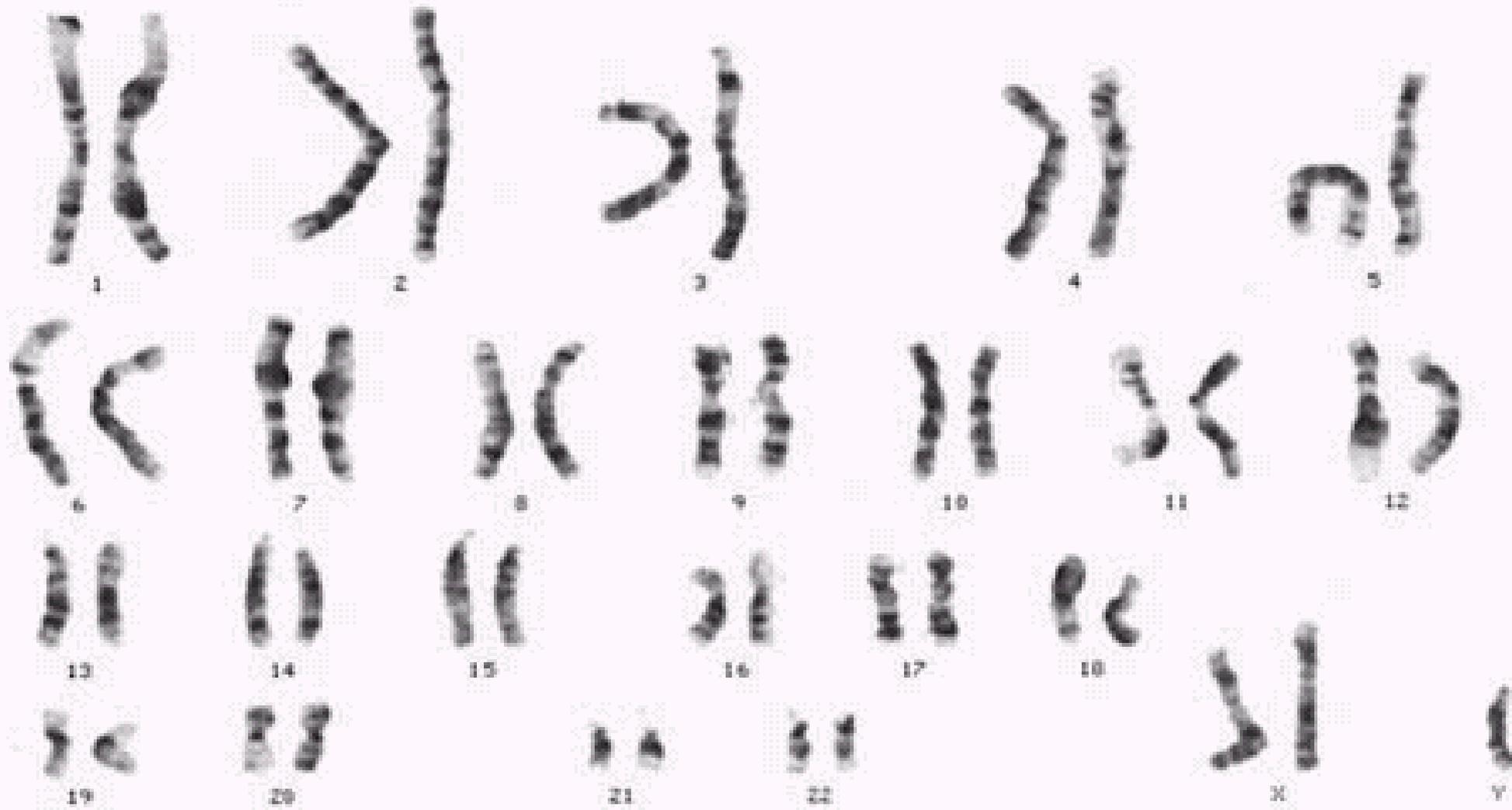




# Klinefelter syndrome

47,XXY







## Sindrome di Klinefelter.

- ♂ ginecomastia
- ♂ sproporzione degli arti
- ♂ ipogonadismo
- ♂ problemi di comportamento
- ♂ **Molti maschi XXY sono normali per aspetto e intelligenza e vengono individuati nel corso di indagini effettuate per la sterilità**

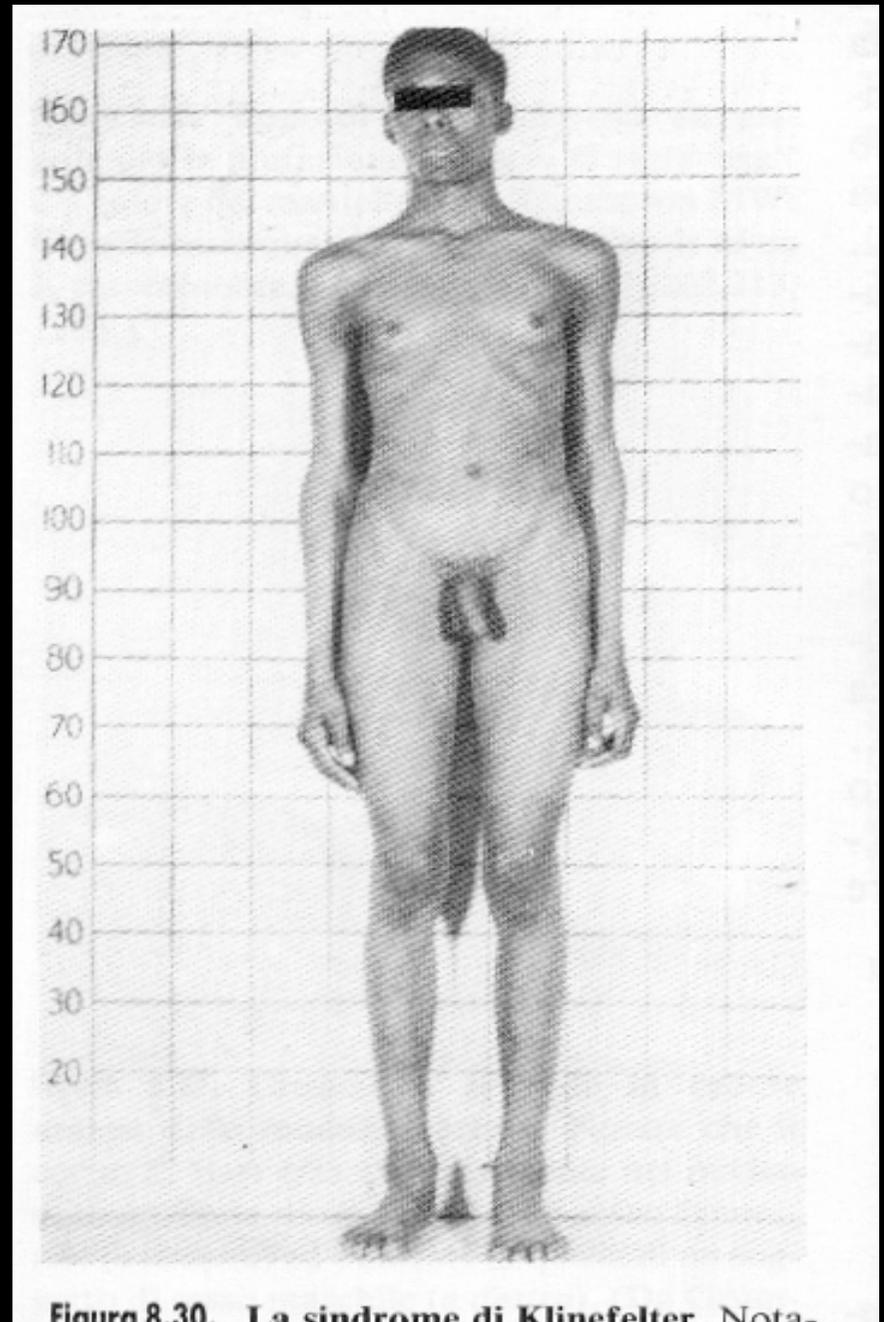
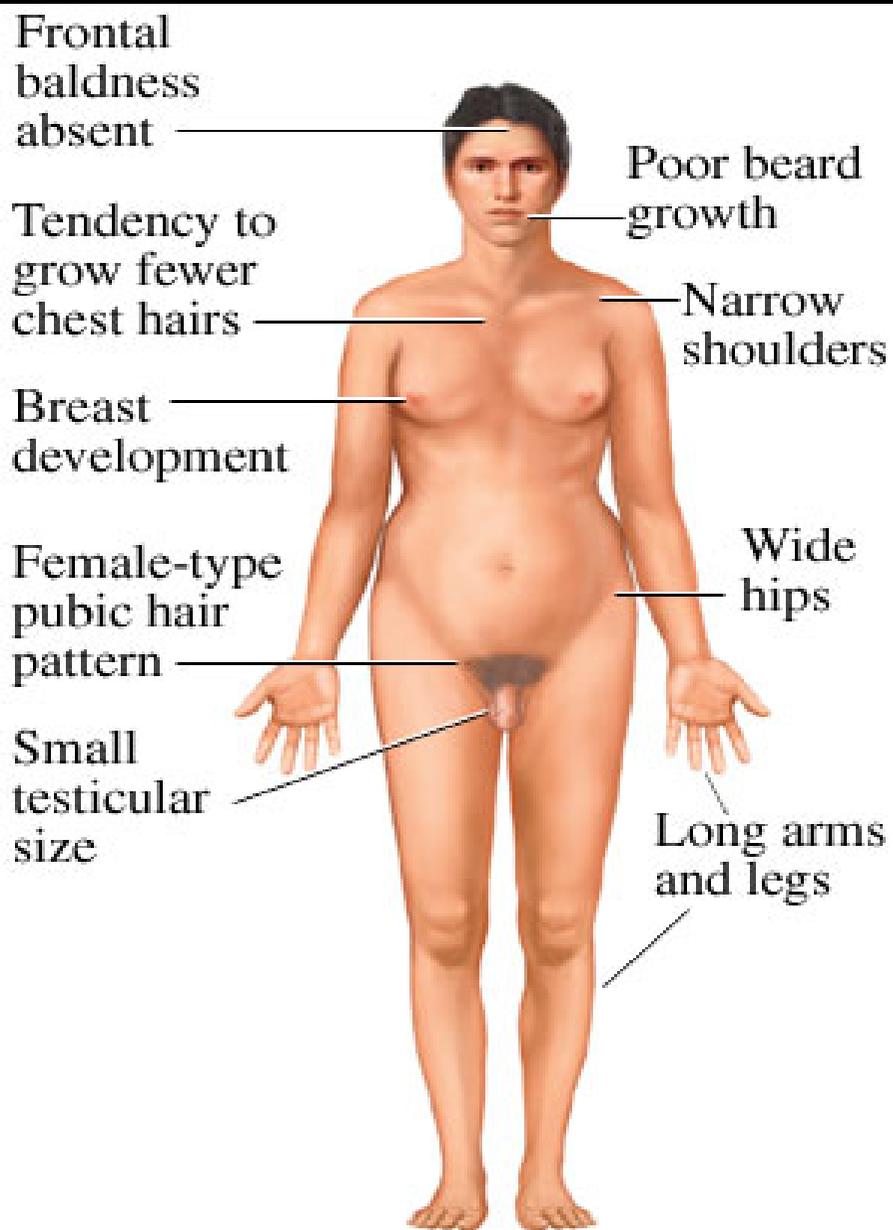


Figura 8.30. La sindrome di Klinefelter. Nota-

# 47, XXY – Klinefelter syndrome – or even 47, XXXY



## Gynecomastia –

Male with female features

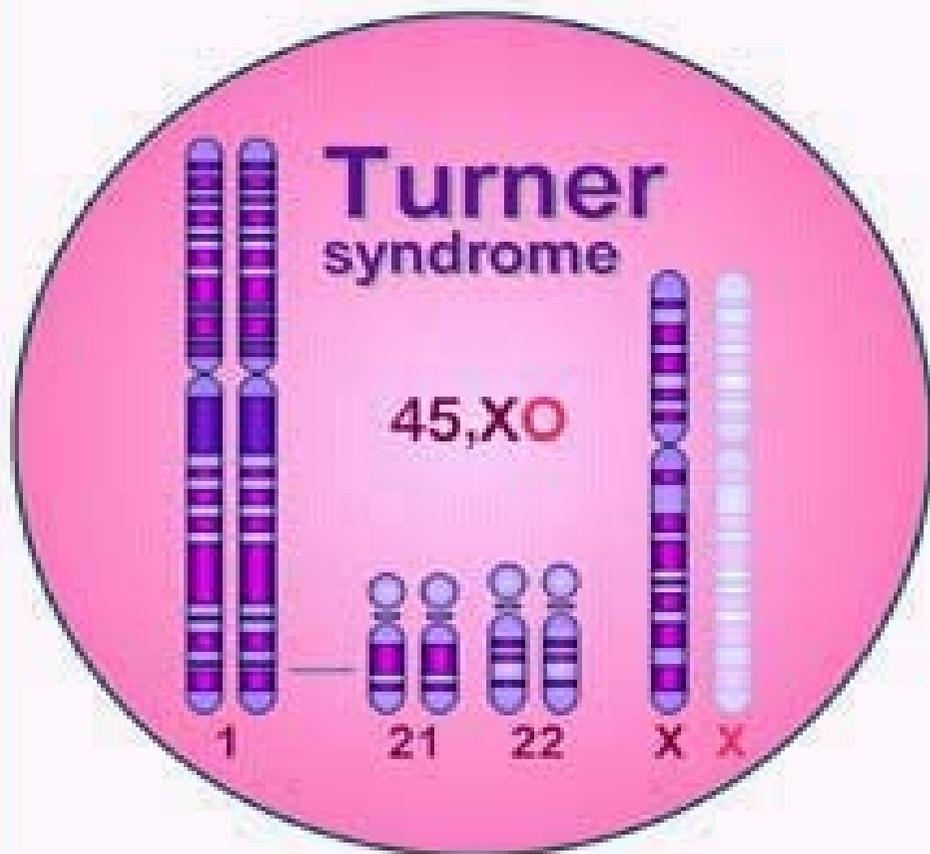
small testes,  
inability to produce sperm

## Mental retardation

is related directly to the number of supernumerary X chromosomes (-15 IQ unit per 1 extra X).

1 out of 500 or 1000 males;  
most go through life  
undiagnosed

40% of embryos survive to birth



著しい低身長  
 性腺機能低下  
 翼状頸  
 外反肘  
 橋状胸



小人症、スフィンクス様顔貌、  
 口角下垂、大動脈縮窄症、  
 乳頭間間離、爪形成不全、

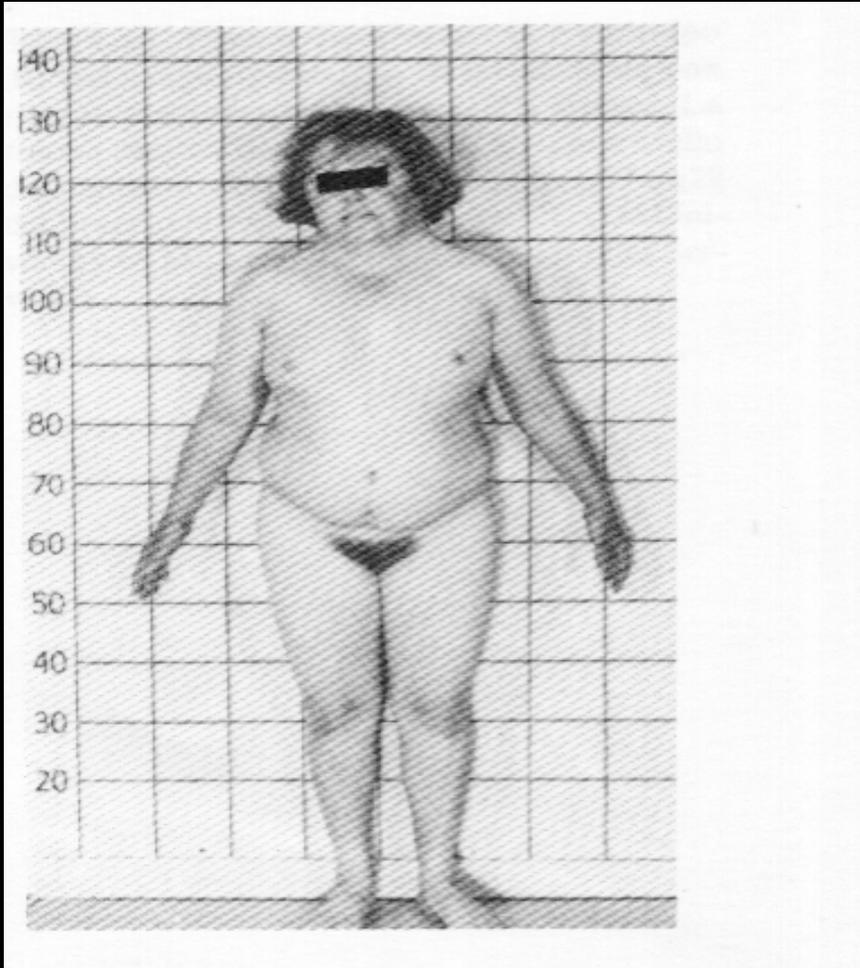
線維組織のみからなる性腺、  
 無月経、第二性徴の欠如、

多発性色素性母斑、  
 手背・足背のリンパ性浮腫、

尿中17ケトステロイド↓  
 尿中ゴナドトロピン↑、  
 尿中エストロゲン↓



# Sindrome di Turner.

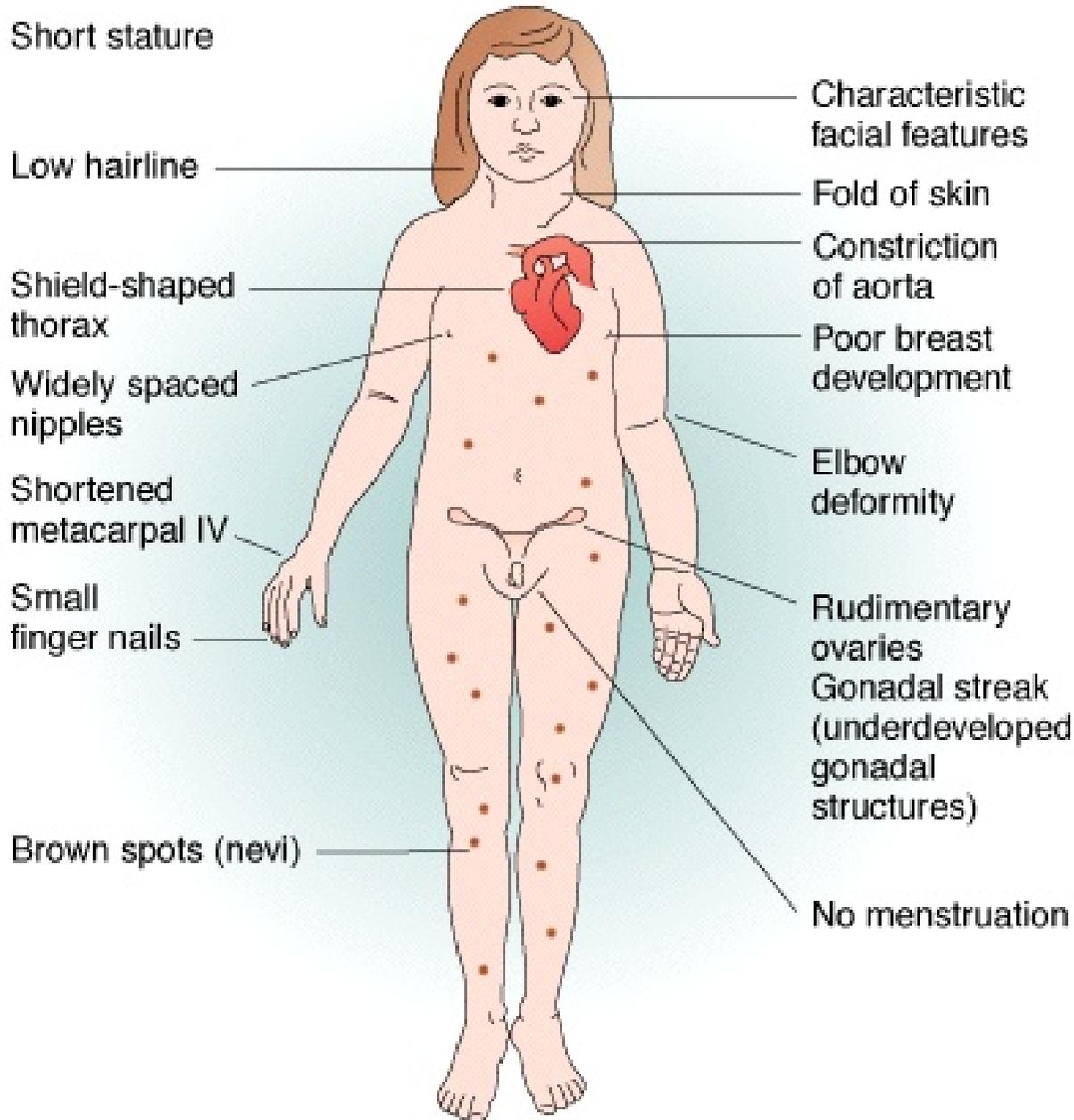


- ⌚ **bassa statura**
- ⌚ **pterygio del collo**
- ⌚ **torace a scudo**
- ⌚ **gomito valgo**
- ⌚ **mamelle iposviluppate**

# Sindrome di Turner.

⌚ **Caratteristiche principali della sindrome di Turner sono: linfedema periferico (mani e piedi gonfi a causa di stasi linfatica), pterigio del collo (collo corto "a tenda"), bassa statura, amenorrea primaria (mancata comparsa delle mestruazioni). Talvolta sono presenti anche cardiopatia, ipertensione e anomalie renali. Sia l'intelligenza sia l'attesa di vita sono normali.**

# 45, X0 – Turner syndromes



**99% of cases  
– aborted**

**Total fetal  
hydrops**

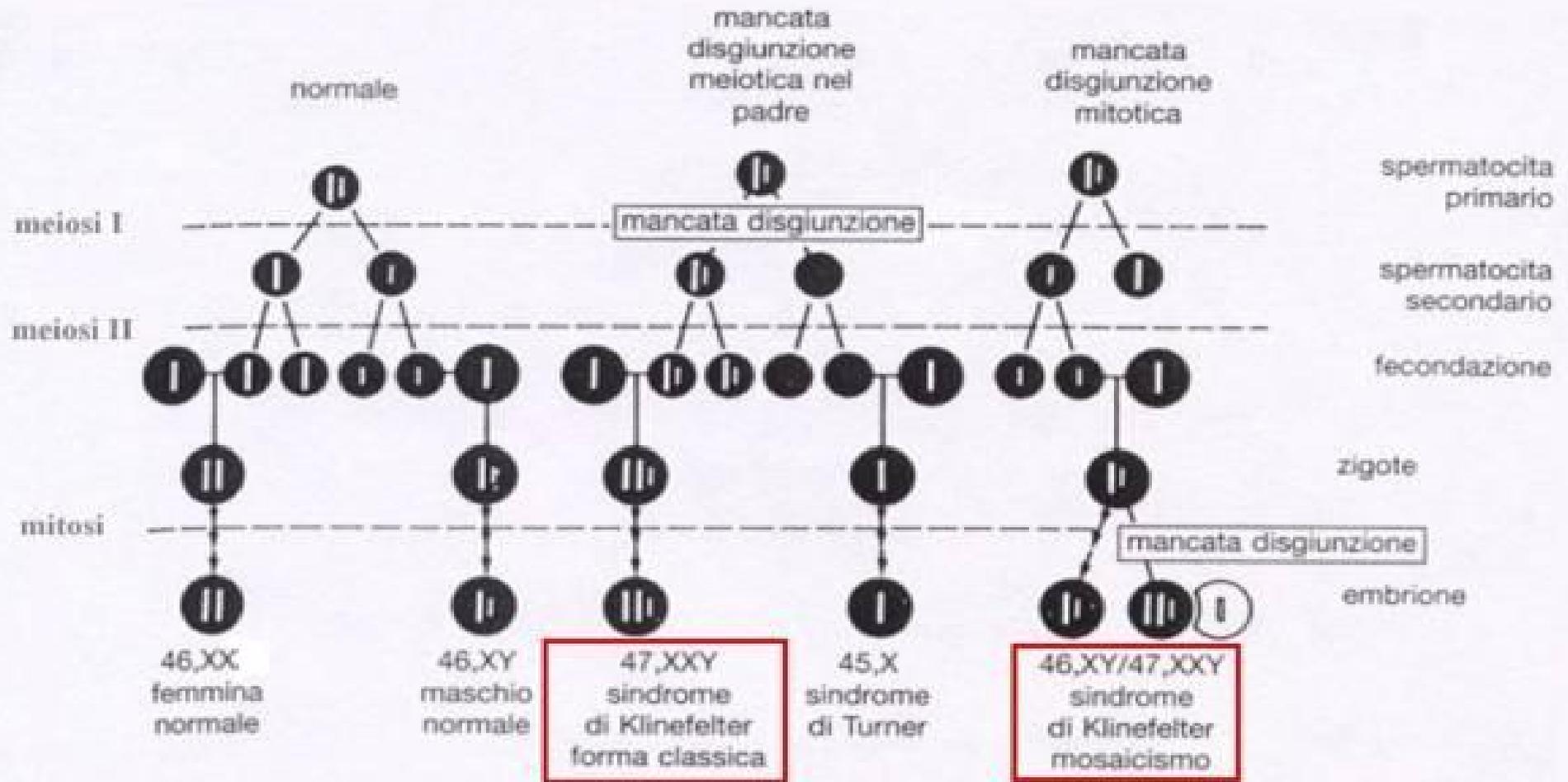


**1 in 2,500 or  
1 in 2,000  
liveborn females.**

**normal intelligence;  
may have 3D spatial problems  
or math problems.**



# Sindrome di Klinefelter.



# CITOGENETICA MOLECOLARE

**Abbina la possibilità di un'analisi mirata del DNA, propria delle tecniche di biologia molecolare, con la struttura cromosomica il cui studio è oggetto della citogenetica classica.**

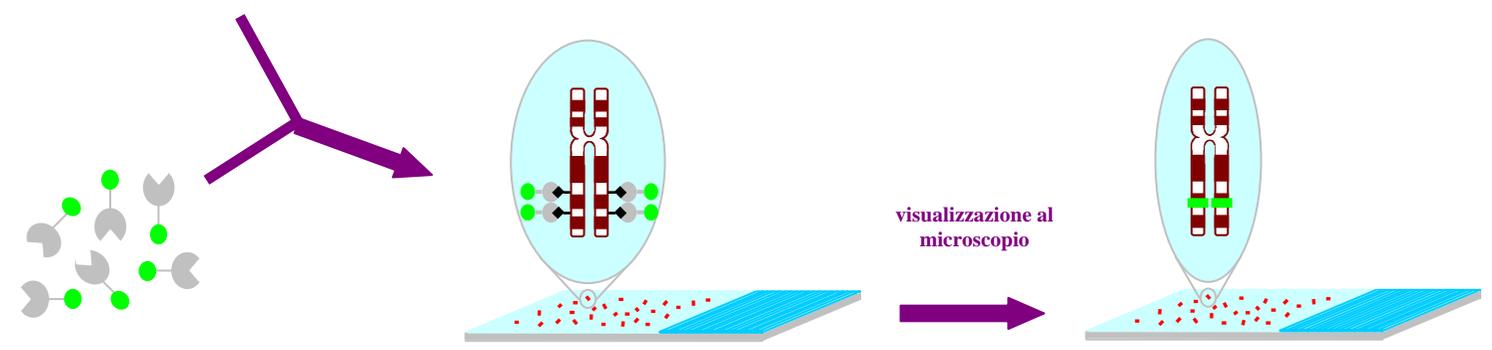
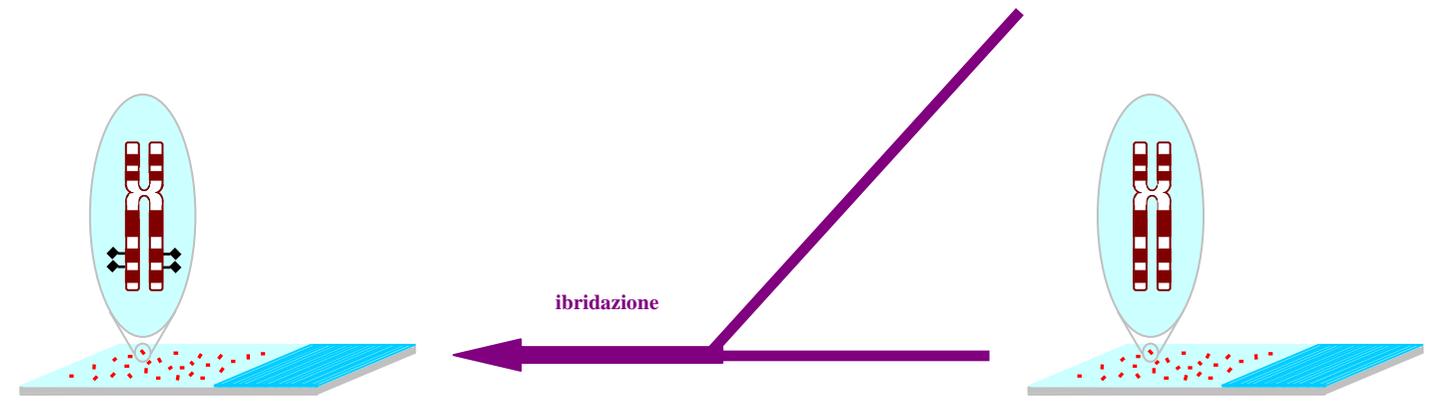
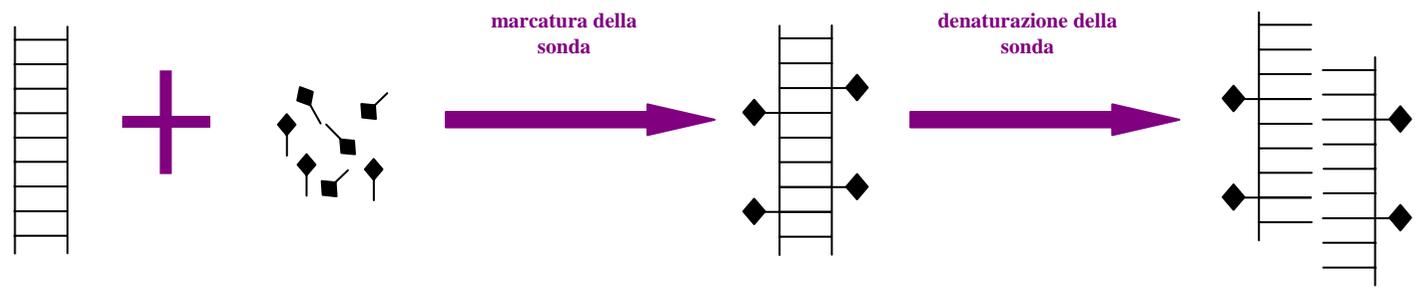
# Tecniche di citogenetica molecolare

- ∞ **FISH** (fluorescence in situ hybridization)
- ∞ **PRINS** (primed in situ labeling)
- ∞ **PCR *in situ*** (polymerase chain reaction *in situ*)
- ∞ **CGH array** (comparative genomic hybridization)
- ∞ **QF-PCR**

# **FISH**

## **(Fluorescence *in situ* hybridization)**

Ω **FISH è una tecnica di ibridazione che permette, dopo fissazione di metafasi e nuclei in interfase su vetrino, di identificare sequenze specifiche negli acidi nucleici. Tale identificazione avviene mediante sonde marcate in maniera non isotopica, impiegando fluorocromi che emettono a diverse lunghezze d'onda.**



Rappresentazione schematica dell'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH).

# TIPI DI SONDE

## Ω Sequenze ripetute:

- alfa satellite
- beta satellite
- satelliti classici
- telomeriche

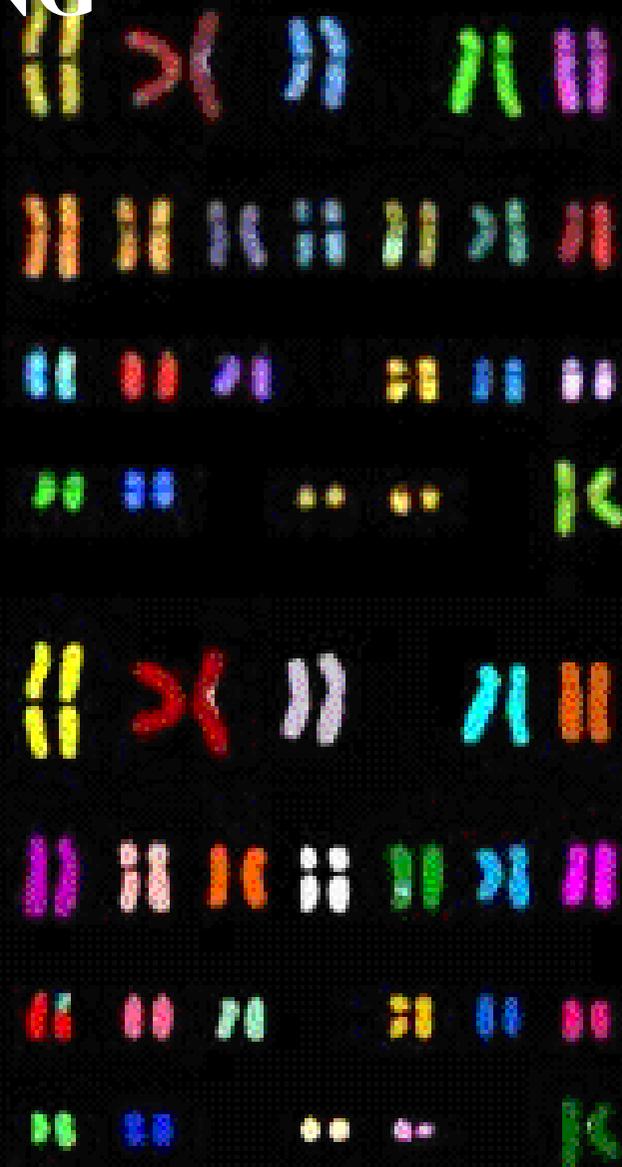
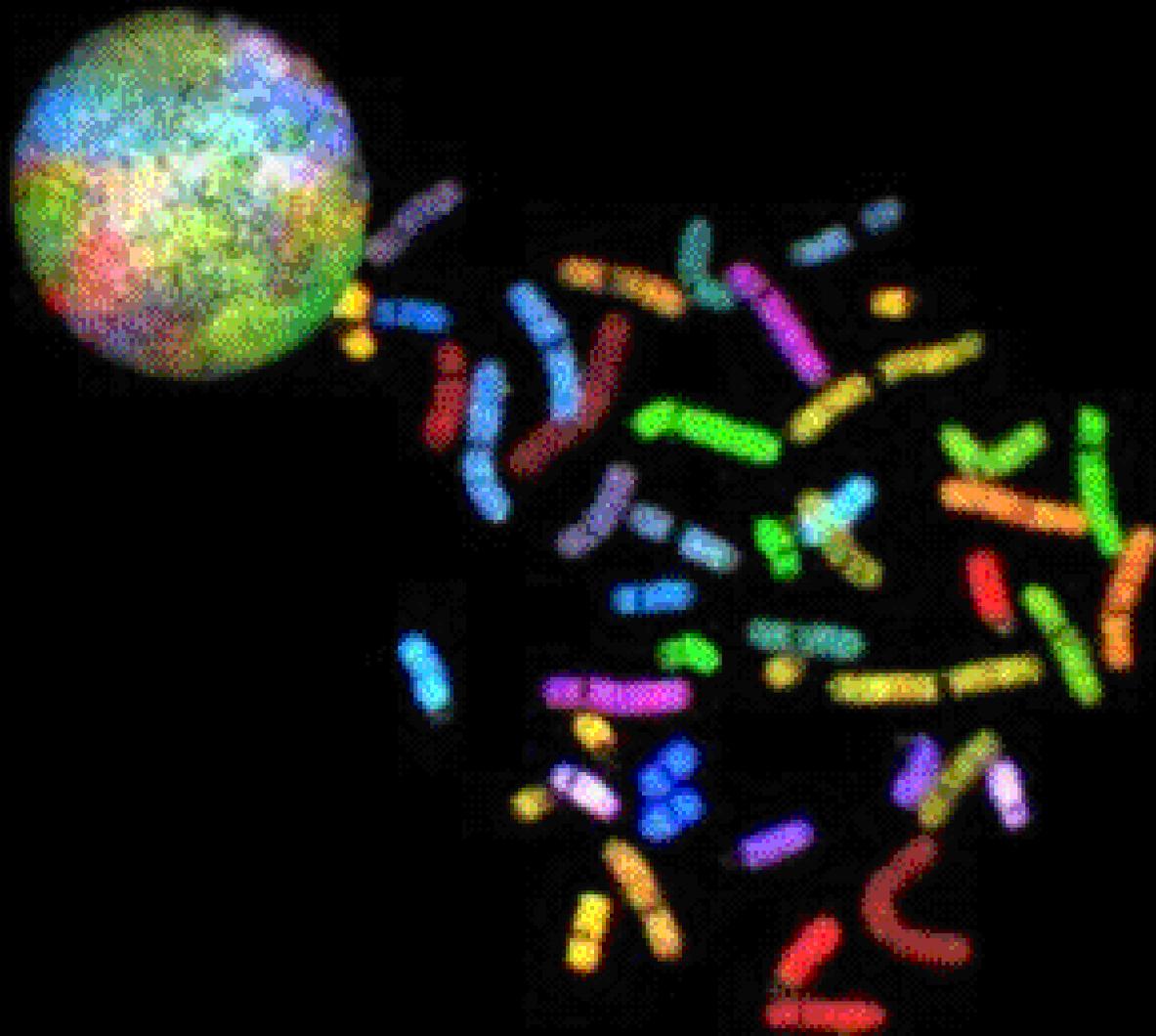
## Ω Sequenze uniche:

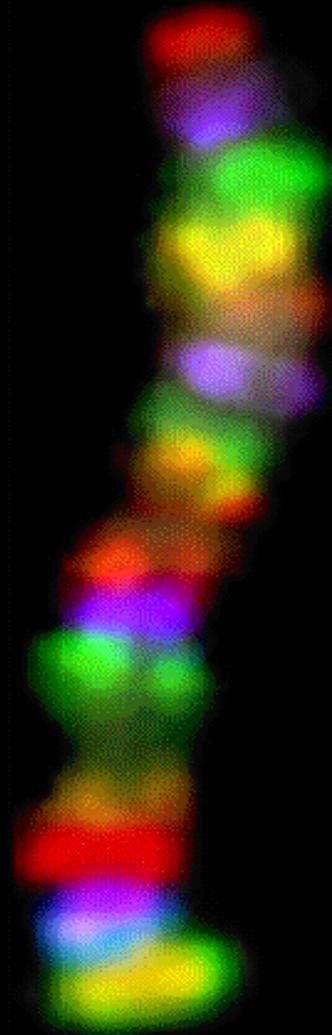
- DiGeorge
- Prader Willi
- Williams
- ecc.

## Ω Painting

<b>TIPI DI SONDE</b>	<b>ABERRAZIONI CROMOSOMICHE IDENTIFICABILI</b>	<b>MATERIALE IMPIEGATO</b>
<b>Sequenze ripetute</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Trisomie</b></li> <li>- <b>Monosomie</b></li> </ul>	<b>Nuclei in interfase</b>
<b>Painting</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Riarrangiamenti cromosomici</b></li> <li>- <b>Identificazione di cromosomi marcatori</b></li> </ul>	<b>Metafasi</b>
<b>Sequenze uniche</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Microdelezioni e duplicazioni</b></li> <li>- <b>Riarrangiamenti cromosomici</b></li> </ul>	<b>Metafasi e nuclei in interfase</b>

# CHROMOSOME PAINTING





	78E1	
	91A2	
	81G1	
	87G10	
	98D7	
	58C11	
	101C7	
	29F6	
	106H5	
	51H2	
	60D11	
	66E12	
	911D9	
	858H7	
	932F11	
	937A6	

# CHROMA TECHNOLOGY CORP

AN EMPLOYEE-OWNED COMPANY

PRODUCING THE WORLD'S FINEST OPTICAL FILTERS AND FLUORESCENCE FILTER SETS

# LA FISH IN DIAGNOSI PRENATALE

Ω **Da 15 ml di liquido amniotico**

**metafase:**

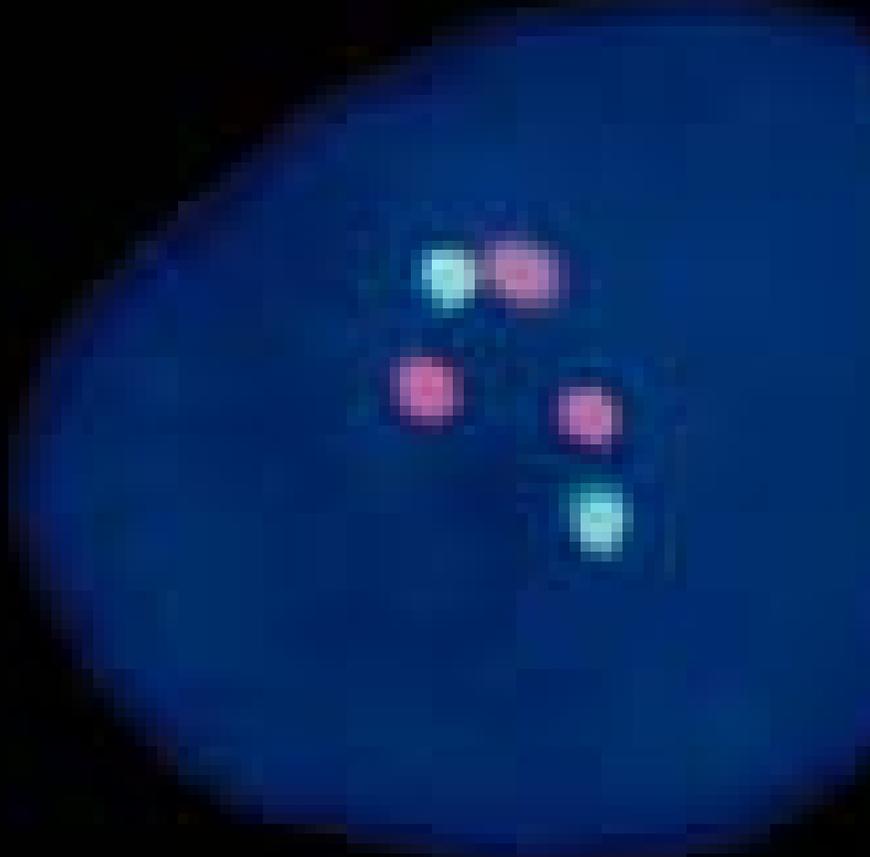
- Cariotipo
- FISH per diagnosi di microdelezioni
- FISH per diagnosi di riarrangiamenti cromosomici

Ω **Da 2 ml di liquido amniotico**

**nucleo:**

- FISH per diagnosi di sesso
- FISH per anomalie numeriche

# DIAGNOSI DI ANEUPLOIDIE



← Yp11.1-q11.1 CEP Y  
alpha satellite



← 21q22.13-q22.2 LSI 21



← Xp11.1-q11.1 CEP X



# SINDROME DI WILLIAMS

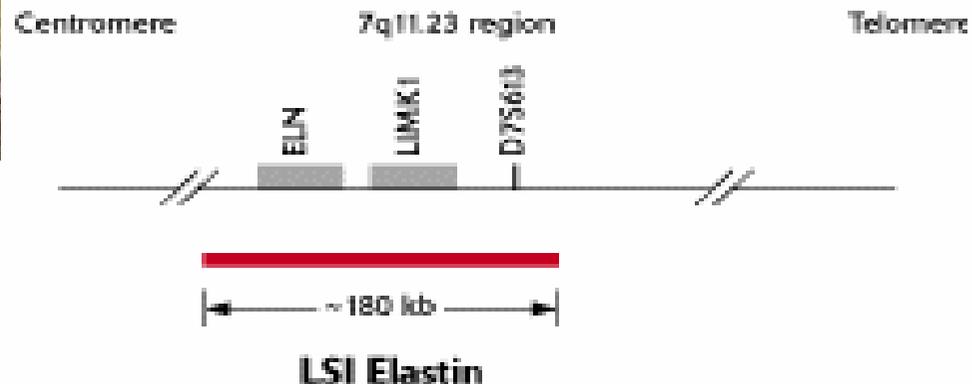


∞ faccia caratteristica

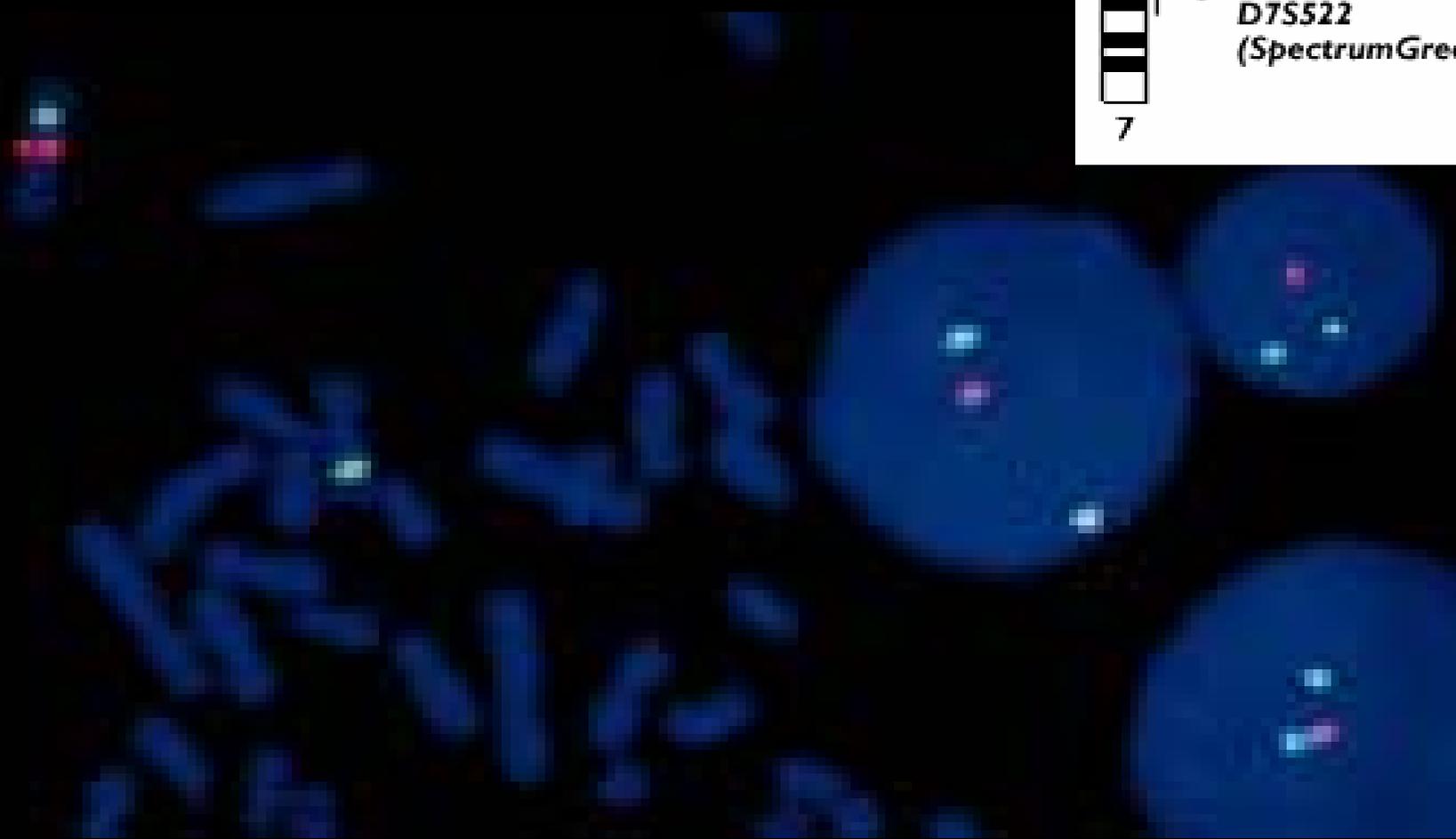
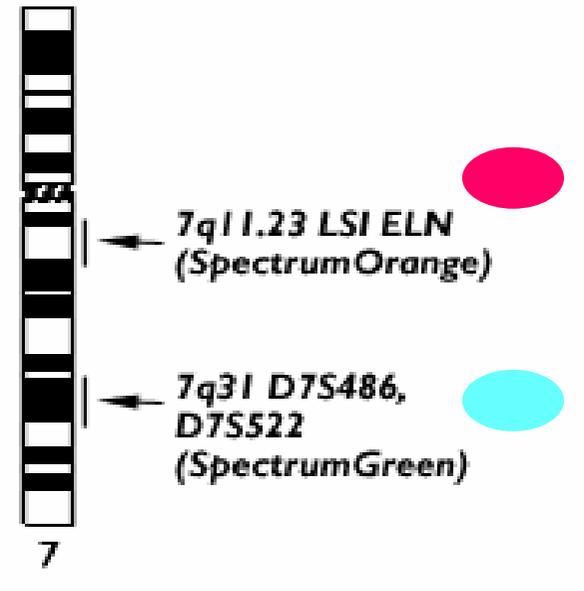
∞ ritardo di crescita

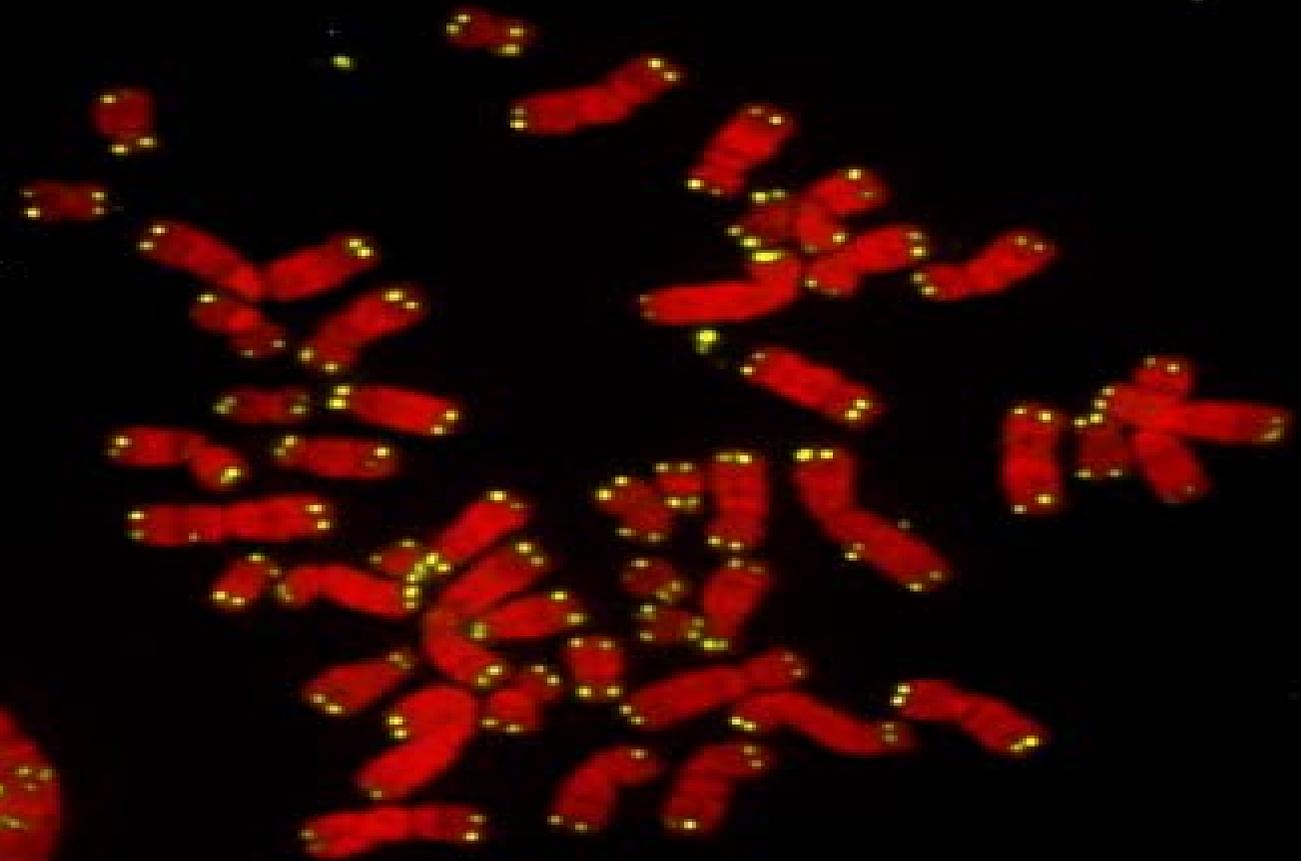
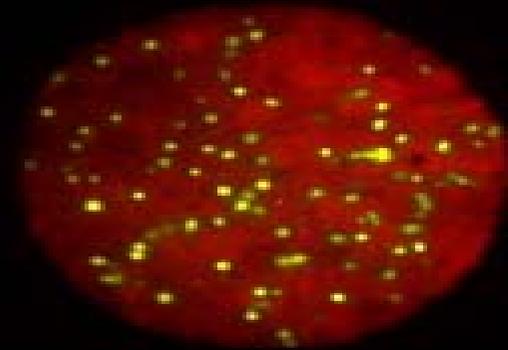
∞ problemi cardiaci

∞ problemi psicologici



# SINDROME DI WILLIAMS





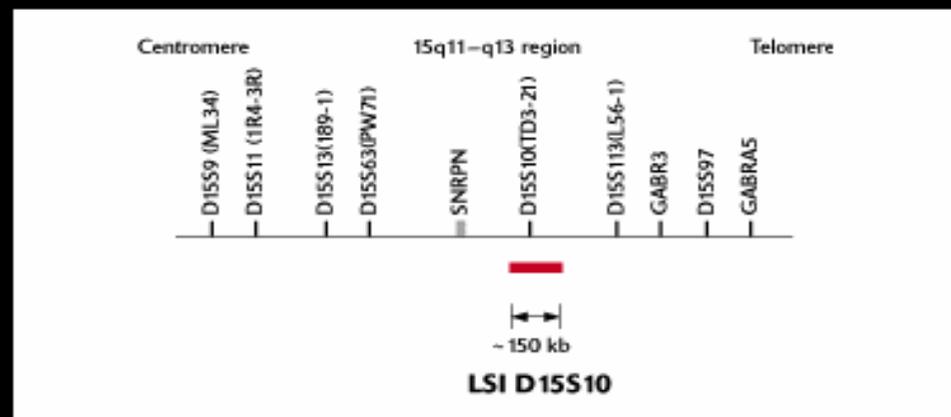
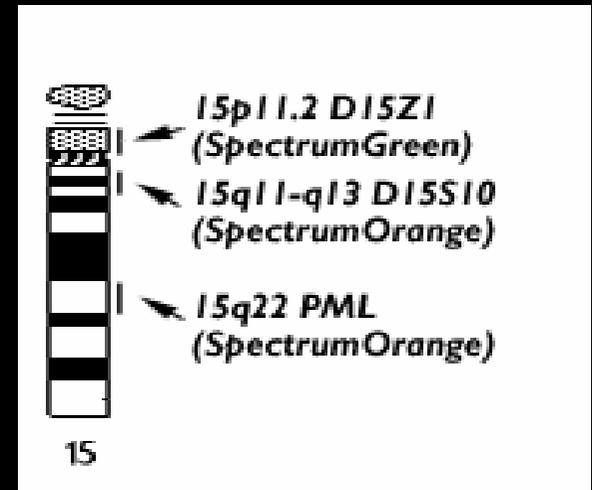
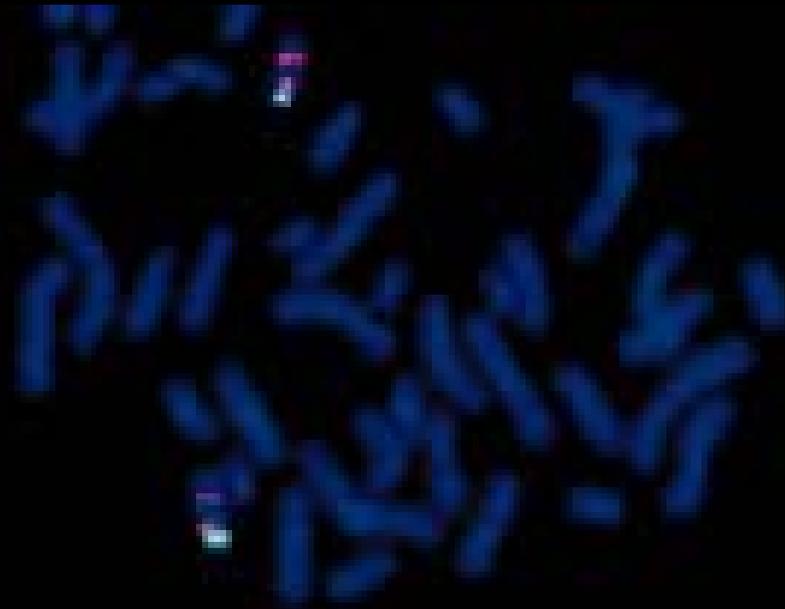
# SINDROME DI ANGELMAN/PRADER WILLI

- ⌚ associate a delezioni (in circa il 60% dei casi), disomia uniparentale o riarrangiamenti cromosomici a carico della stessa regione del cromosoma 15q11-q13
- ⌚ **La sindrome di Prader-Willi** è caratterizzata da obesità dovuta a iperfagia, ipogonadismo, ridotte dimensioni delle mani e dei piedi e ritardo mentale
- ⌚ **La sindrome di Angelman** invece è caratterizzata da un grave ritardo psicomotorio, assenza di linguaggio, atassia, crisi improvvise di riso, deficit dell'attenzione.

# SINDROME DI ANGELMAN/PRADER WILLI

⌚ In particolare, la regione 15q contiene un dominio di circa 2Mb che è soggetto a imprinting genomico. Tale dominio contiene un cluster di geni espressi per via paterna, la cui assenza determina la comparsa della sindrome di Prader-Willi; e geni espressi per via materna, mutazioni a carico dei quali causano la Sindrome di Angelman. Molti di questi casi sono associati a mutazioni a carico di una piccola regione del cromosoma 15q11 nota come centro di imprinting. Il centro di imprinting agisce come un interruttore che accende, ad esempio, la copia materna del gene UBE3A e silenzia la copia paterna del gene in certi tessuti del sistema nervoso centrale.

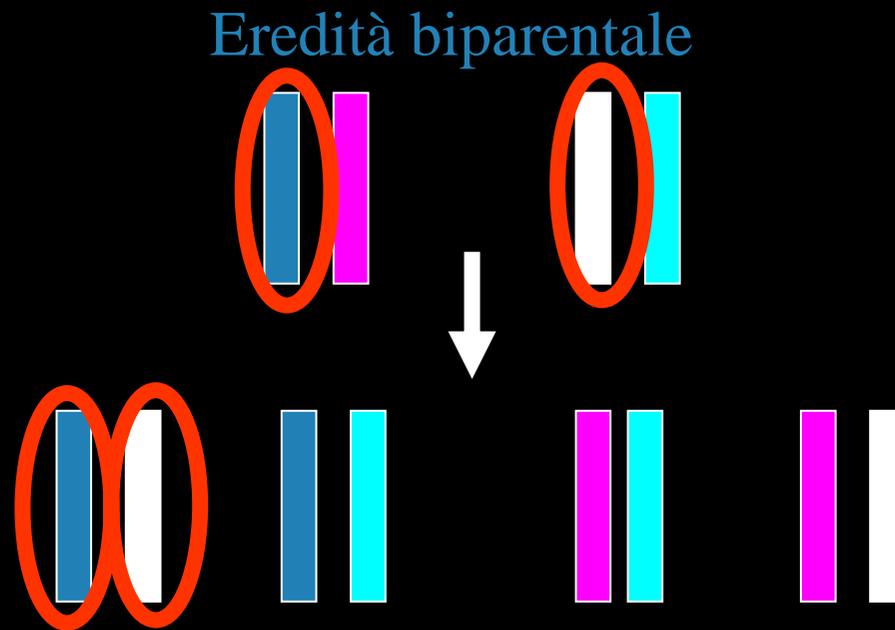
# SINDROME DI PRADER-WILLI



**... non solo delezioni**

# Imprinting Genomico

Espressione differenziale dei geni  
a seconda dell'origine parentale



Per ogni coppia, un individuo eredita un cromosoma  
dalla madre ed uno dal padre

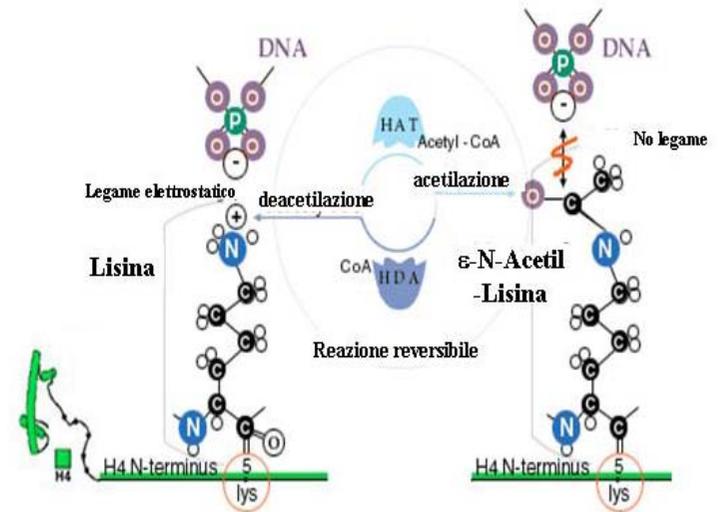
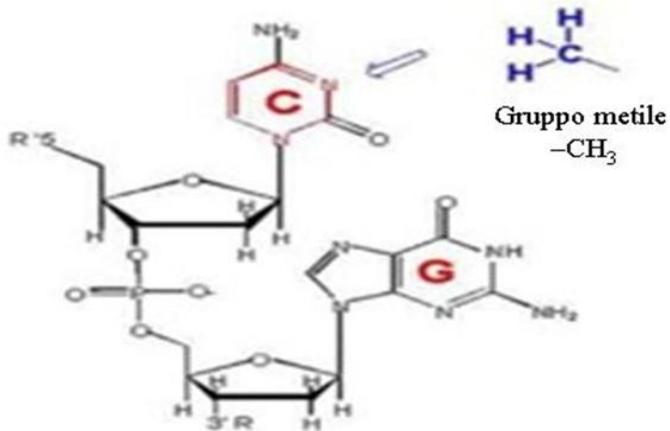
# Imprinting Genomico

FENOMENO  
EPIGENETICO

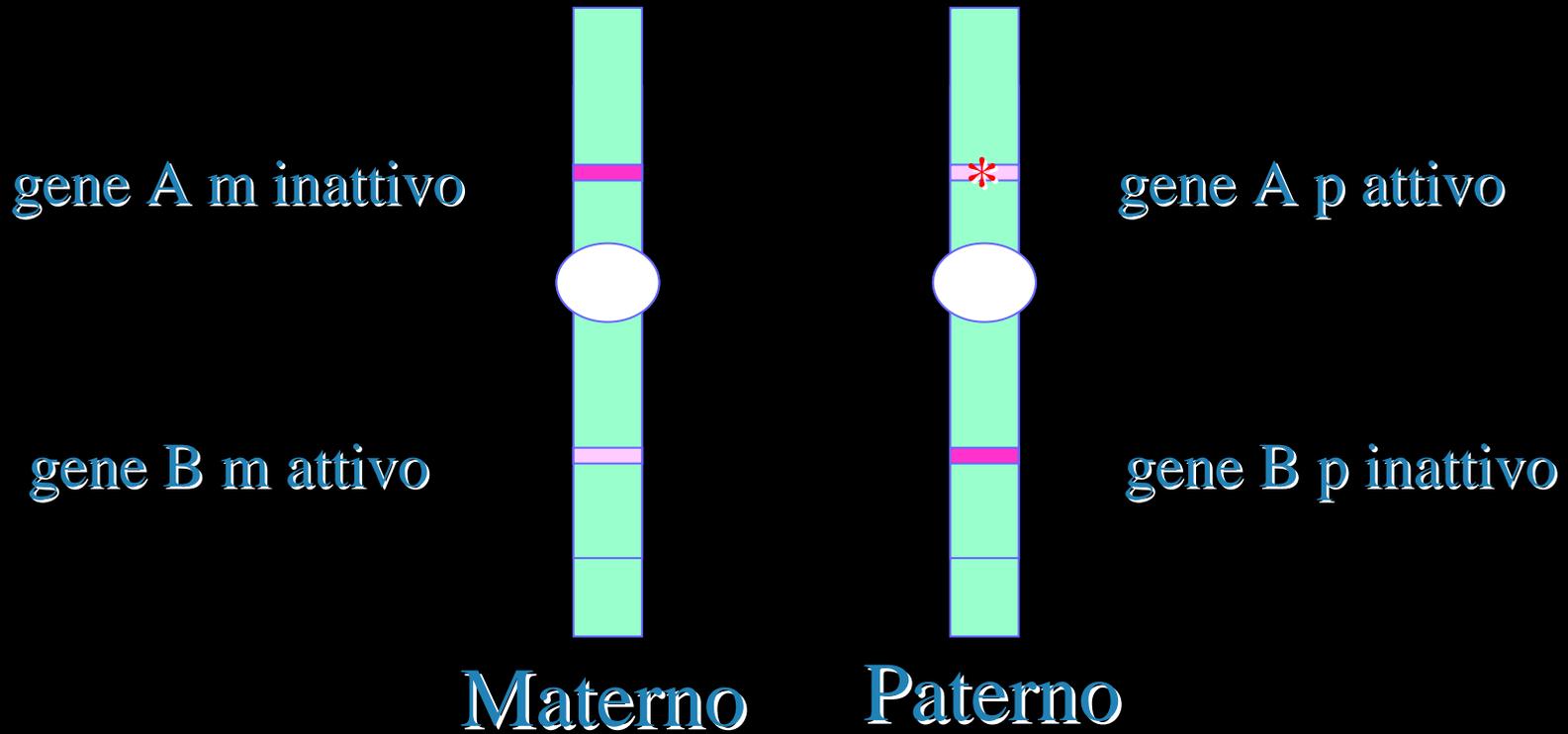
Metilazione

Acetilazione

Metilazione delle isole CpG

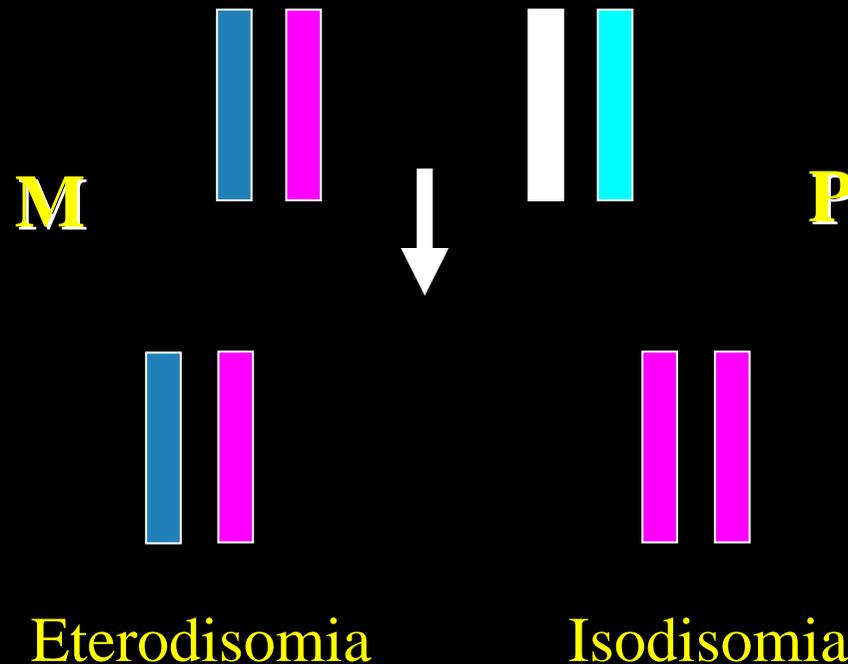


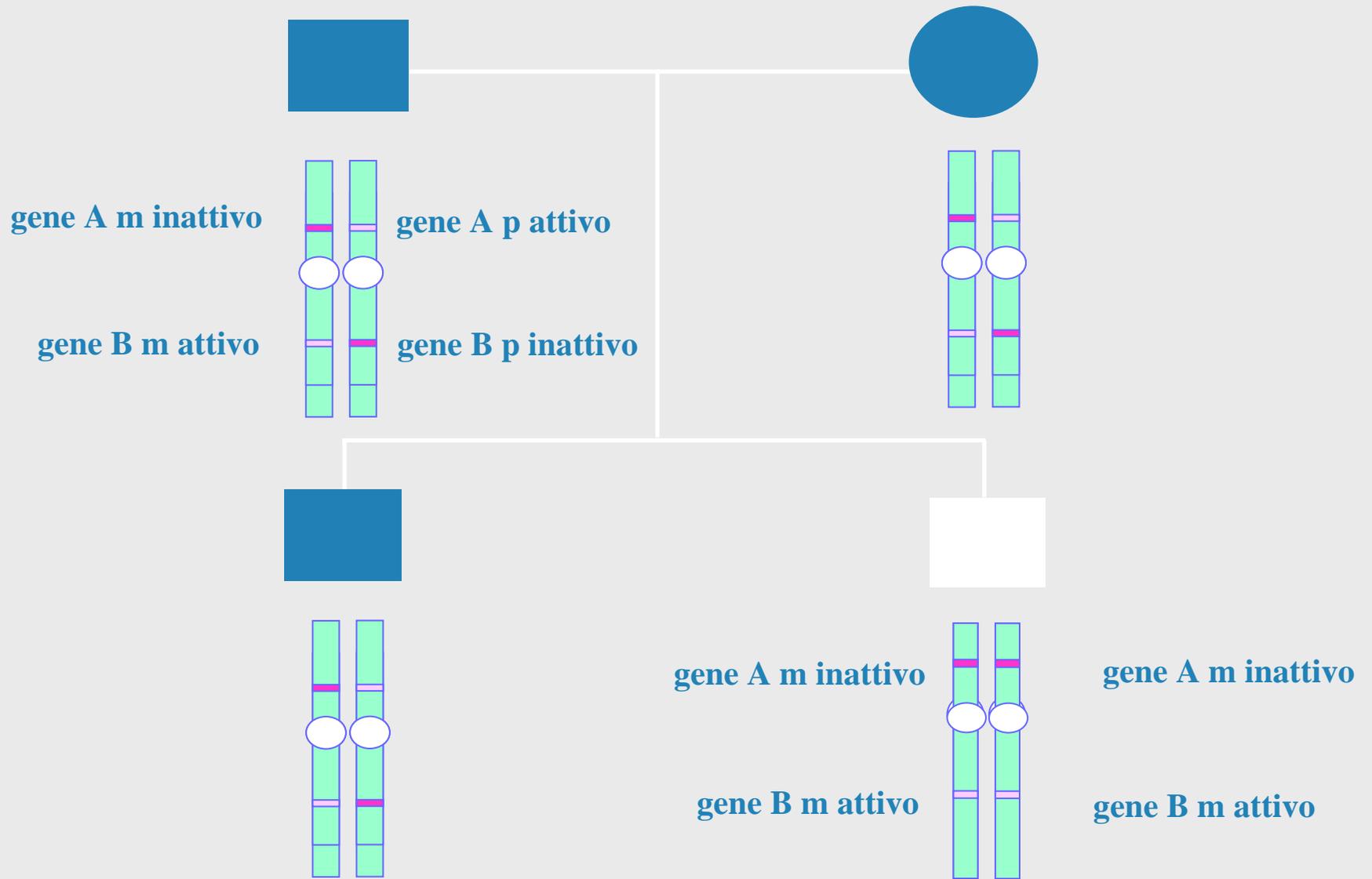
# INFLUENZA SULL'ESPRESSIONE GENICA



# Disomia Uniparentale (UPD)

Un individuo eredita entrambe le copie di una coppia di cromosomi da un solo genitore





- viene a mancare il prodotto del gene A (nullisomia funzionale)
- doppio prodotto del gene B

# Sindromi correlate

✓ Prader-Willi: 15q11-q13, obesità, bassa statura, ipogonadismo, ritardo mentale.

✓ Angelman 15q11-q13, ritardo mentale e motorio, assenza del linguaggio, atassia e crisi improvvise di riso.



✓ Silver-Russell: ritardo di crescita, statura piccola e asimmetria del corpo.

✓ Beckwith-Wiedemann: 11p15, macroglossia, ernia ombelicale, inguinali e del padiglio neonatale ed aumentato rischio di sv



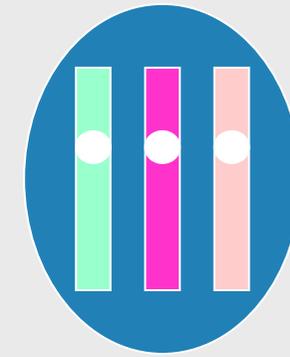
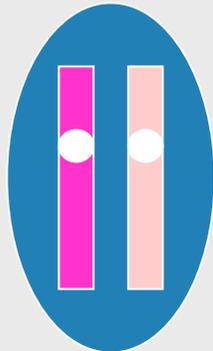
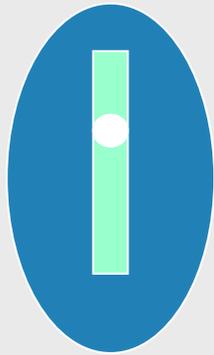
macroglossia, ernia rino e fetale, statura

macrosomia, ernia re, ipoglicemia eoplasie

✓ Diabete Neonatale Transitorio (TND) 6 paterna.

# CORREZIONE DELLA TRISOMIA

gamete paterno

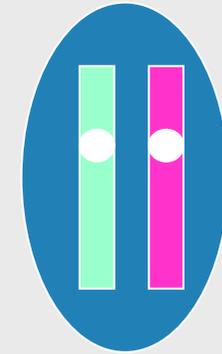


zigote  
trisomico

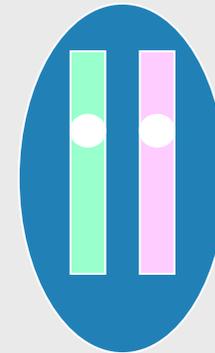
eliminazione  
cromosomica



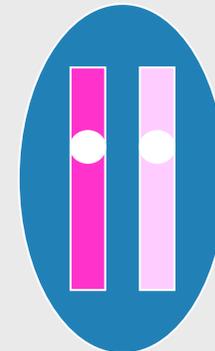
Correzione  
di  
trisomia



Normale



Normale

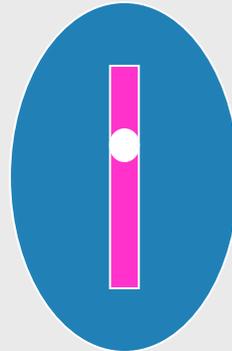
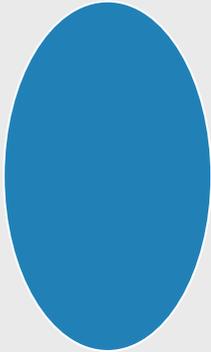


UPD  
(etero  
disomia)

gamete materno

# CORREZIONE DELLA MONOSOMIA

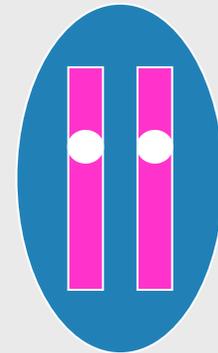
gamete paterno



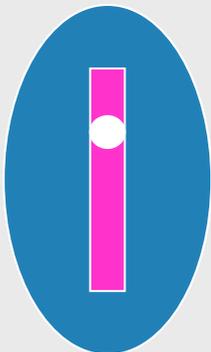
uplicazione  
cromosomica



correzione  
di  
monosomia



UPD  
(isodisomia)

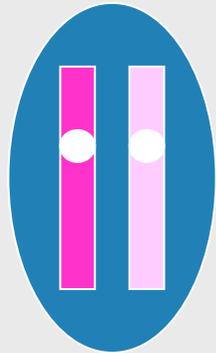
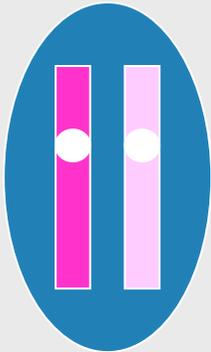
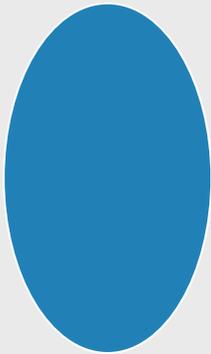


zigote  
monosomico

gamete materno

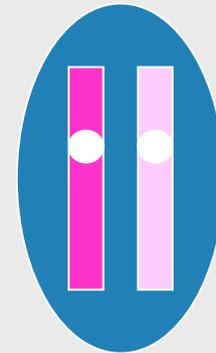
# COMPLEMENTAZIONE GAMETICA

gamete paterno



zigote con  
UPD

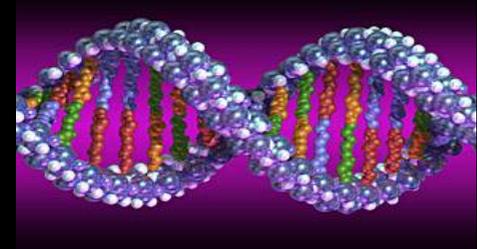
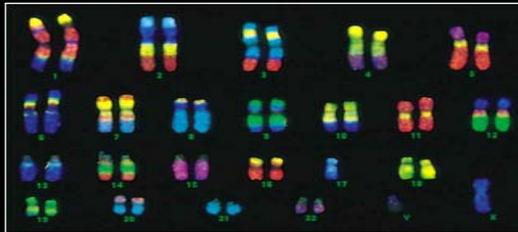
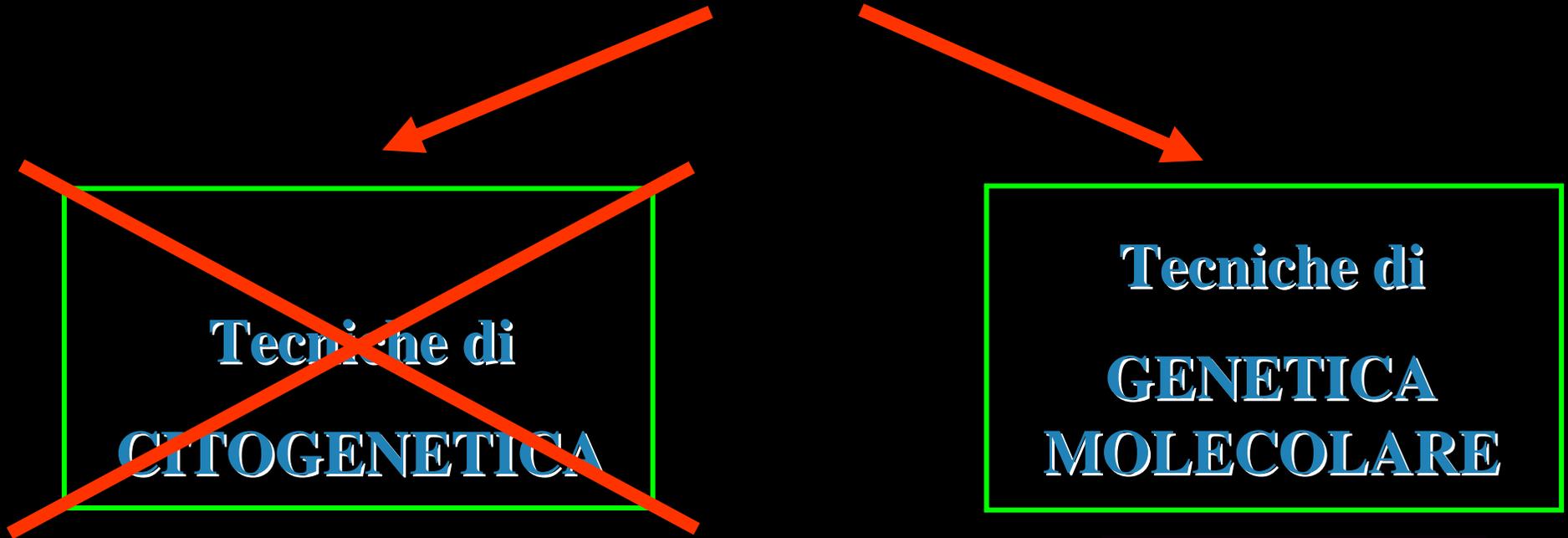
mitosi

A white arrow pointing from the zygote to the final UPD state.

UPD  
(eterodisomia)

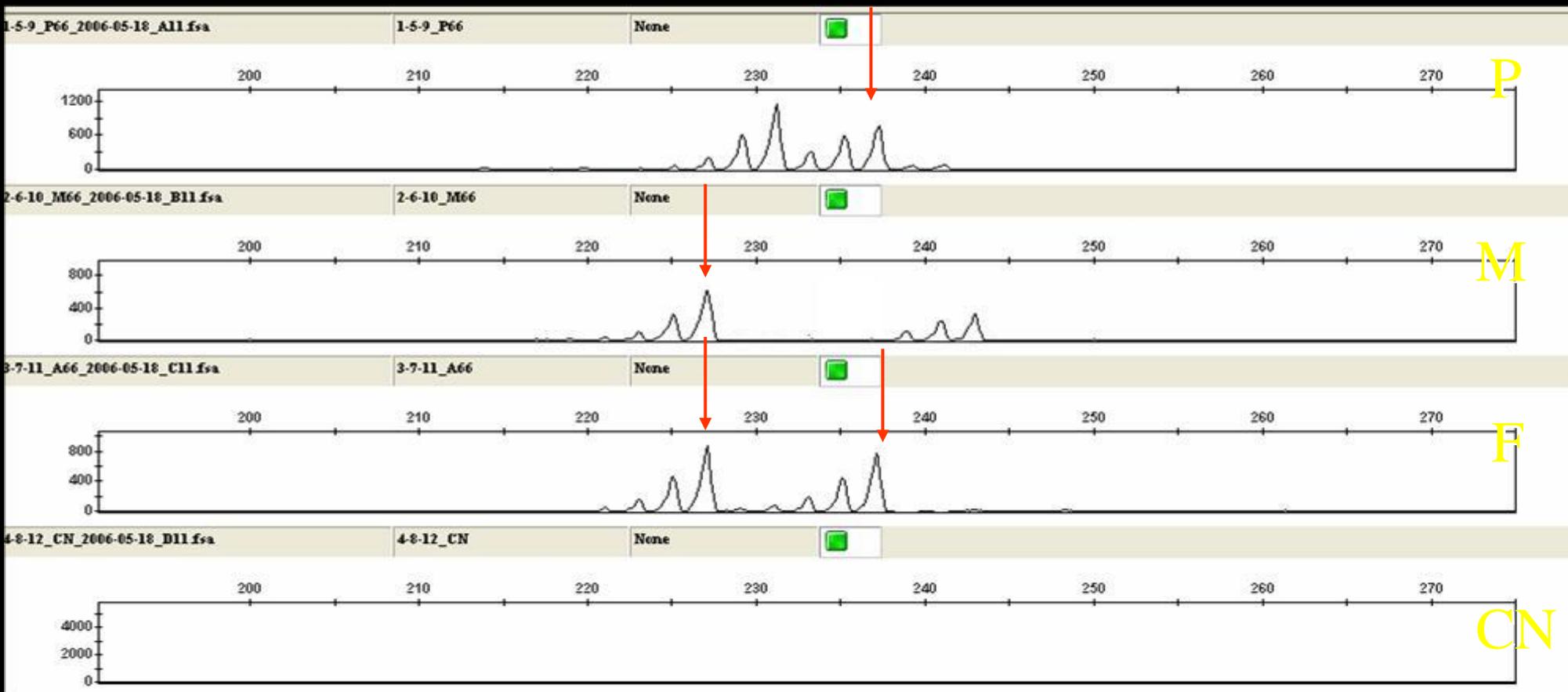
gamete materno

# Rilevazione del difetto



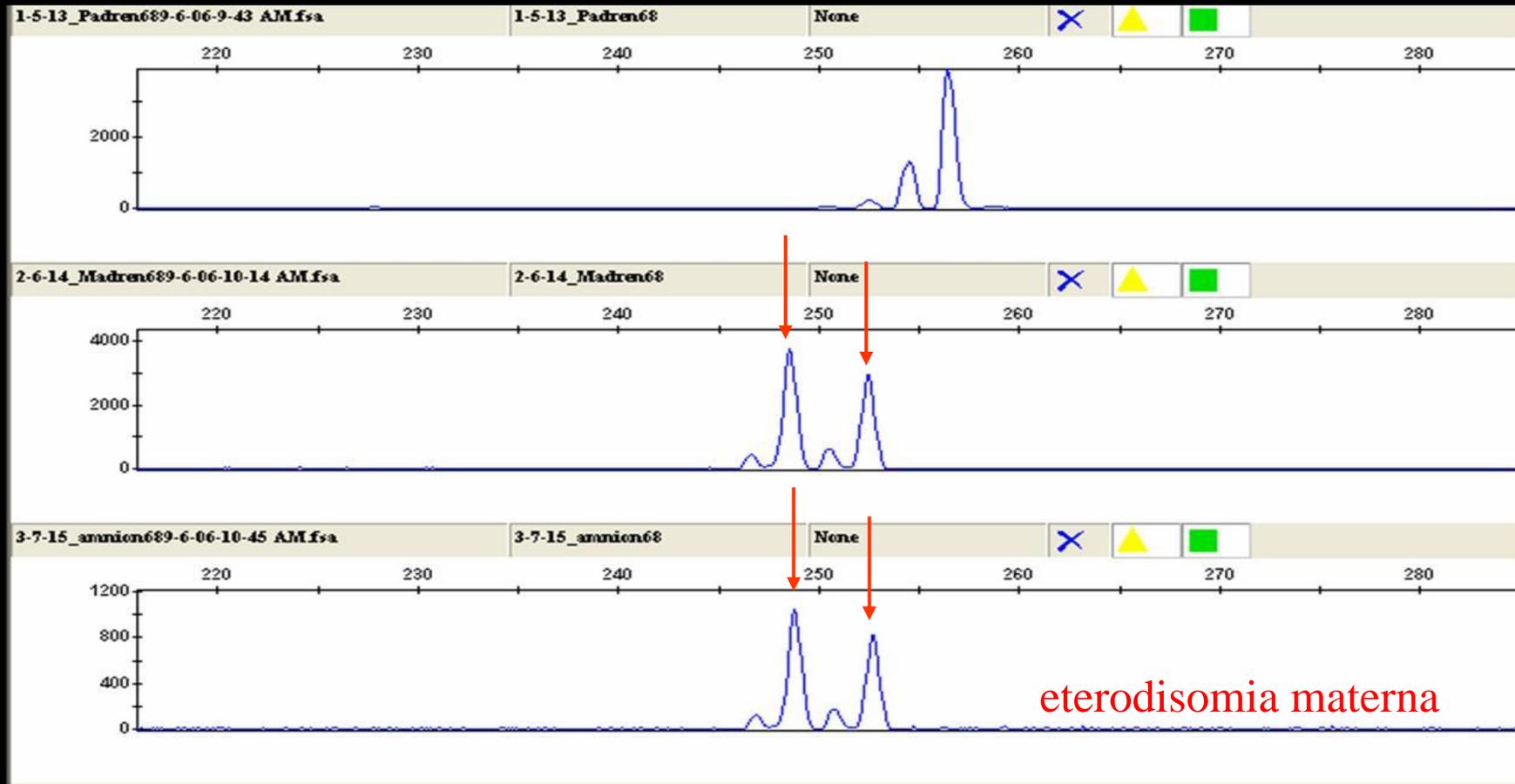
**ANALISI DEI MARCATORI  
MICROSATELLITI**

# Elettroferogramma



**DIMENSIONI IN bp**

# Elettroferogramma

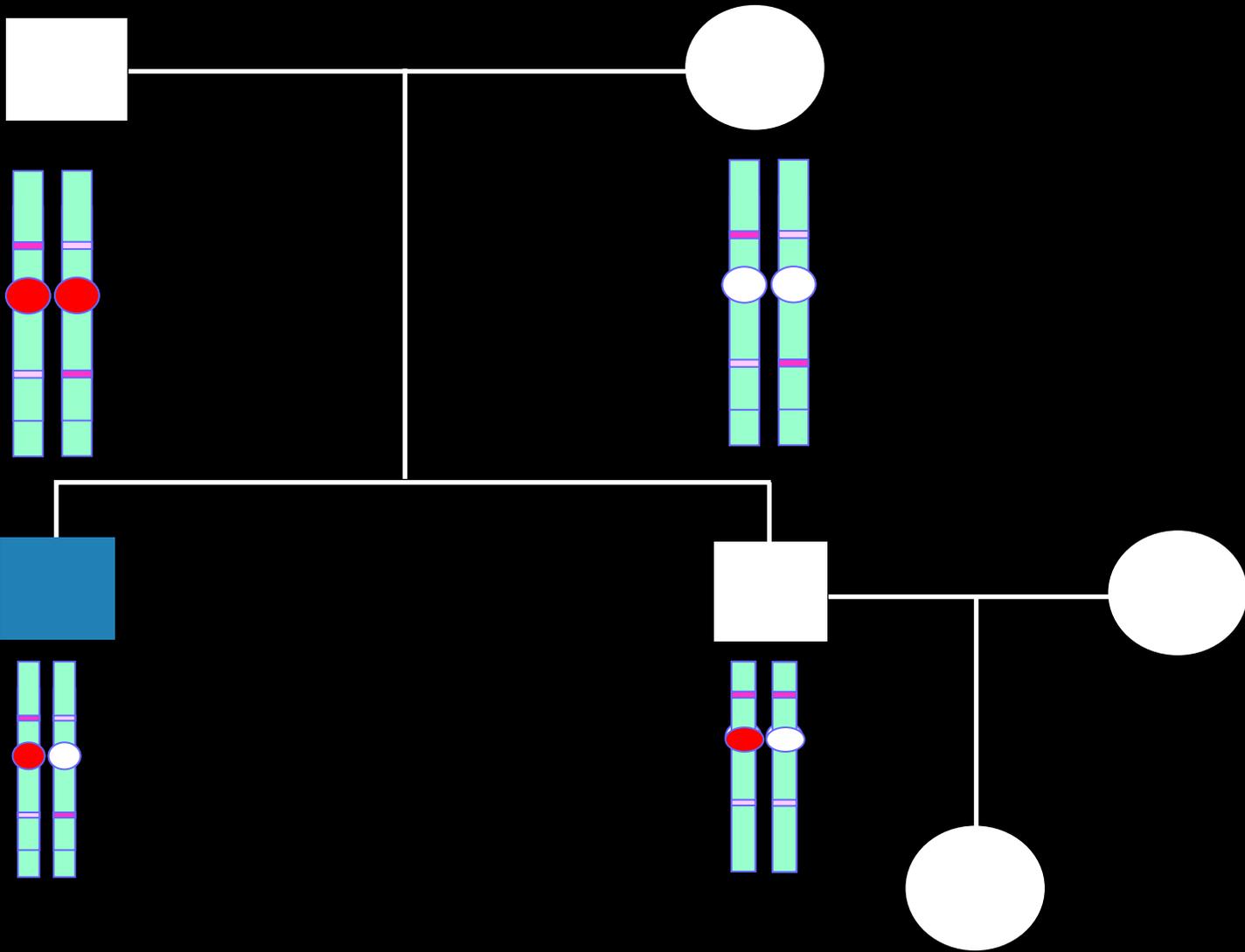


P

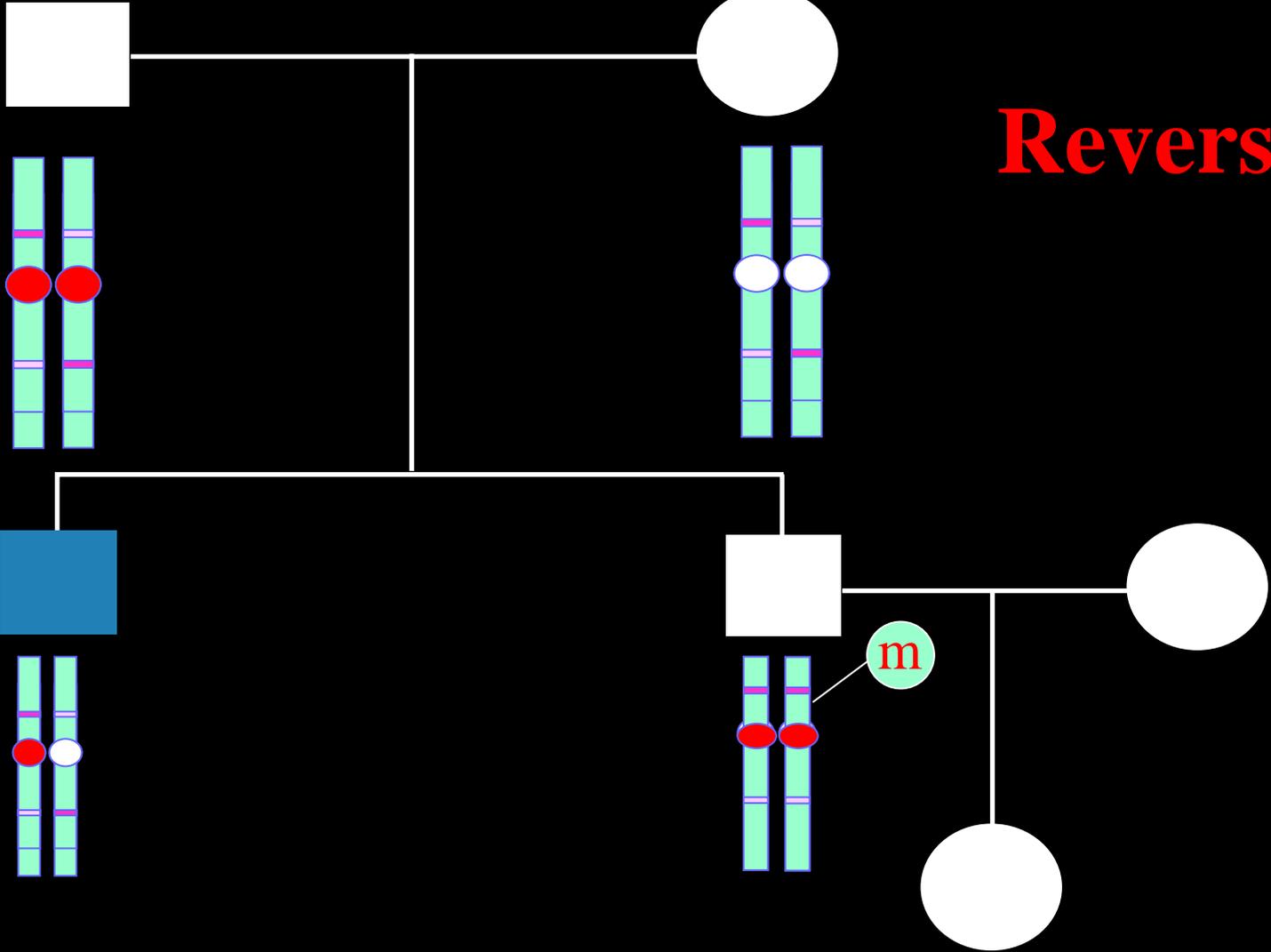
M

F

**DIMENSIONI IN bp**



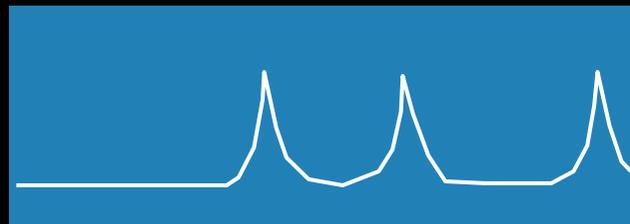
**Reversible!**



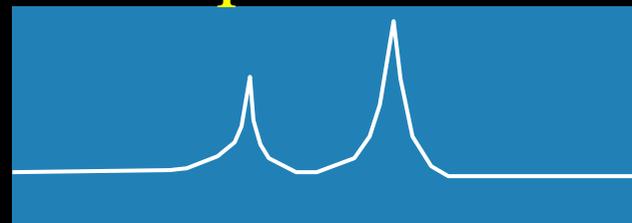
# Quantitative Fluorescent PCR

## Trisomy detection in prenatal samples

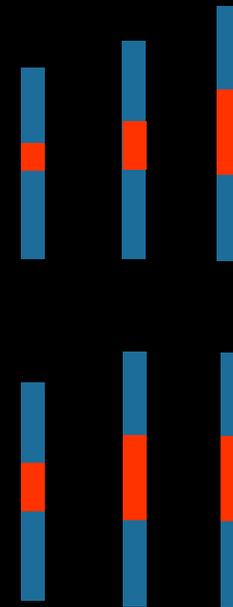
Hypervariable region  
on chromosome 21  
amplified by F-PCR



Ratio: 1 : 1 : 1

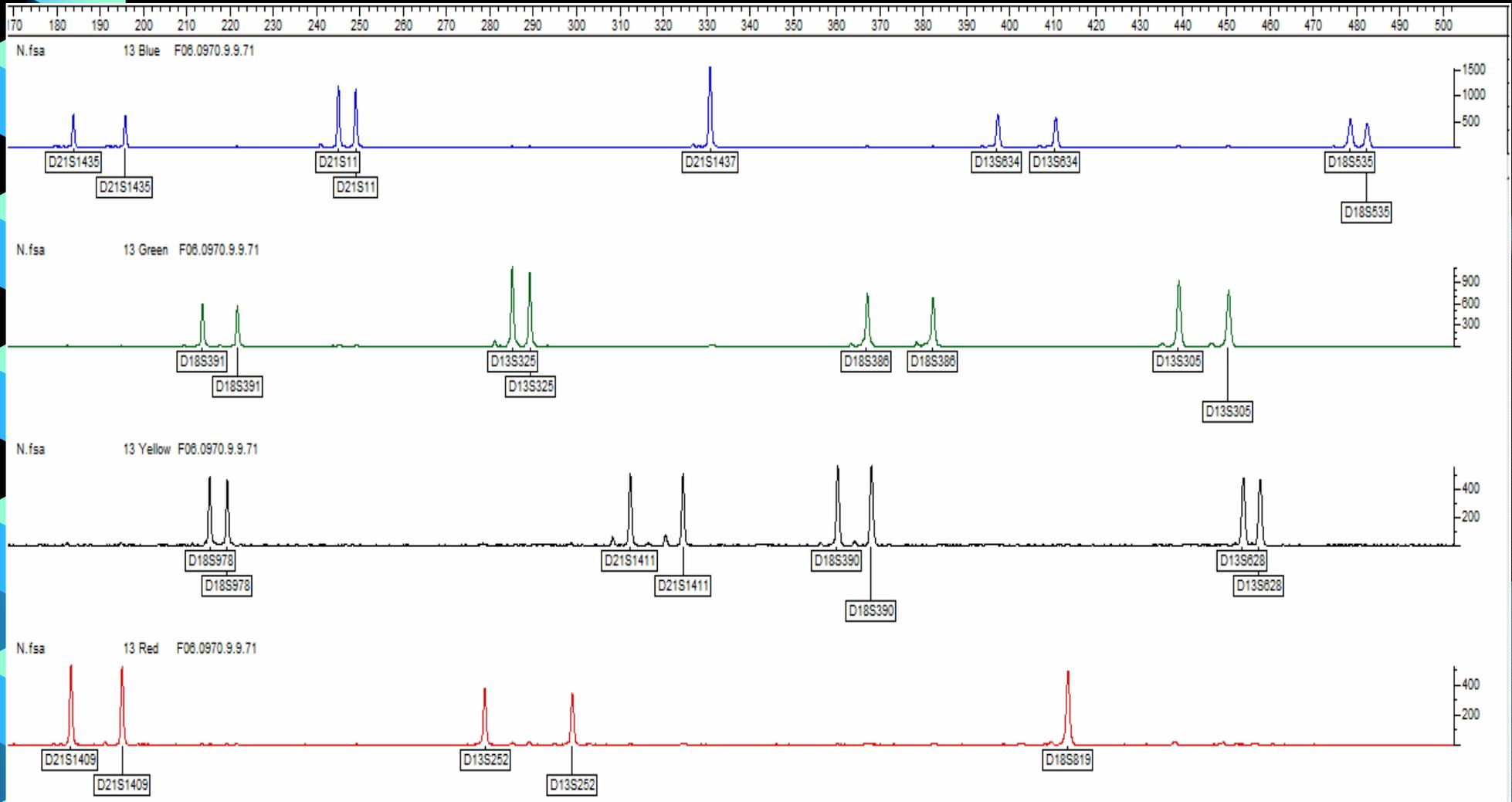


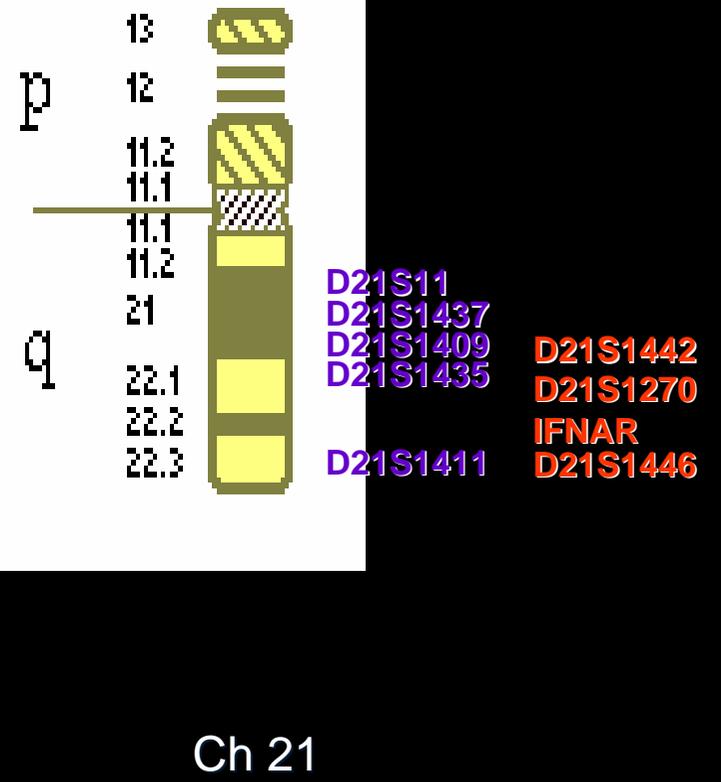
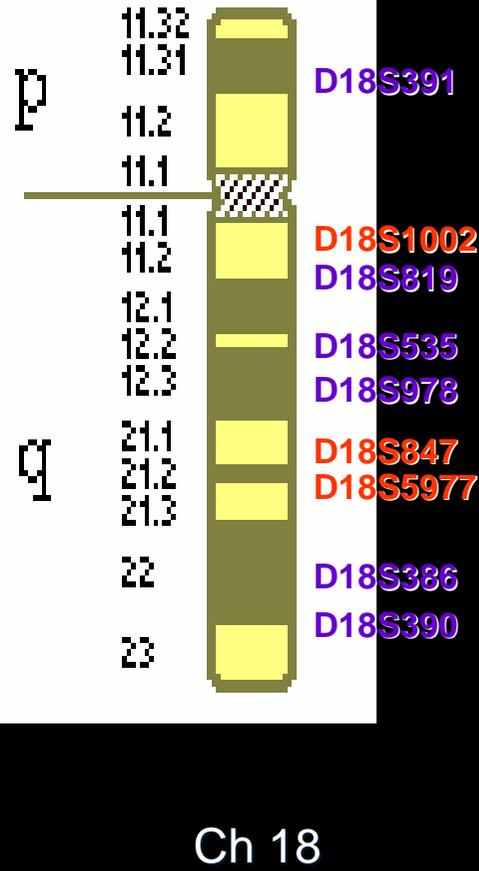
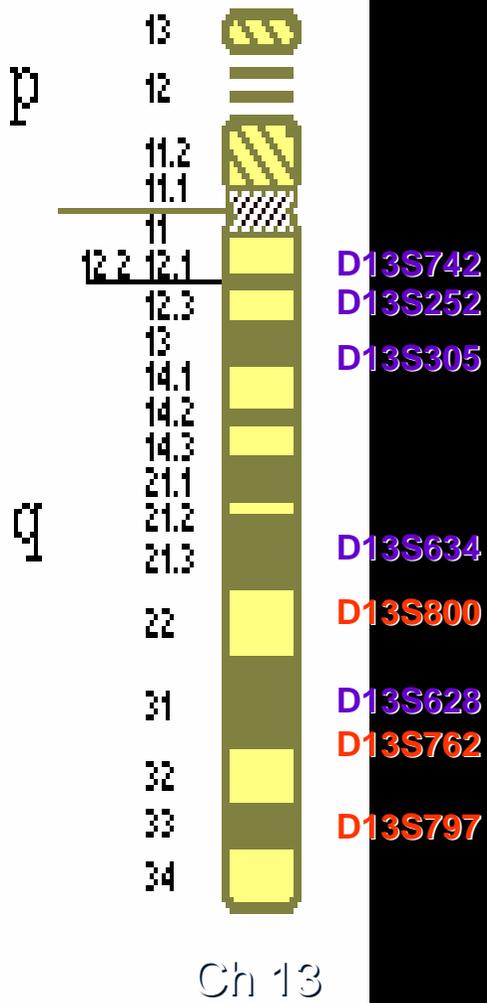
Ratio: 1 : 2



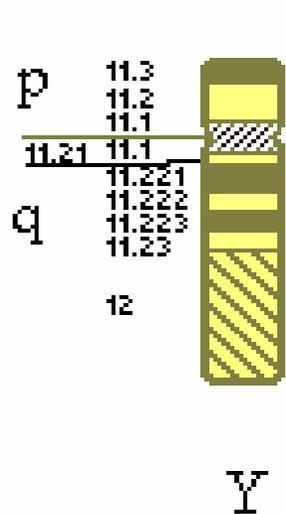
# Trisomy Multiplex

## Guy's Hospital, London



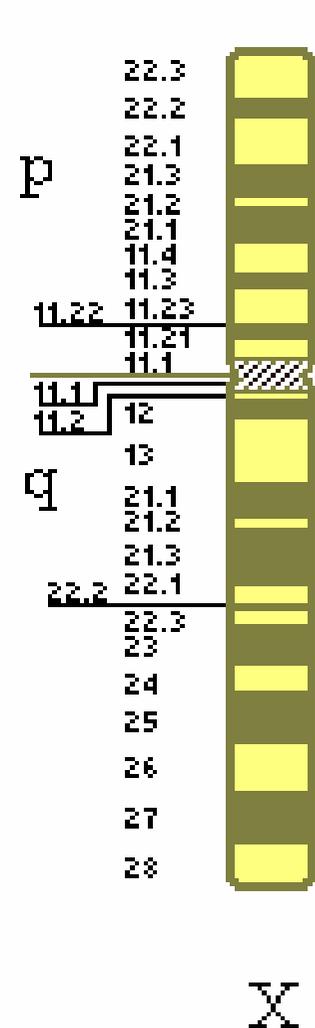


DXYS218  
 SRY  
 DXYS267  
 AMEL  
 DYS448



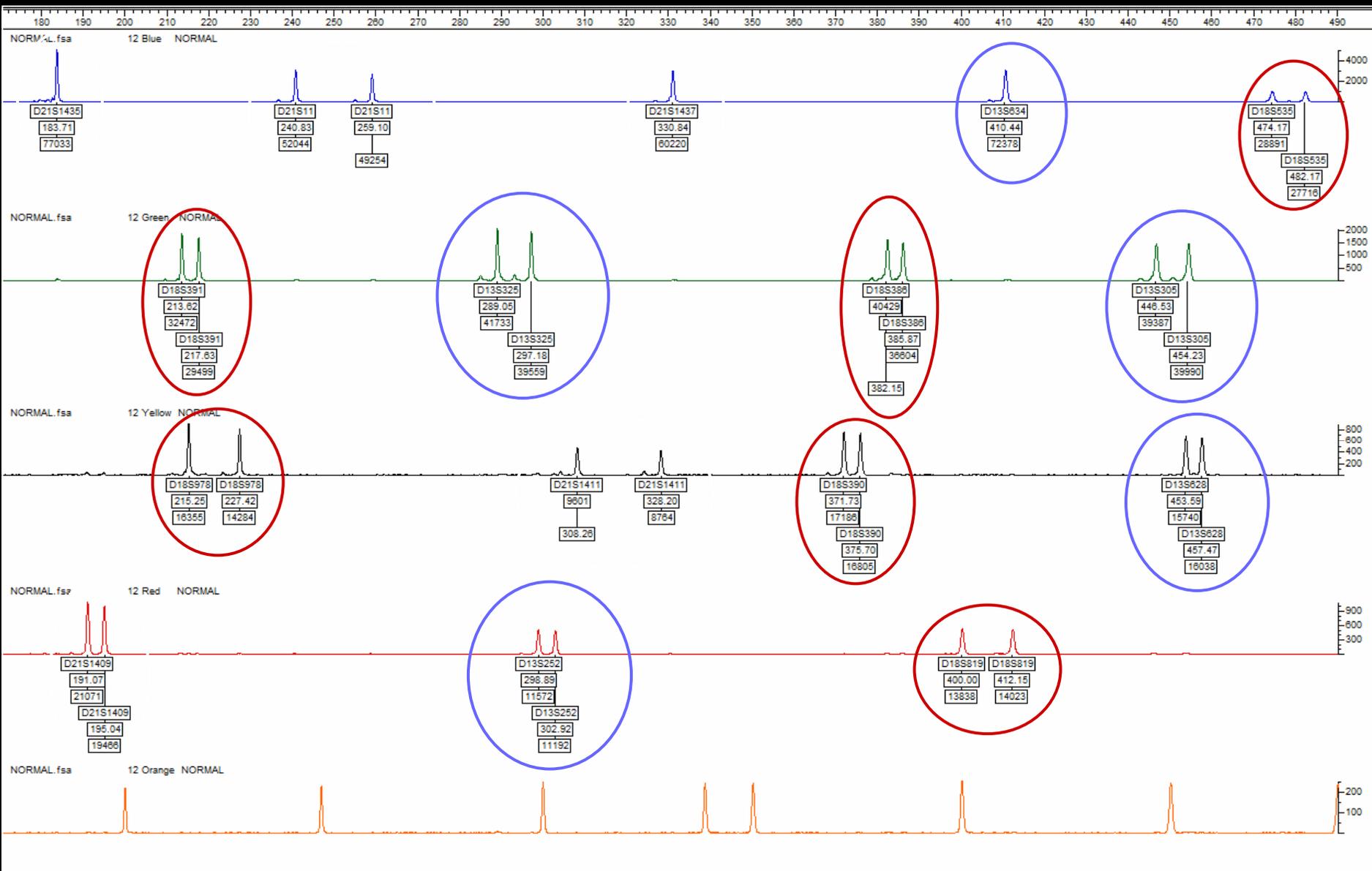
p11.3  
 p11.31 2.7  
 p11.31 3.15  
 p11.2 6.7  
 q11.223 22.7

DXYS218  
 DXS6807  
 DXS1283E  
 AMEL



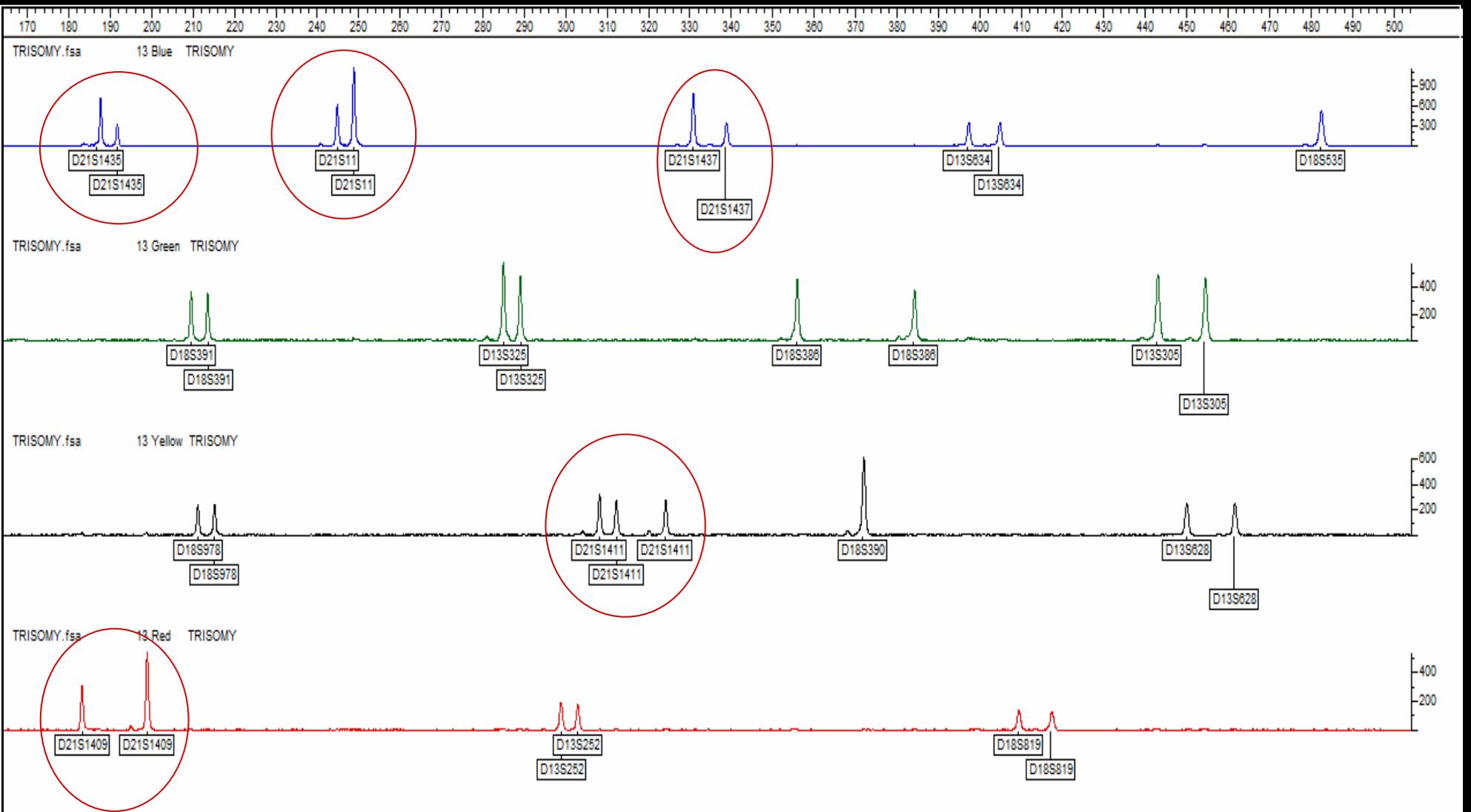
p22.33 0.90  
 p22.3 4.60  
 p22.3 7.67  
 p22.2 11.05  
 q13.1 67.95  
 q21.31 86.30  
 q21.31 88.65  
 q21.33 94.80  
 q26.2 130.75  
 q26.2 133.3  
 q28 149.35

size in basepairs

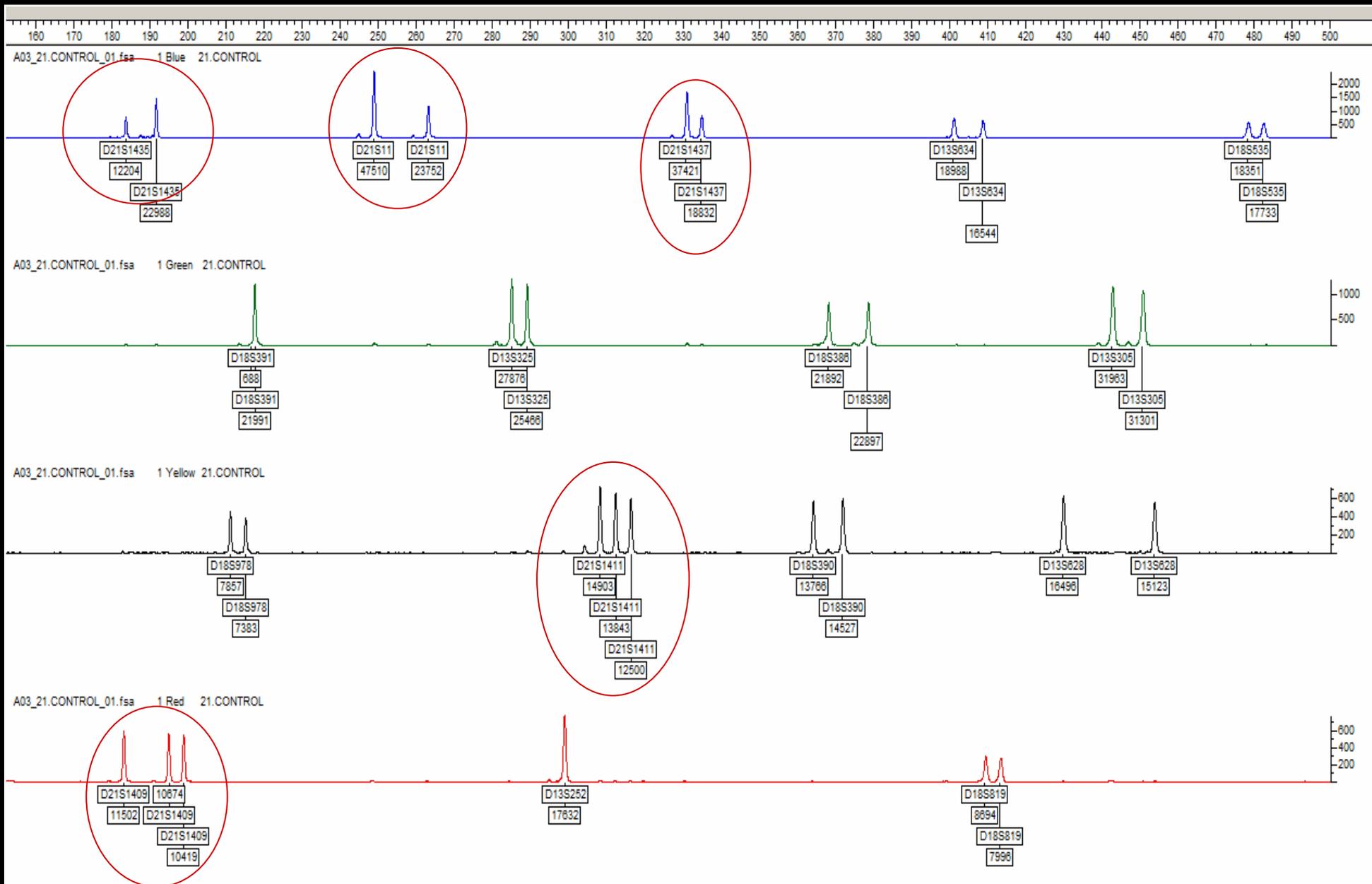


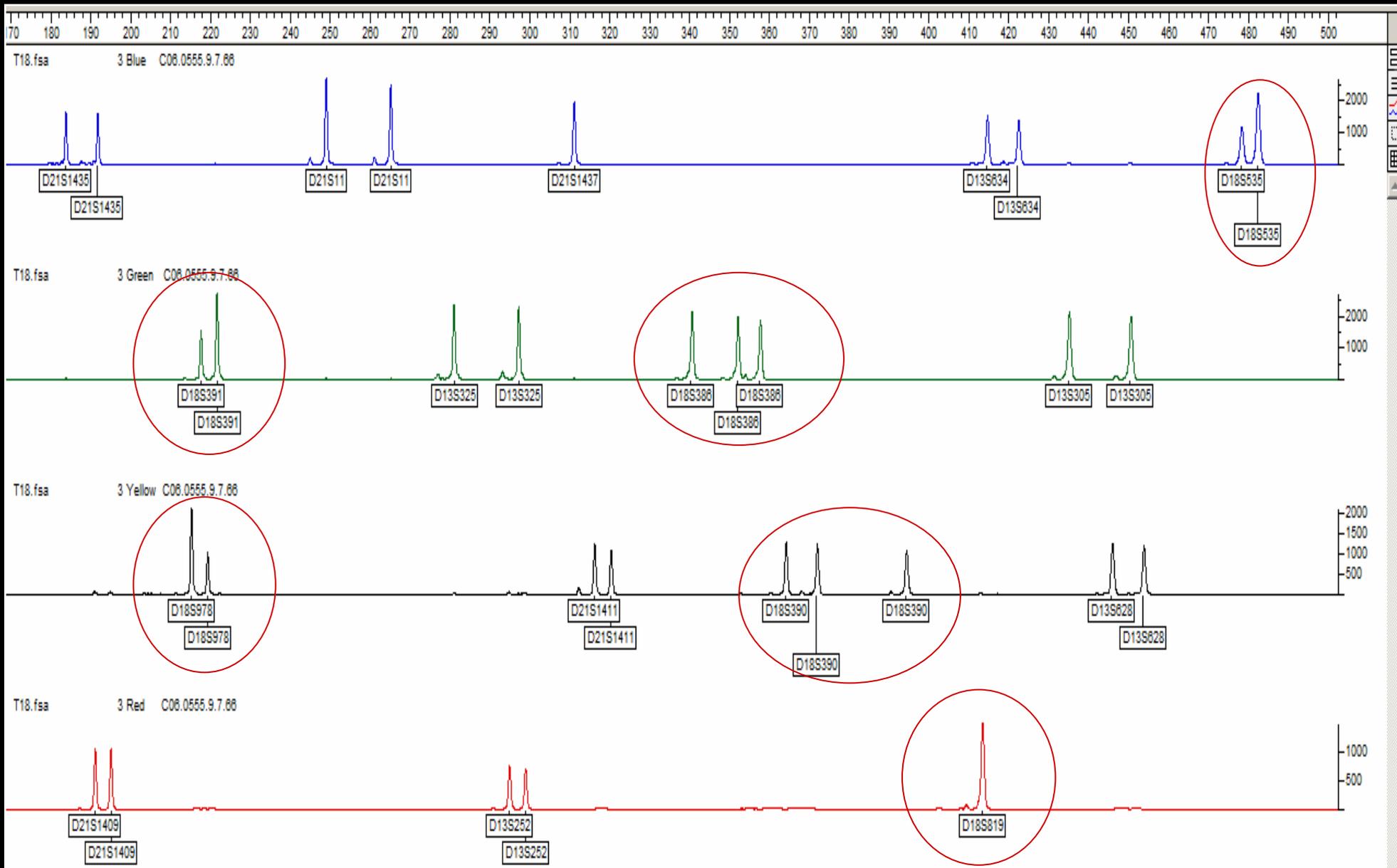
Relative fluorescent units

Normal for chromosomes 13, 18 and 21



Trisomy 21, normal 13 and 18





# Quick result from Amniocentesis

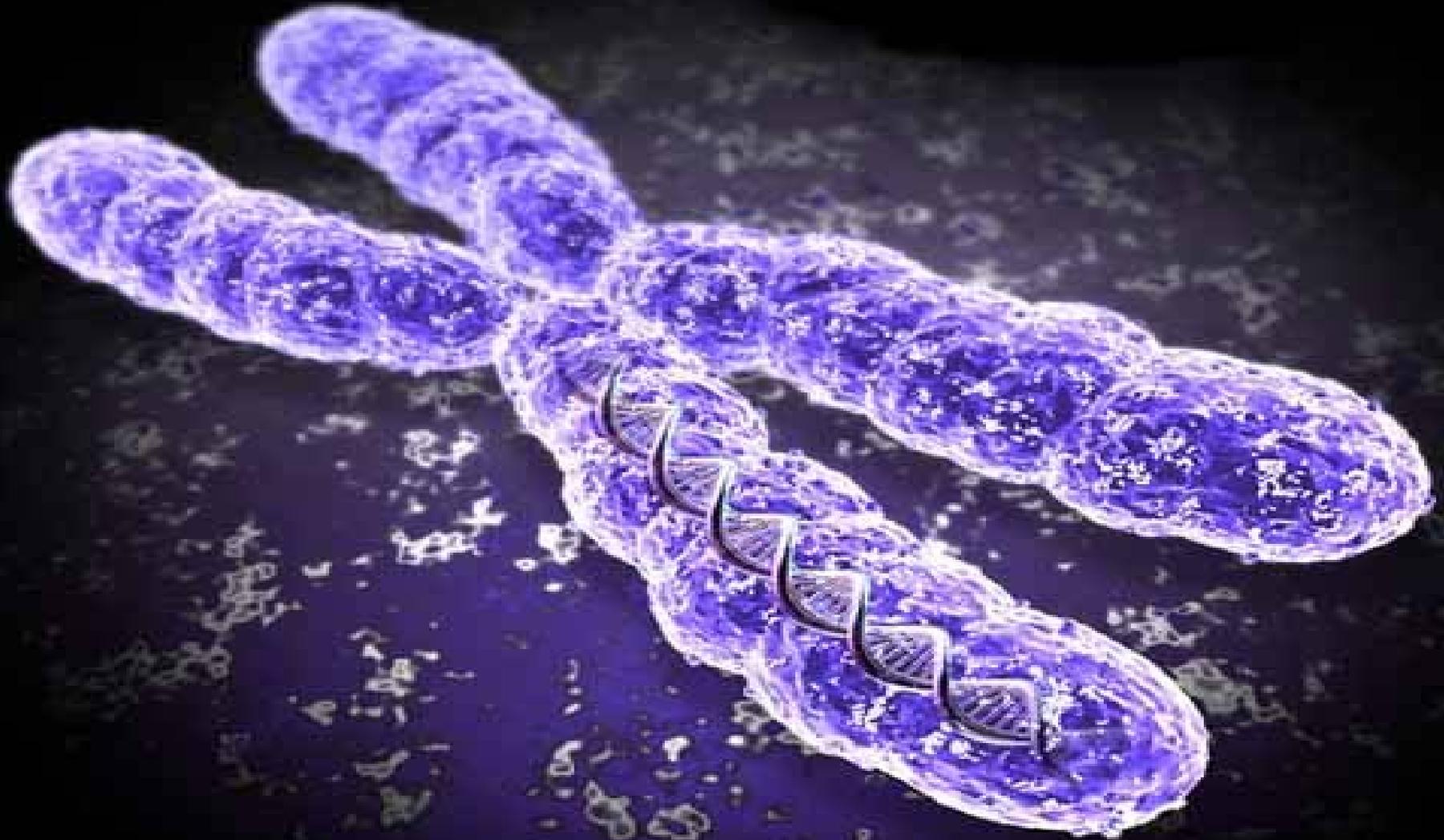
## Ω FISH

- Use probes for 13,21 and X, Y, 18 on two different slides
- takes 24 hours

## Ω QF-PCR

- Use polymorphic markers for chromosomes 13, 18, 21
- Results in 24 hours
- Becoming more common
  
- Can only detect abnormalities for these chromosomes
- Usually go on and do full karyotype - ???

# Problemi di correlazione genotipo-fenotipo



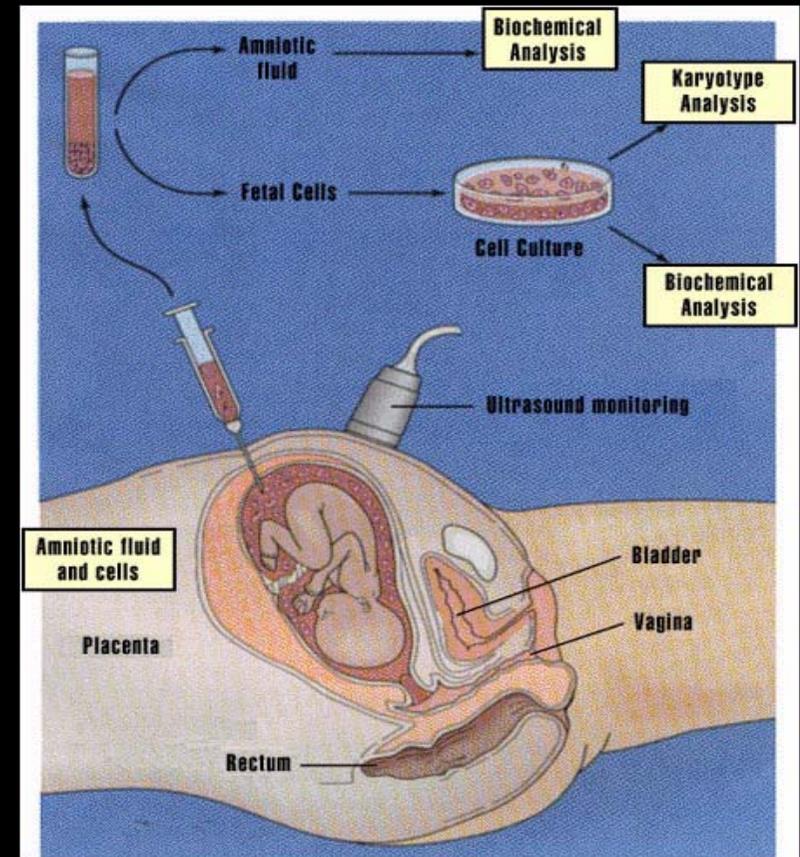
# FREQUENZA DELLE ANOMALIE CROMOSOMICHE NEGLI ABORTI SPONTANEI

su 8841 aborti spontanei del primo trimestre 3613 (40.87%) presentano anomalie cromosomiche

∞ trisomie autosomi	52%
∞ 45,X	19%
∞ poliploidie (triploidie 16%)	22%
∞ riarrangiamenti strutturali	7%

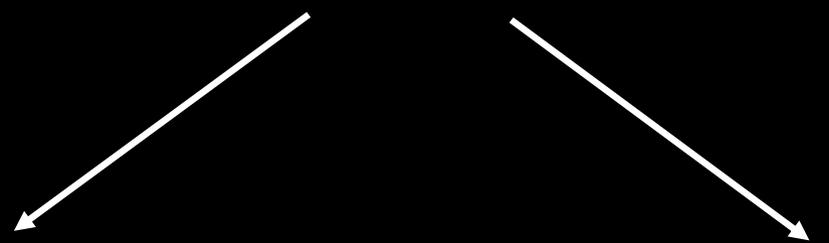
# LA DIAGNOSI PRENATALE

La diagnosi prenatale comprende una serie di tecniche strumentali e di laboratorio finalizzate al monitoraggio della gravidanza, dal concepimento al momento immediatamente precedente il parto.



# LA DIAGNOSI PRENATALE

TECNICHE STRUMENTALI E DI LABORATORIO FINALIZZATE AL  
MONITORAGGIO DELLA GRAVIDANZA, DAL CONCEPIMENTO AL  
MOMENTO IMMEDIATAMENTE PRECEDENTE IL PARTO



**NON INVASIVE**

**INVASIVE**

# ECOGRAFIA



- **DIFETTI STRUTTURALI DEL FETO**
- **INDICAZIONI OSTETRICHE (gravidezze gemellari e localizzazione placenta)**
- **PERIODO OTTIMALE 16-18° settimana (il sesso può essere predetto a partire dalla 16° settimana)**
- **PUO' ESSERE RIPETUTA**



**La Translucenza Nucale è una ecografia che viene eseguita fra la 11<sup>a</sup> e la 14<sup>a</sup> settimana e consente di determinare il rischio statistico per la sindrome di Down e altre patologie cromosomiche più rare.**

**Consiste nel misurare la distanza fra i muscoli paravertebrali e la cute nella regione posteriore del collo. Questa distanza o meglio questo spessore aumenta proporzionalmente con il rischio di sindrome di down e secondo alcuni anche con il rischio futuro di patologie cardiache.**

C 2  
150dB/C4  
Persist Med  
Fr Rate Med  
2D Opt:Res

ATL

NUCHAL  
TRANSLUCENCY

+ 0.21cm



Alla fine dell'esame viene detto se il rischio relativo specifico individuale è migliorato o peggiorato rispetto a prima dell'esame. Per esempio, se prima dell'esame il rischio era di una donna di 34 anni (1 / 446), questo rischio, dopo l'esame potrà essere uguale a quello di una donna di 30 anni (1/895) o anche meno, oppure peggiore e diventare quello di una donna di 40 (1/97) o anche più.

In parole povere in base a questo rischio lei deciderà se fare o meno un esame invasivo.

Il BITEST è un esame di screening che consente di valutare il rischio che un feto possa essere affetto da Sindrome di Down o da Trisomia 18 (S. di Edwards). **L'esame consiste di una ecografia e un prelievo di sangue.**

Si esegue nel **1° trimestre di gravidanza** ( 11-12 settimane) e si basa sull'utilizzo di una tecnica combinata: la misurazione della translucenza nucale associata al dosaggio di due ormoni (da cui il nome bi-test) presenti nel circolo sanguigno materno: la free-beta hCG (frazione libera della gonadotropina corionica) e la PAPP-A (proteina A plasmatica associata alla gravidanza).

# QUANDO ESEGUIRE UNA DIAGNOSI PRENATALE?

- ETA' MATERNA AVANZATA (35 anni rischio down 1:380)
- malattie mendeliane (studio precedente della malattia)
- Anamnesi familiare positiva per patologia cromosomica(non necessaria se genitori sono normali)
- genitori eterozigoti per anomalie bilanciate (rischio 5-10%)

# La diagnosi prenatale

Ω *La principale indicazione alla diagnosi prenatale è il monitoraggio del **cariotipo fetale**. In Italia questa analisi riguarda oltre il 98% delle diagnosi prenatali che utilizzano tecniche di laboratorio. Lo studio del cariotipo ha alcune precise indicazioni e ha negli amniociti il tessuto di elezione.*

## Simple steps to promote fertility

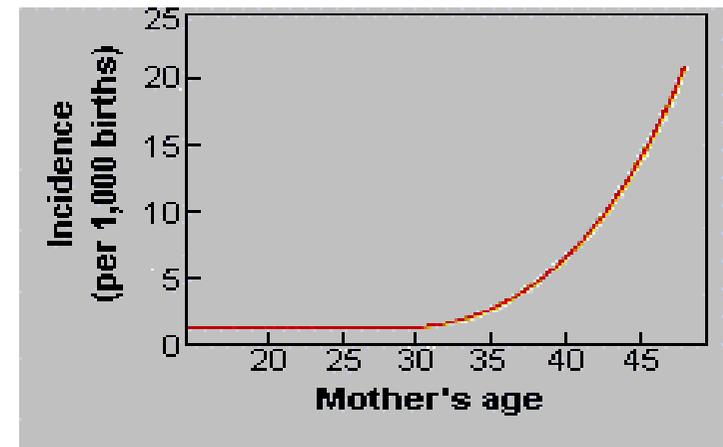
Men and women can both suffer from infertility. Read more on the causes of infertility in the genders...



# Indicazioni per la diagnosi prenatale

## ⌚ Età materna avanzata

- ⌚ Non esiste un criterio per definire l'età materna più appropriata al monitoraggio citogenetico della gravidanza.
- ⌚ La maggior parte degli operatori ritiene appropriata un'età uguale o superiore ai 35 anni (RR DS = 1/380).

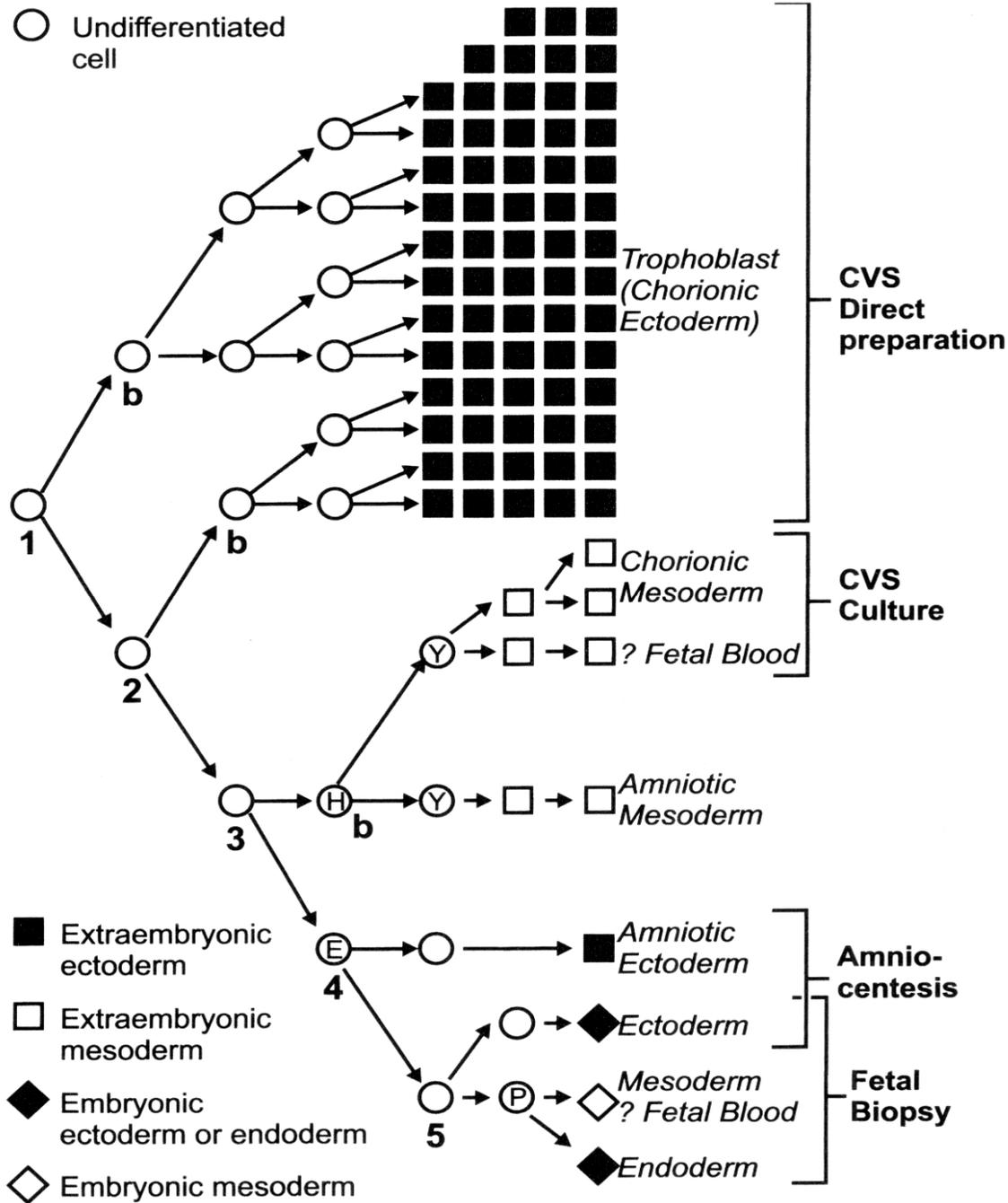




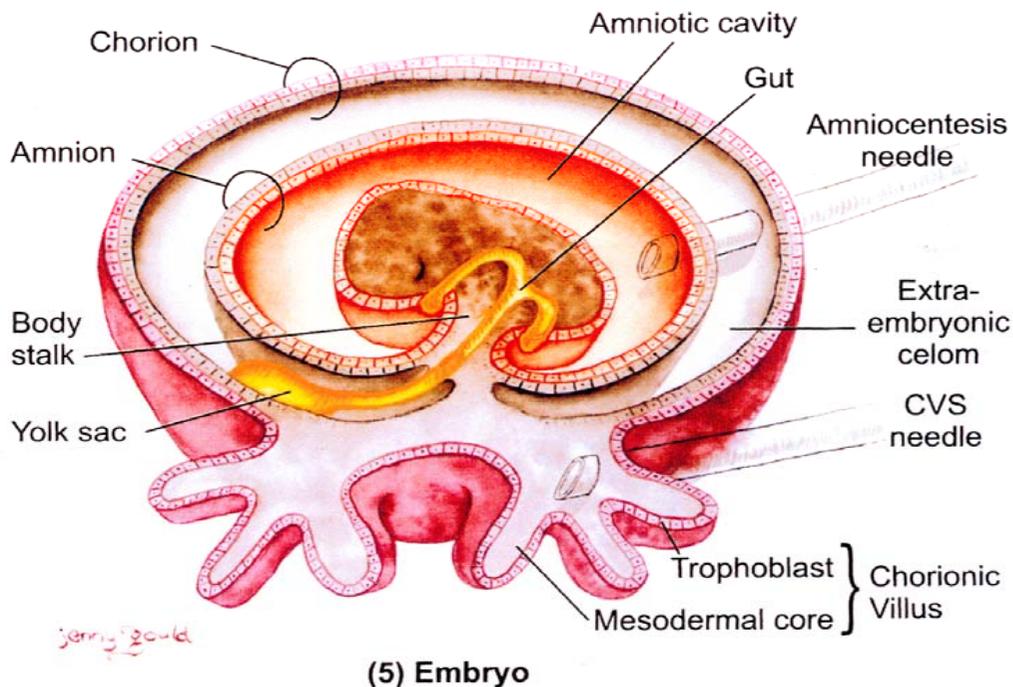
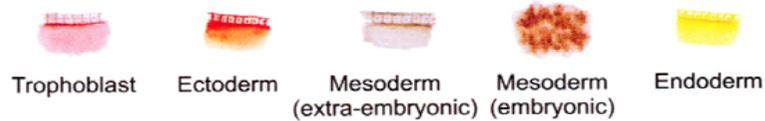
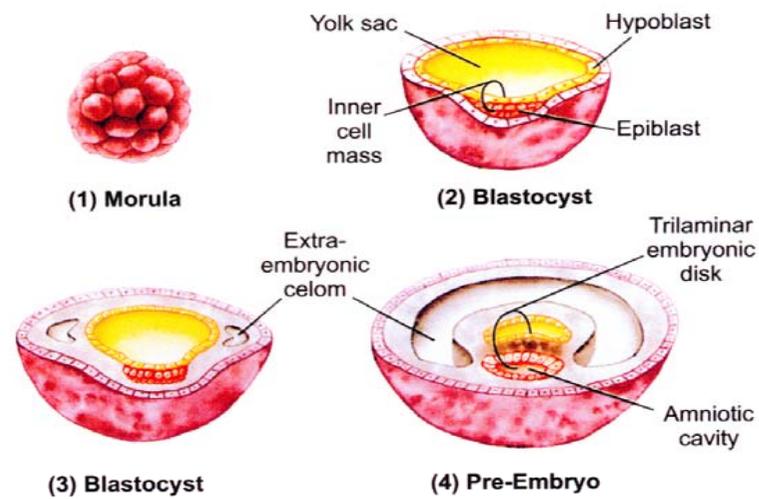
∞ **Villocentesi**

∞ **Amniocentesi**

∞ **cordocentesi**



Lo zigote produce una cellula precursore (1b) (trofoblasto) e una cellula staminale totipotente (2). La cellula staminale 3 dà origine alla inner cell mass che si divide in ipoblasto (H) ed epiblasto (E).



- Il trofoblasto, il tessuto di rivestimento della blastocisti darà origine al rivestimento esterno dei villi coriali.

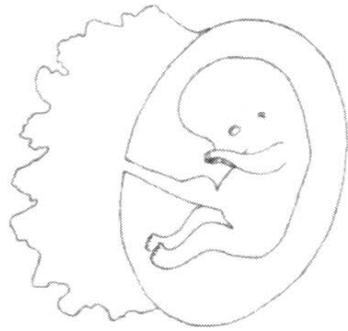
- La ICM si compone di H e E.

- La blastocisti di 64 cellule è composta per la maggior parte da trofoblasto, 16 cellule sono ICM di cui soltanto 4 daranno origine all'embrione (epiblasto).

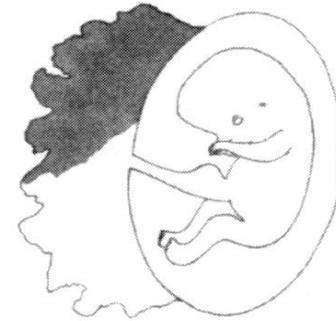
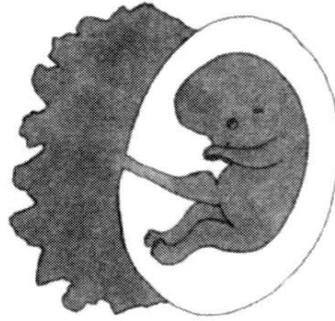
- Epiblasto dà origine alla cavità amniotica (e la superficie dorsale dell'embrione).

- Le linee cellulari analizzate dall'amniocentesi sono strettamente correlate con l'embrione.

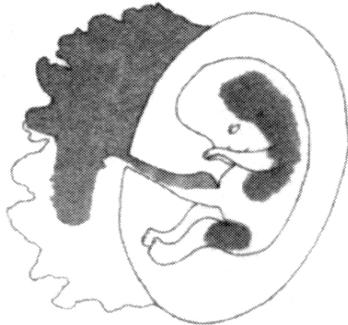
- Le linee cellulari analizzate dalla villocentesi sono più distanti: trofoblasto (diretto) e mesenchima (coltivato)



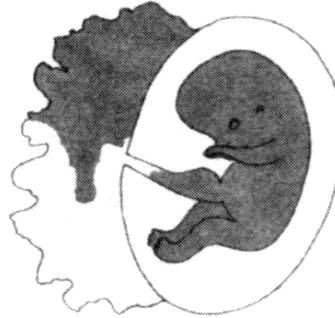
Complete fetal-placental concordance



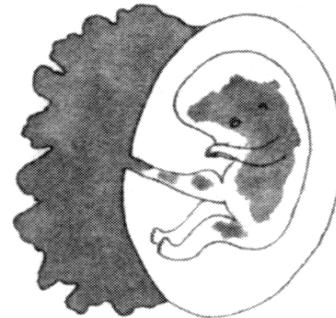
Confined placental mosaicism



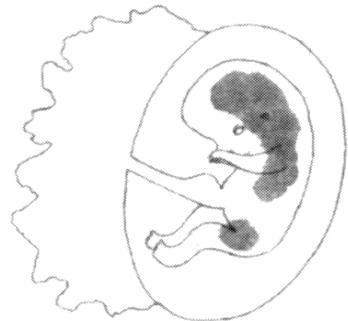
Fetal-placental mosaicism



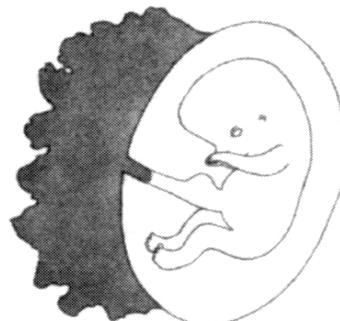
Non-mosaic fetus, mosaic placenta



Fetal mosaicism, non-mosaic placenta



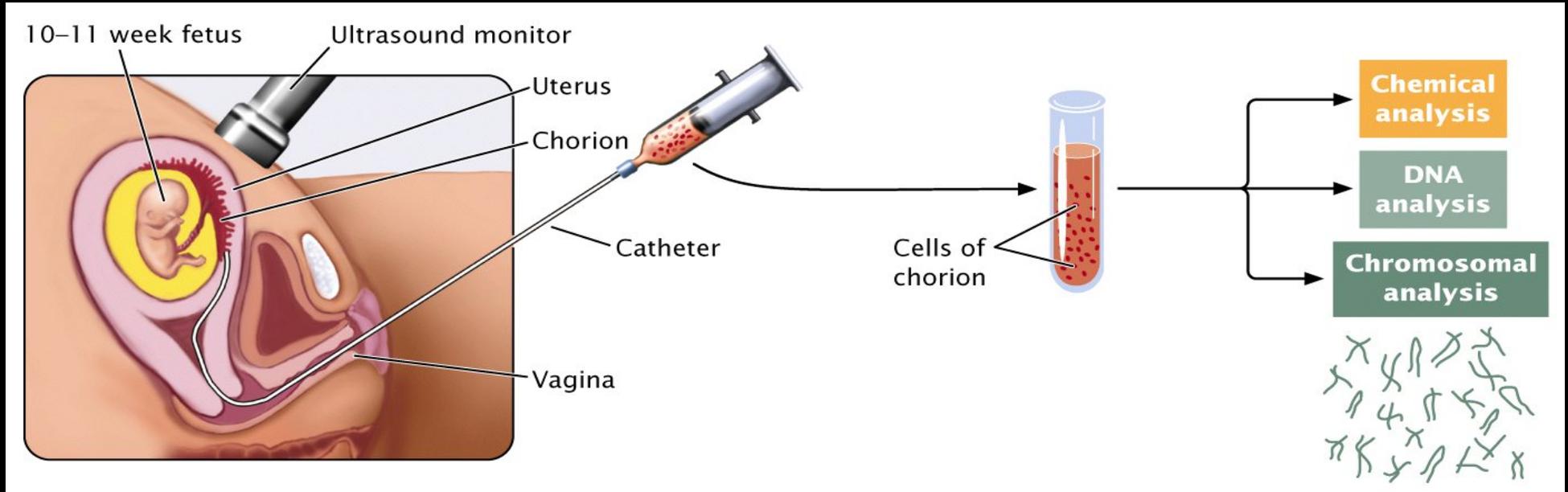
Fetal mosaicism, normal placenta



Complete fetal-placental discordance

# DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

## VILLOCENTESI



**PRELIEVO DEL TROFOBLASTO (VILLI CORIALI) TRA LA 8° E LA 12° SETTIMANA**

**RISCHIO 2-3%**

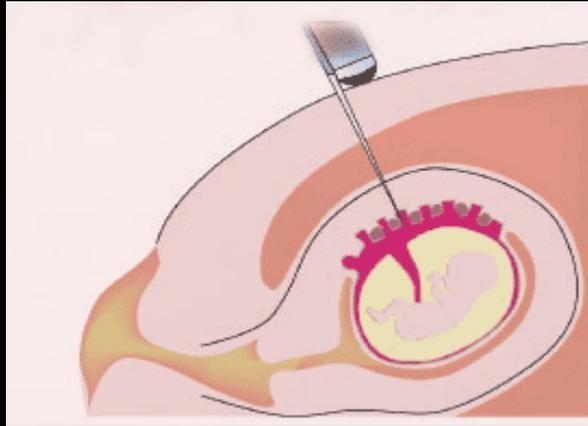
**ANALISI CROMOSOMICA DIRETTA (le cellule del citotrofoblasto si dividono spontaneamente)**

**DIAGNOSI PRECOCE MA RISCHIO ELEVATO DI ABORTO**

**1% DI RISCHIO DI FALSI POSITIVI**

# DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

## VILLOCENTESI



**analisi  
diretta**

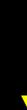
**(citotrofoblasto)**



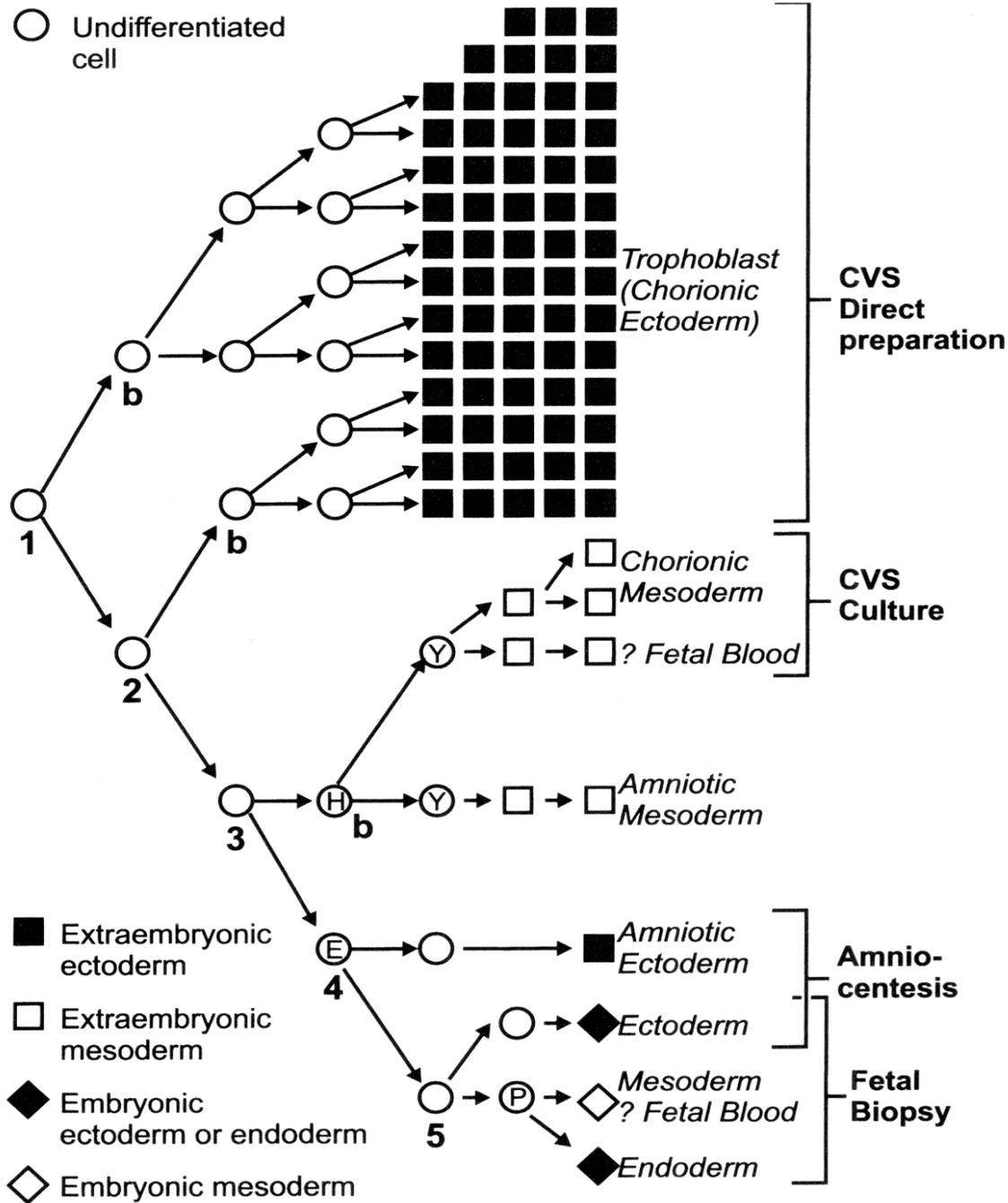
**Difficoltà di bandeggio**

**Analisi  
indiretta**

**(cellule mesenchimali)**



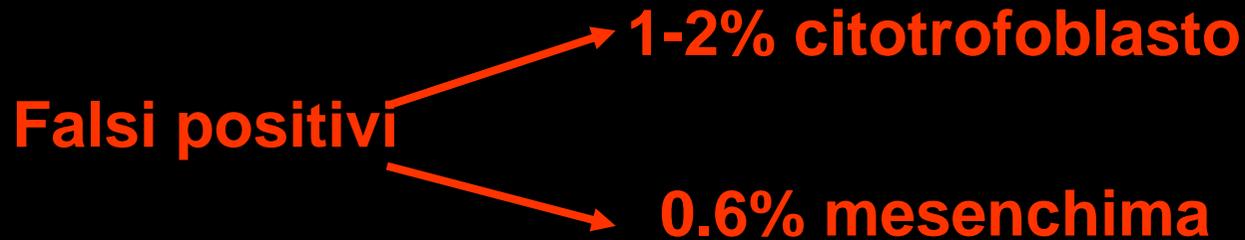
**Bandeggio migliore**



Lo zigote produce una cellula precursore (1b) (trofoblasto) e una cellula staminale totipotente (2). La cellula staminale 3 dà origine alla inner cell mass che si divide in ipoblasto (H) ed epiblasto (E).

# DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

## VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'



# DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

## VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'

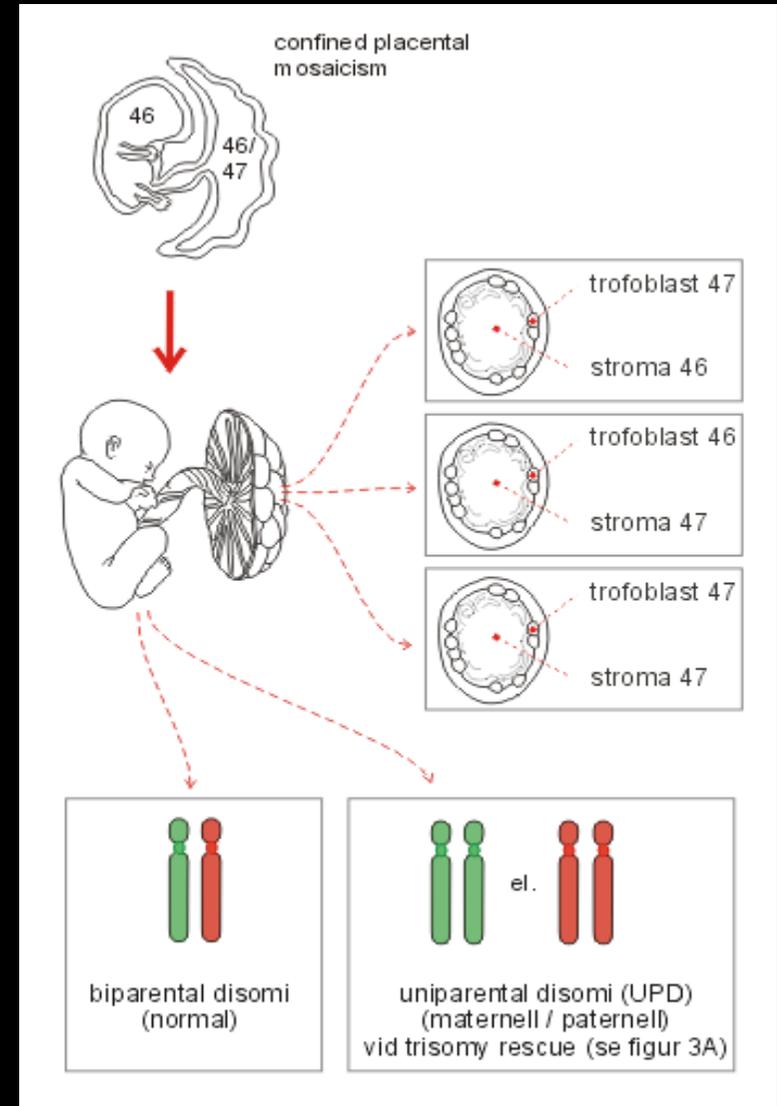
### Mosaicismo confinato alla placenta

1-2 % dei casi

Tipo I: cellule anormali solo nel diretto

Tipo II: cellule anormali solo nel coltivato

Tipo III: cellule anormali nelle due linee



# VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'

- ∞ La maggior parte delle aberrazioni cromosomiche riscontrate nelle villocentesi sono da riferirsi a pseudomosaicismi. Con tale termine si intende la presenza di un cromosoma extranumerario presente solo nei villi ma del tutto assente nel feto. Questi, ovviamente, non hanno significato clinico.

# VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'

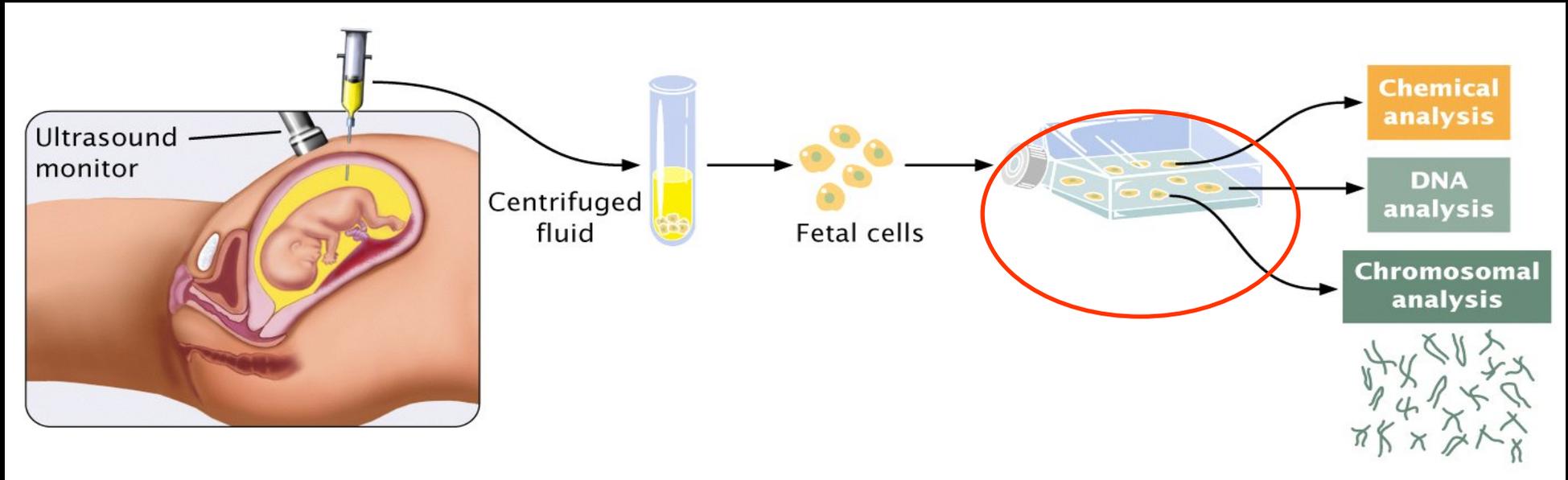
- ⌚ Per stabilire che si tratta di tale artefatto, il genetista esperto si basa essenzialmente su due considerazioni. La prima è che la cellula aberrante è solitamente unica quando ci si trova a leggere un allestimento diretto e, in coltura, l'alterazione interessa pertanto un unico clone di crescita. In tal modo nelle cellule coltivate l'aberrazione appartiene sempre a zone isolate di una stessa flasca. La seconda considerazione è che, solitamente, ci si trova di fronte a mosaicismi che non sono compatibili con la vita e che, pertanto, sono da considerare assolutamente come errori di coltura. Ad esempio sono molto frequenti i riscontri occasionali di patrimoni aberranti aneuploidi come il tetraploide. Il problema però può sorgere di fronte ad una anomalia possibile come la trisomia.

# VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'

Ω A conferma del caratteristico confinarsi dell'anomalia ai soli villi sta il fatto che tutti i mosaicismi presenti nella letture dirette, non ritrovavano quasi mai riscontro sui neonati; mentre circa il 40% viene confermato quando il mosaicismo è osservato nelle colture.

# DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

## AMNIOCENTESI



**ASPIRAZIONE DEL LIQUIDO AMNIOTICO INTORNO ALLA 15°-16° SETTIMANA  
(circa 20-30mL sui 200-250 totali)**

**Il rischio di non riuscire a prelevare il liquido è minore del 1%**

**Il rischio di aborto è non superiore a 0.2-0.3 % (Milunsky, 2004)**

**ANALISI DEL CARIOTIPO DOPO COLTURA DI 14 GIORNI**

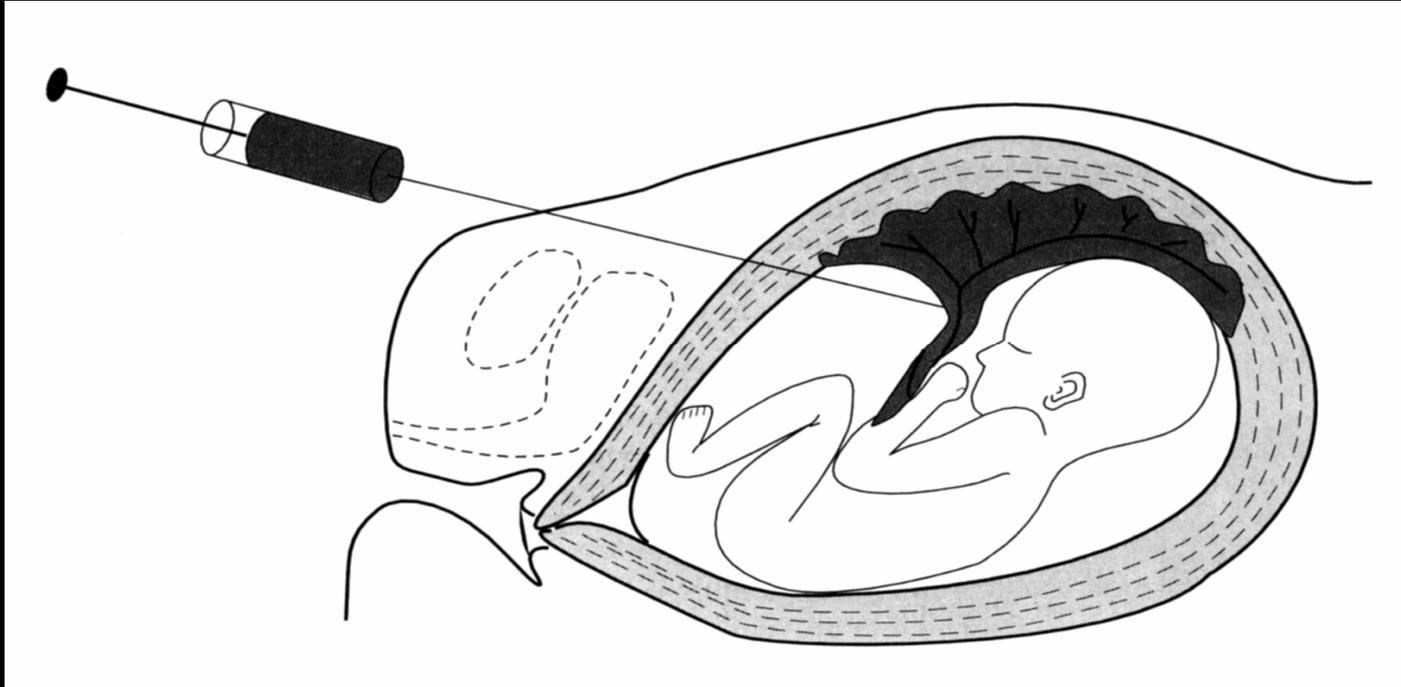
# Risultati ambigui all'amniocentesi



- ∞ Usualmente vengono allestite 2-3 colture
- ∞ 1 cellula anormale in 1 cultura = artefatto
  - Mosaicismo di livello 1 o pseudomosaicismo
- ∞ 2 o più cellule anormali in 1 cultura = potrebbe essere un artefatto o reale;
  - Mosaicismo di livello 2, 20% di possibilità che sia reale mosaicismo
- ∞ 2 o più cellule anormali in due o più colture = mosaicismo vero
  - Mosaicismo di livello 3
  - Riptere amniocentesi o cordocentesi

# DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

## CORDOCENTESI



**ASPIRAZIONE DI SANGUE FETALE INTORNO ALLA 18° SETTIMANA**

**RISCHIO 2.0%**

**DIAGNOSI RAPIDA PER VERIFICARE RISULTATO AMBIGUO DELL'AMNIOCENTESI**

# Problemi nella diagnosi prenatale

⊙ 1. *Possibilità che le cellule in coltura non crescano in maniera adeguata e non sia possibile effettuare la diagnosi sul campione prelevato.*

Presso i centri più qualificati questo problema si verifica eccezionalmente, in media in meno dell'1% dei campioni.

# Problemi nella diagnosi prenatale

2. Possibilità che l'analisi fornisca un risultato ambiguo.

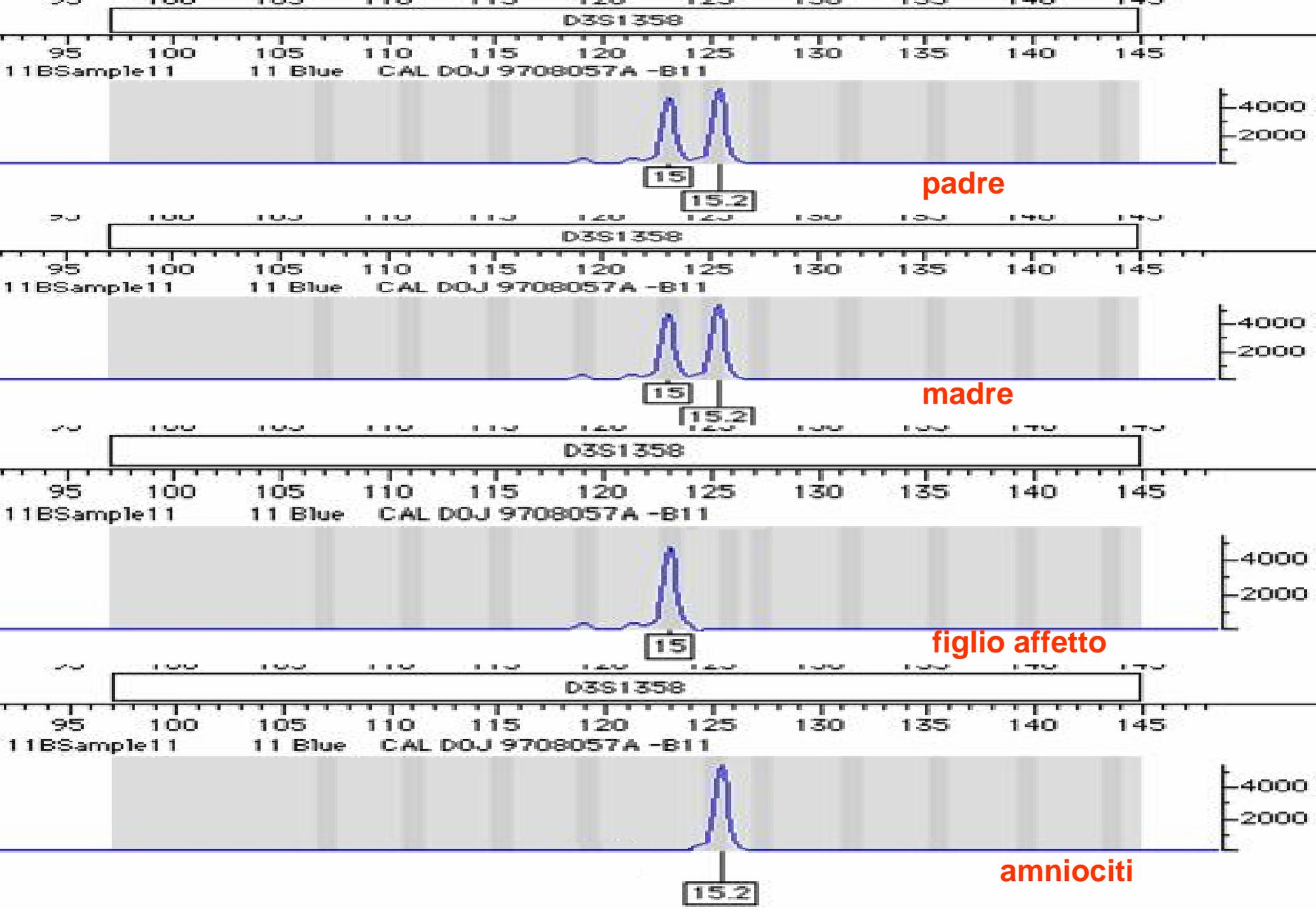
Questo può dipendere da una contaminazione materna, che dà quindi origine alla presenza di due linee cellulari, potenzialmente non differenziabili se il feto è di sesso femminile, mentre di solito sono facilmente evidenziabili se il feto è di sesso maschile.

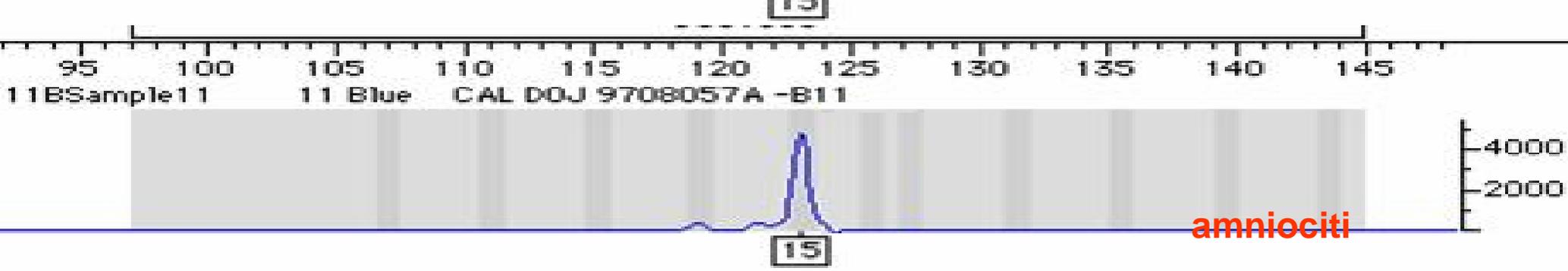
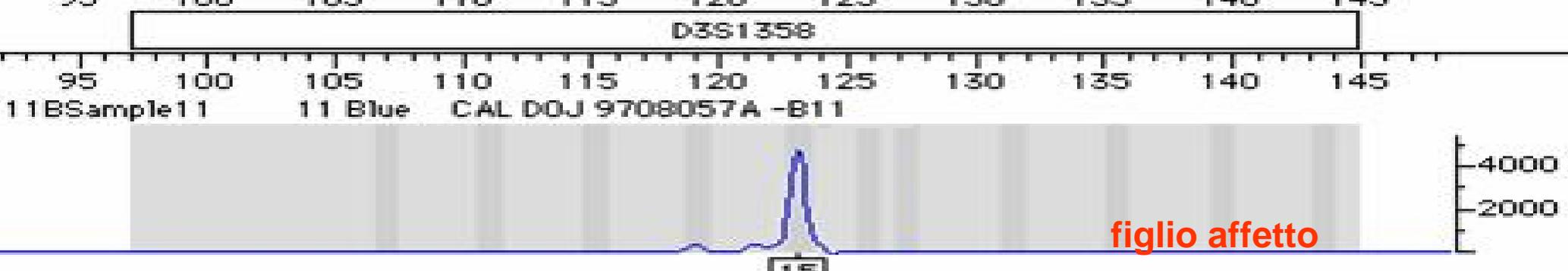
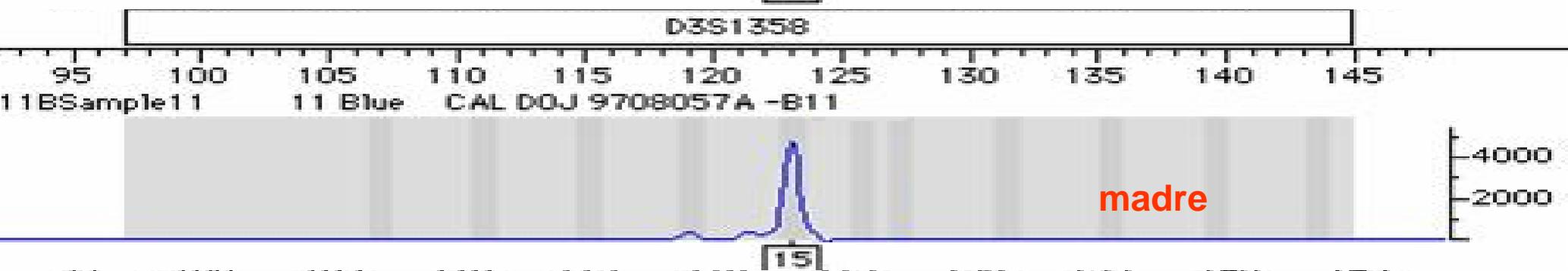
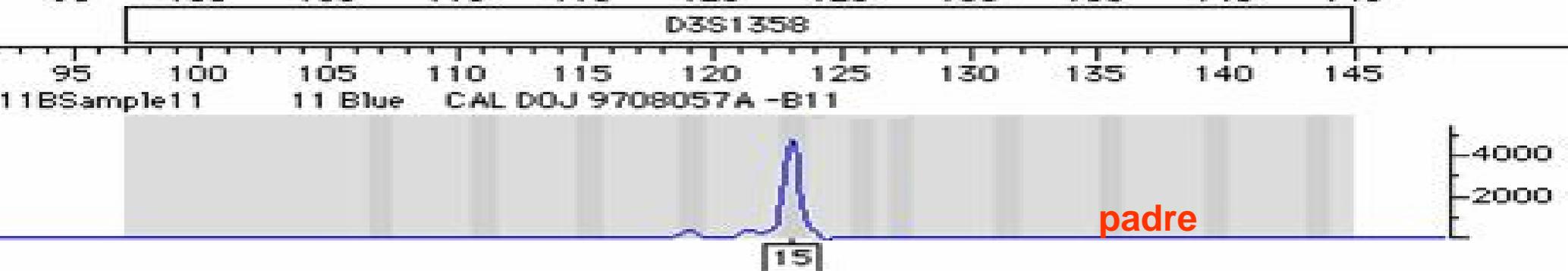
In altri casi può essere presente una seconda linea cellulare originata da una mutazione in vitro. È indispensabile riuscire a differenziare i campioni che contengono artefatti della coltura (pseudomosaicismo) dai mosaicismi veri, in quanto le implicazioni per il feto sono completamente diverse (rispettivamente sano e ammalato).

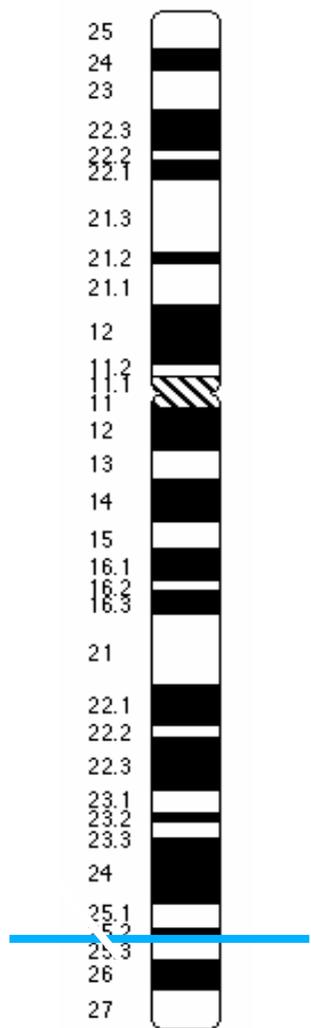
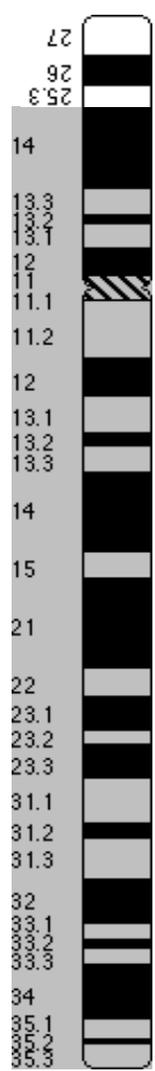
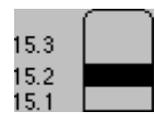
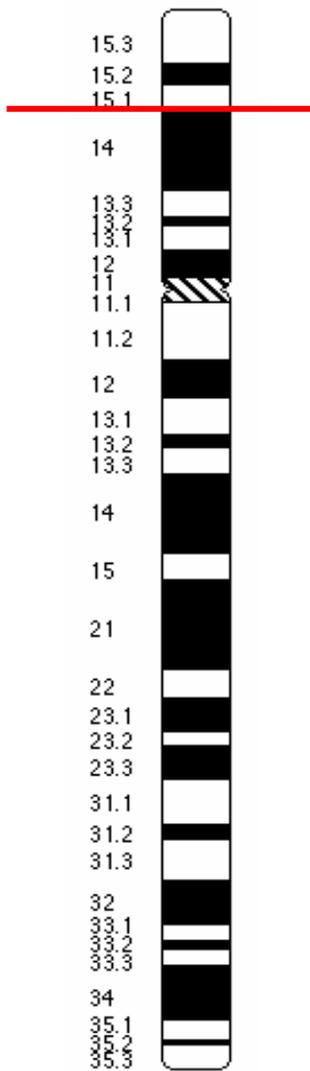
# Problemi nella diagnosi prenatale

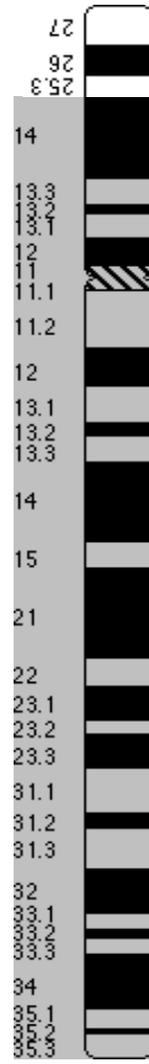
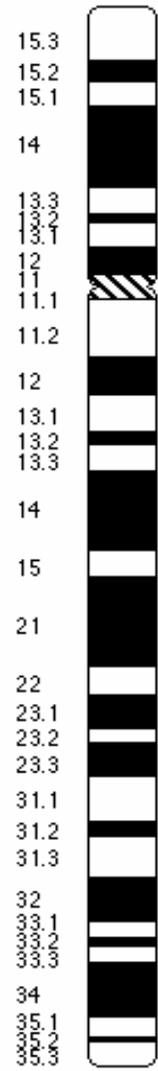
## Ω 3. *Diagnosi certa ma implicazioni fenotipiche incerte*

Questo costituisce attualmente un importante limite della diagnosi citogenetica fetale. In pratica, a fronte di un risultato diagnostico accurato a livello di laboratorio, non è possibile in certi casi predire con altrettanta accuratezza il fenotipo fetale. In queste situazioni viene attribuito un rischio empirico di patologia, che non è ulteriormente precisabile.











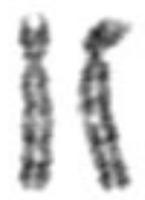
1



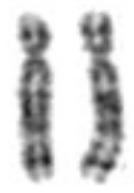
2



3



4



5



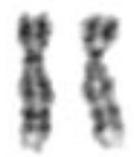
6



7



8



9



10



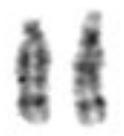
11



12



13



14



15



16



17



18

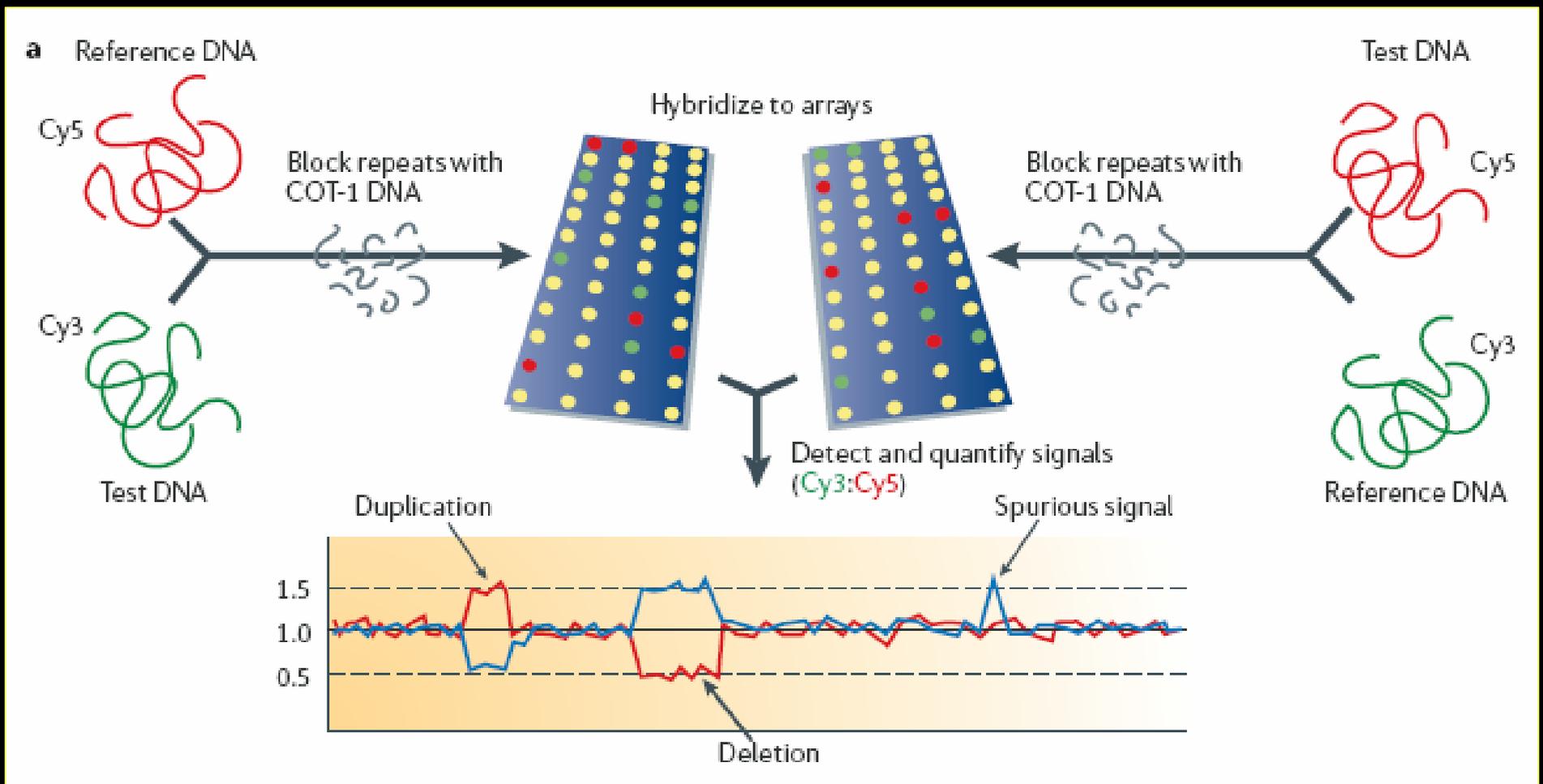


**Copy Number Variants (CNVs)**  
**Submicroscopiche (1 Kb fino a 3 Mb)**

**Alterazioni genomiche che coinvolgono segmenti  
di DNA più grandi di 1Kb**

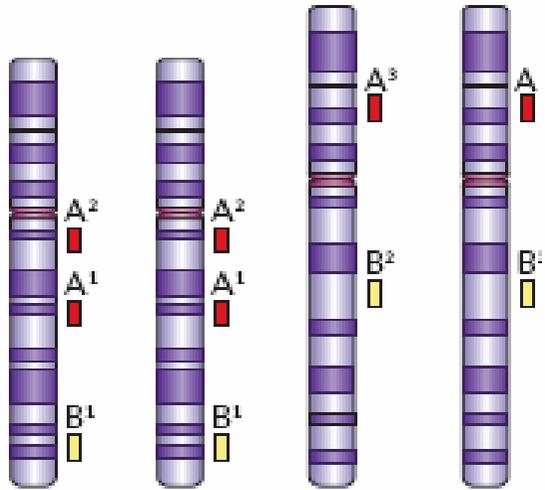
**NESSUN RIFERIMENTO ALLA FREQUENZA**

- **CNV (copy number variants):** segmento di DNA che è presente in un numero variabile di copie rispetto ad una sequenza di riferimento (inserzioni, duplicazioni, delezioni)
- **CNP (copy number polymorphism):** con frequenza superiore all'1%
- **low copy repeat (duplicazione segmentale):** segmento di DNA presente in due o più copie per genoma aploide

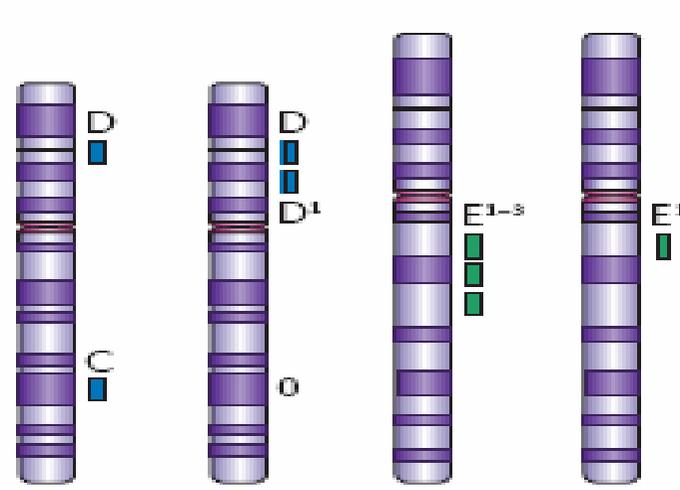


CGH-Array → identificazione della variazione del numero di copie. Dna target e Dna controllo sono marcati con differenti sonde e ibridizzati all'array genomico( fig a); successivamente viene rilevata la fluorescenza che rileva la differenza nel numero di copie tra i due campioni di DNA.

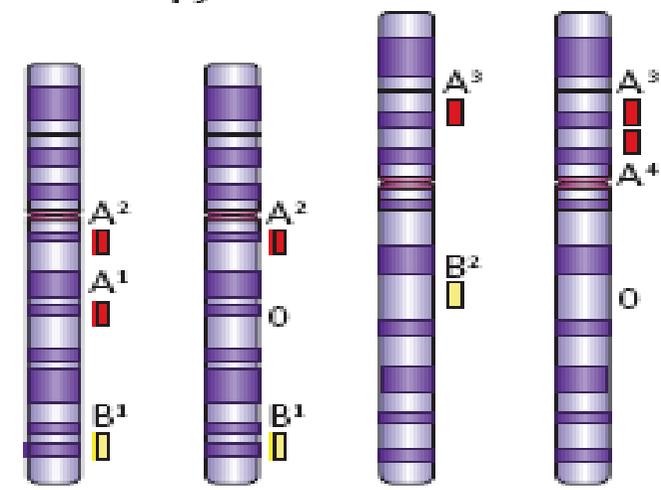
**a Segmental duplications (low-copy repeats)**



**b Copy-number variants**



**c Segmental duplications can be copy-number variants**



a) Duplicazione segmentale in tandem o trasposta in una nuova localizzazione cromosomica → problemi nell'appaiamento delle regioni omologhe.

b) Variazione nel numero di copie

c) La duplicazione segmentale può comportare una variazione nel numero di copie

e



f



Nella figura e la FISH rileva una duplicazione nei nuclei interfaseici;

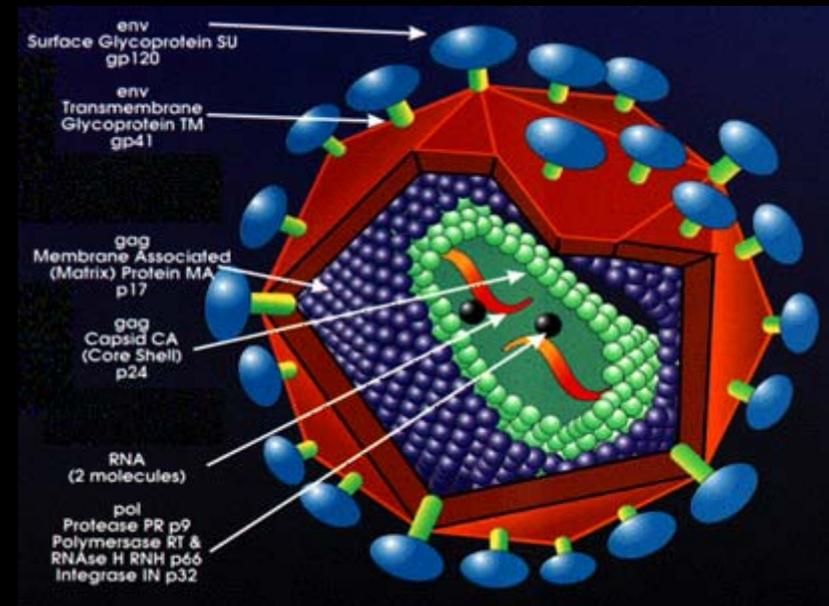
nella figura f la fiber FISH permette di evidenziare attraverso sonde marcate diversamente l'estremità 5' e 3' dei geni (gene amilasi).

La parte superiore della figura f mostra un cromosoma con 10 copie del gene esteso per 300 kb; la parte inferiore mostra un cromosoma con 12 copie del gene esteso 425 kb.

# The Influence of *CCL3L1* Gene— Containing Segmental Duplications on HIV-1/AIDS Susceptibility

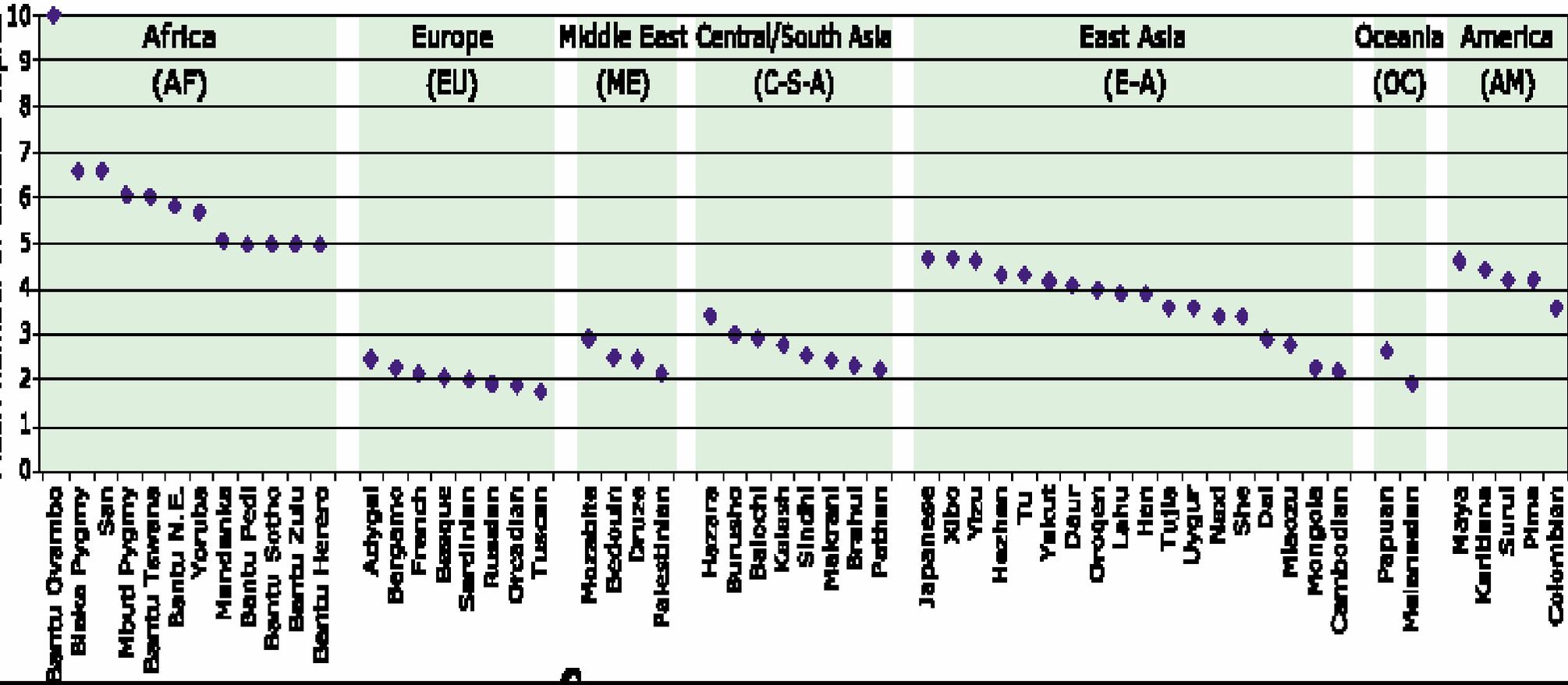
Enrique Gonzalez,<sup>1\*</sup> Hemant Kulkarni,<sup>1\*</sup> Hector Bolivar,<sup>1\*†</sup>  
Andrea Mangano,<sup>2\*</sup> Racquel Sanchez,<sup>1‡</sup> Gabriel Catano,<sup>1‡</sup>  
Robert J. Nibbs,<sup>3‡</sup> Barry I. Freedman,<sup>4‡</sup> Marlon P. Quinones,<sup>1‡</sup>  
Michael J. Bamshad,<sup>5</sup> Krishna K. Murthy,<sup>6</sup> Brad H. Rovin,<sup>7</sup>  
William Bradley,<sup>8,9</sup> Robert A. Clark,<sup>1</sup> Stephanie A. Anderson,<sup>8,9</sup>  
Robert J. O'Connell,<sup>9,10</sup> Brian K. Agan,<sup>9,10</sup>  
Seema S. Ahuja,<sup>1</sup> Rosa Bologna,<sup>11</sup> Luisa Sen,<sup>2</sup>  
Matthew J. Dolan,<sup>9,10,12§</sup> Sunil K. Ahuja<sup>1§</sup>

4 MARCH 2005 VOL 307 SCIENCE



**CCL3L1 è il più potente conosciuto ligando per il  
recettore delle chemochine di tipo CC, il maggiore co-  
recettore del virus HIV**

**A**  
Mean number of *CC13L1* copies





# CYP2D6

- **Enzima minoritario nel fegato**
- **Metabolizza ~30% dei farmaci**
- **Codificato da gene polimorfico  
(=che esiste in diverse varianti)**

# Farmaci metabolizzati da CYP2D6

Debrisoquina  
Amfetamina  
Dexfenfluramina  
Ondansetron

## Antiarritmici

Encainide  
Flecainide  
Lidocaina

## Antipsicotici

Perfenazina  
Tioridazina  
Aloperidolo  
Risperidone  
Minaprina

## Beta-bloccanti

Propafenone  
Metoprololo  
Propranololo  
Timololo  
Alprenololo  
Bufuralolo  
Carvedilolo

## Antidepressivi

Fluoxetina  
Fluvoxamina  
Paroxetina  
Amitriptilina  
Desipramina  
Clorimipramina  
Imipramina  
→ Nortriptilina  
Venlafaxina

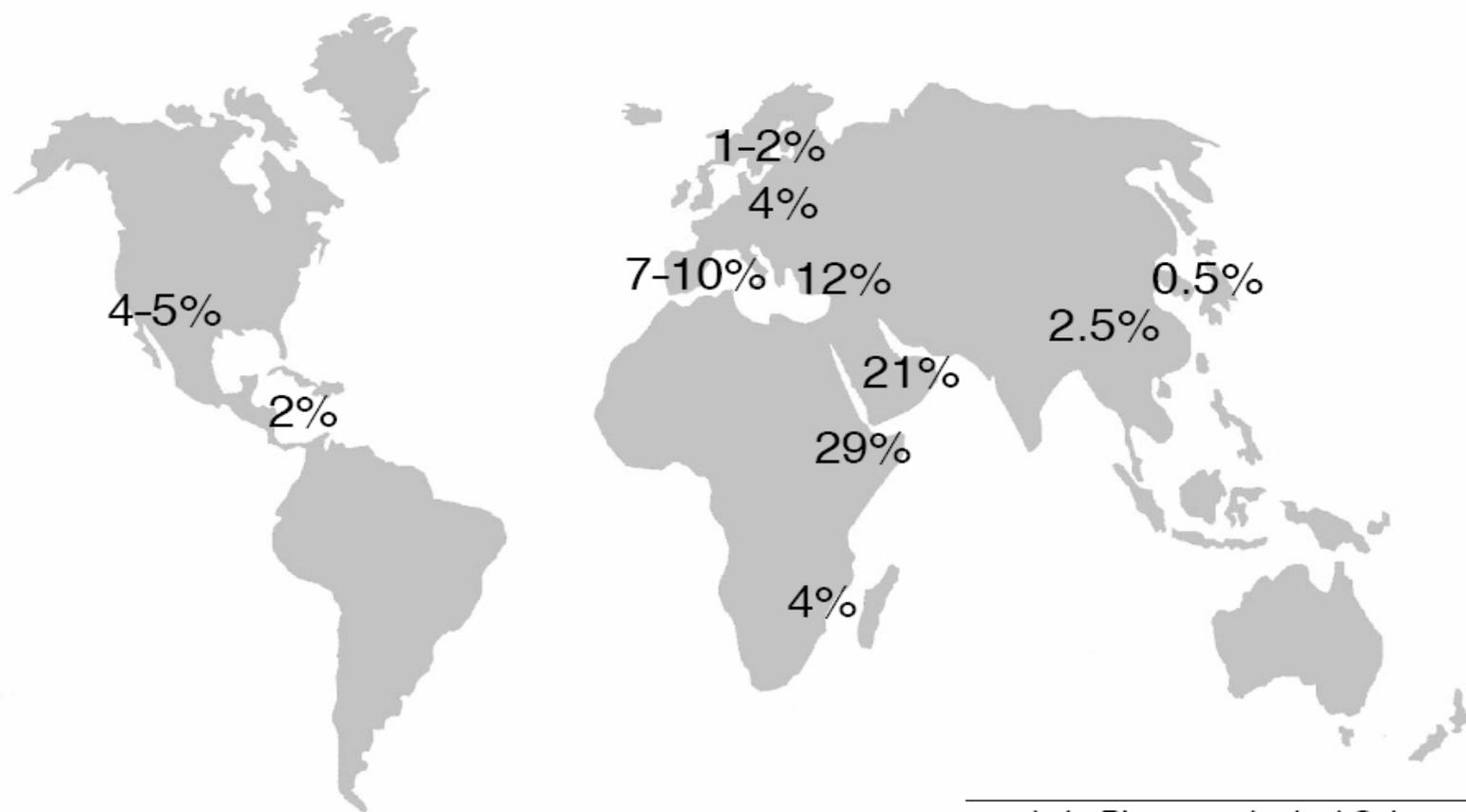
## Analgesici

Destrometorfano  
Codeina  
Tramadolo



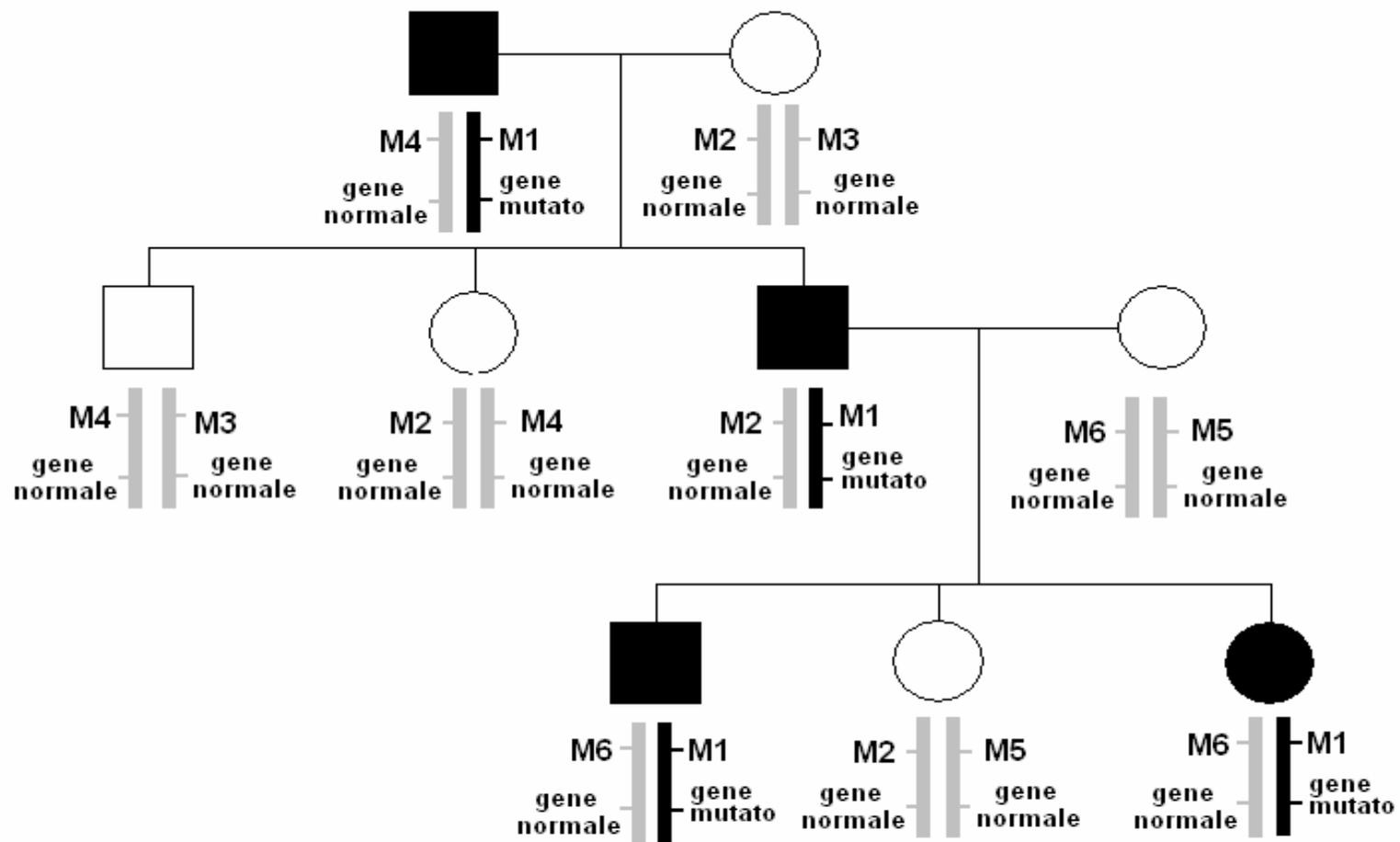
# ***Super- metabolizzatori"***

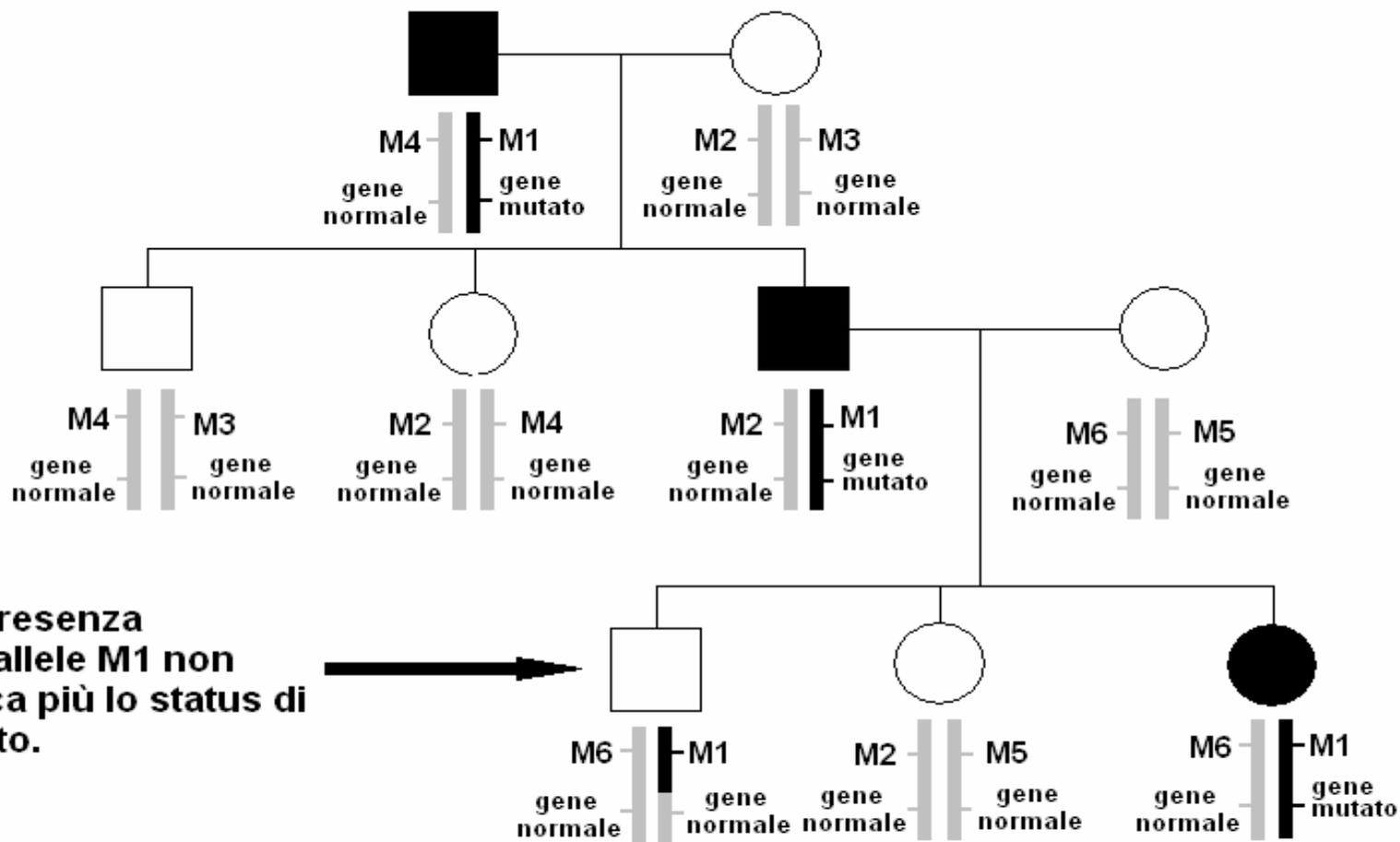
- ⌚ In alcuni individui i farmaci sono inattivi perchè distrutti da un metabolismo ultrarapido
- ⌚ Questi individui sono detti "super-metabolizzatori"



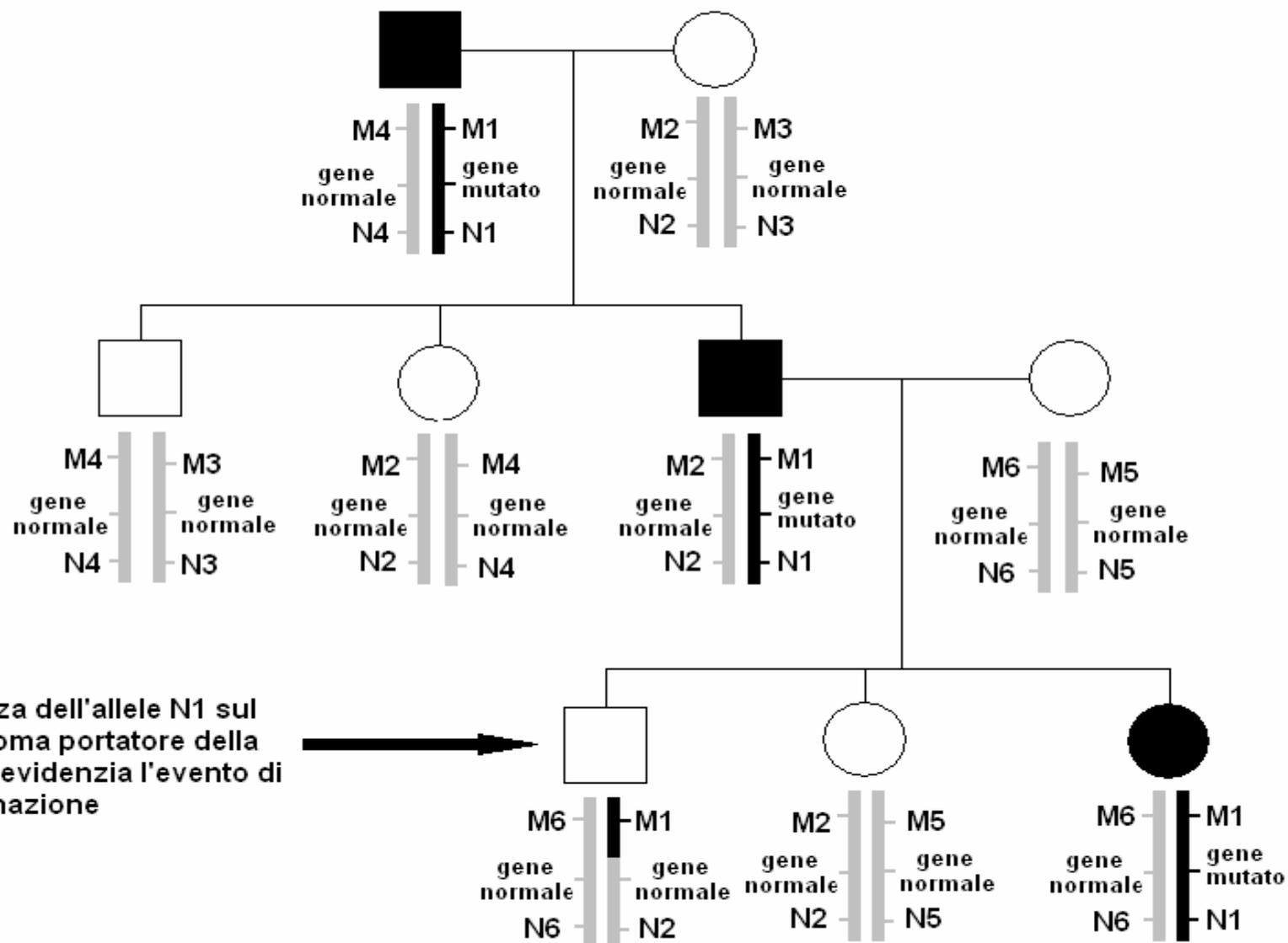
trends in Pharmacological Sciences

**Fig. 2.** Frequency of individuals carrying alleles with multiple *CYP2D6* gene copies in different parts of the world. A particularly high frequency can be observed in the Ethiopian and Saudi Arabian populations. The Muslim migration around 700 AD probably explains the high prevalence in the Mediterranean area. Data from Refs 13, 74, 76, 78 and 79 and references therein.





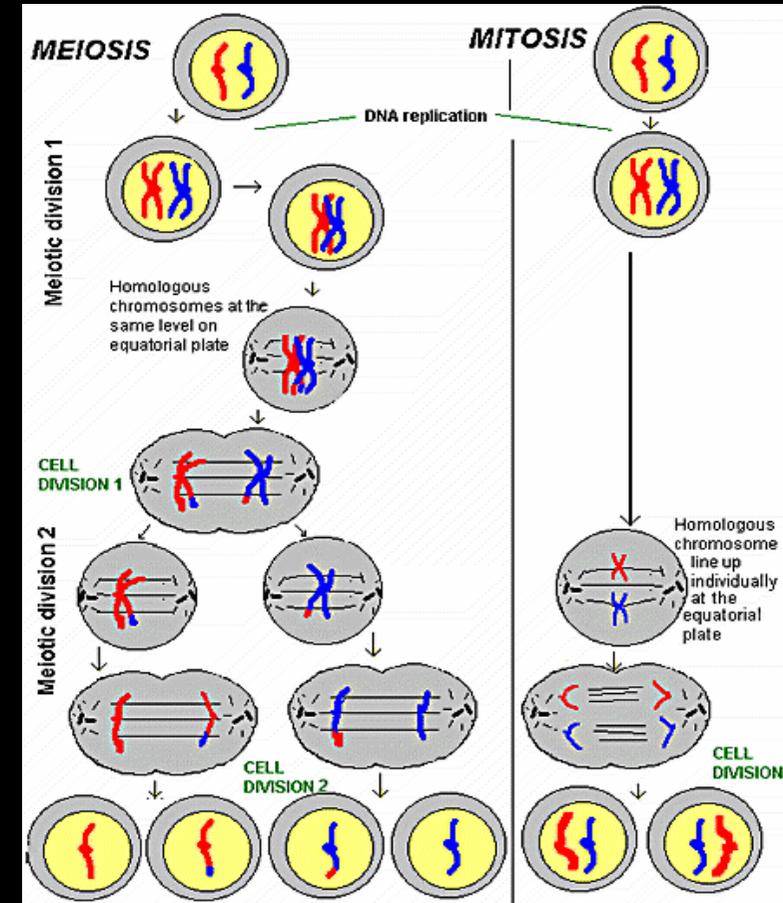
**La presenza dell'allele M1 non indica più lo status di affetto.**



# La frequenza delle anomalie cromosomiche è:

∞ **Direttamente correlata con l'età materna**

∞ **Inversamente correlata con l'epoca gestazionale**



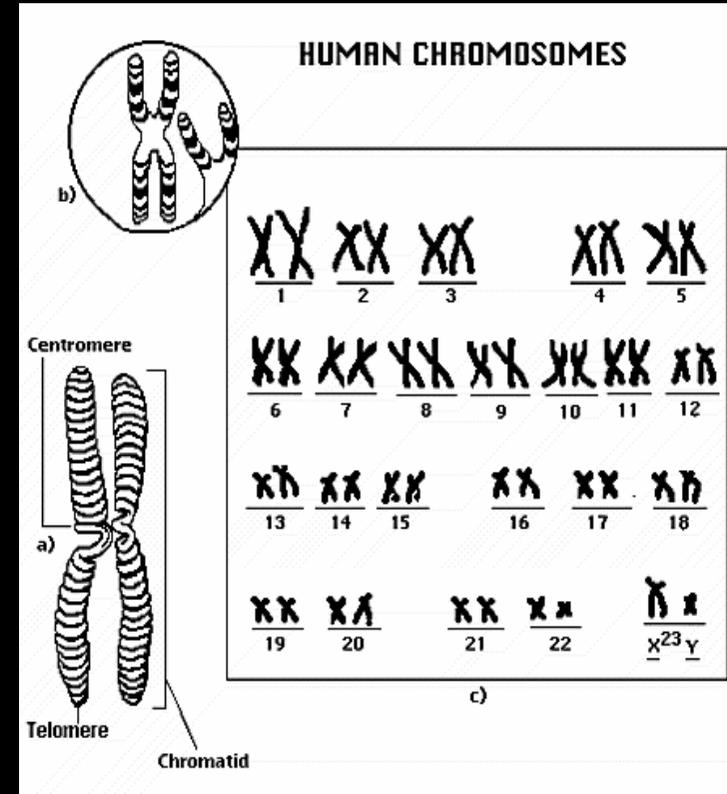
# FREQUENZA DELLE ANOMALIE CROMOSOMICHE NEGLI ABORTI SPONTANEI

su 8841 aborti spontanei del primo trimestre 3613 (40.87%) presentano anomalie cromosomiche

Ω trisomie autosomi	52%
Ω 45,X	19%
Ω poliploidie (triploidie 16%)	22%
Ω riarrangiamenti strutturali	7%

# Frequenza delle anomalie cromosomiche in diagnosi prenatale

<u>Età</u> <u>materna</u>	<u>L. A.</u>	<u>CVS</u>
35a	0.76 %	0.78 %
40a	2.50 %	3.40 %
45a	8.33 %	7.14 %



# **Frequenza delle anomalie cromosomiche nelle cellule germinali**

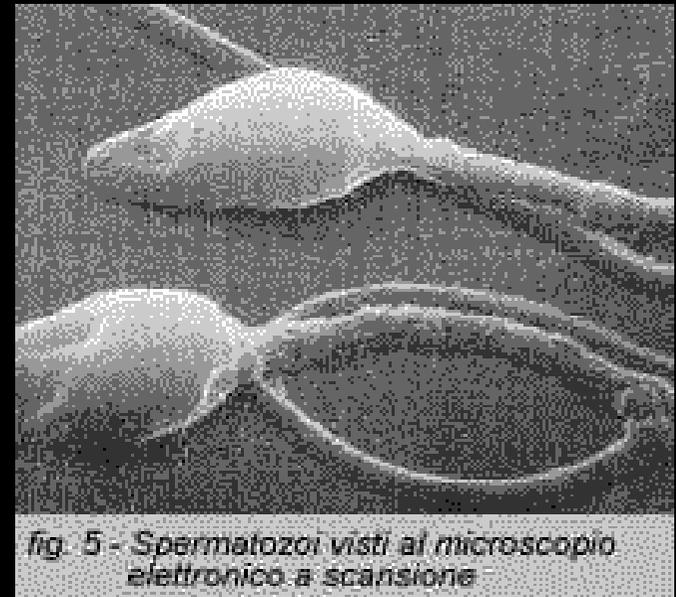
- ∞ Le anomalie cromosomiche sono normalmente presenti in una percentuale di gameti maturi.**
- ∞ Queste anomalie originano per nuova mutazione nella gametogenesi di soggetti a corredo cromosomico normale.**

# Anomalie cromosomiche negli spermatozoi

Circa il 10% degli spermatozoi di maschi fertili presenta anomalie cromosomiche:

∩ **45%** anomalie numeriche

∩ **55%** anomalie strutturali  
(prevalentemente rotture)



# Anomalie cromosomiche negli ovociti

Circa il 25 % degli ovociti presenta anomalie cromosomiche  
(prevalentemente aneuploidie)

