RIMeL / IJLaM 2005; 1 (Suppl.)

La refertazione in diagnostica molecolare: dalla significatività all'applicazione in medicina predittiva

Martinotti S.[a], D'Amario C.[b], Vitullo G.[a], Ursi S.[a], Rulli A.[a]

[a]*Unità di Patologia Clinica, Ospedale "SS Annunziata", Università di Chieti - ASL Chieti Ortona, Chieti*
[b]*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, ASL di Teramo*

Premessa

La Medicina si è sempre posta il problema di alleviare il *pathos*, cioè la sofferenza che è segno di malattia, per poter scientificamente studiare la causa di morbilità ed il rimedio che ne annulli la vera ragione di essere. Quasi mai la Medicina si è posta il problema di organizzare la conoscenza per stabilire un protocollo di prevenzione delle patologie e quasi mai la persona sana ha volutamente e consapevolmente intrapreso una strada di prevenzione.

La diagnostica molecolare, nata con l'implementazione sempre più innovativa delle biotecnologie del DNA, ha permesso in questi ultimi anni lo sviluppo scientificamente più corretto della Medicina Predittiva, intesa come quella branca clinica laboratoristica finalizzata alla previsione e al calcolo del rischio di malattia. Il rischio si inquadra nell'ambito di una determinazione genetica e pertanto, alla luce delle ampie variabilità polimorfiche che il nostro organismo offre, la genetica e l'analisi di lesione del DNA germ-line è un motivo di studio e di calcolo per la predittività di patologia.

Un numero sempre maggiore di patologie umane si associa alla determinazione genetica. I geni e la loro espressione condizionano il fenotipo cellulare e nell'insieme influenzano l'omeostasi cellulare e la funzionalità degli organismi viventi.

Questa dissertazione ha il compito di tracciare le linee di intervento della medicina predittiva soprattutto verso quelle patologie, quali il cancro e le sindromi degenerative, che più direttamente attentano alla salute dell'uomo. Sarà nostro compito illustrare e proporre l'intervento diagnostico molecolare, definire i protocolli e cimentarsi con le aspettative di quanti in assenza di malattia paventano un rischio maggiore di sperimentare lo stato di pathos e di inquietudine.

La Genetica, Il Cancro e la Mutabilità del DNA

Un tempo si pensava che l'etiopatogenesi dei tumori fosse in qualche misura legata all'infezione virale. Fino a 40 anni fa ne erano convinti la maggior parte degli scienziati che influenzavano una grande fetta dell'opinione pubblica e dirottavano ingenti finanziamenti pubblici e privati verso la virologia molecolare. L'idea nasceva essenzialmente dall'osservazione sperimentale nell'oncologia animale. E' noto infatti che la maggior parte degli animali o degli organismi inferiori contrae il cancro allorquando un vettore esogeno, in genere un virus oncogeno, attacca le cellule inducendo proliferazione incontrollata, attraverso un meccanismo noto come "induced downstream promotion". Da qui l'idea del virus e dell'oncogene che promuove il cancro e devasta l'organismo.

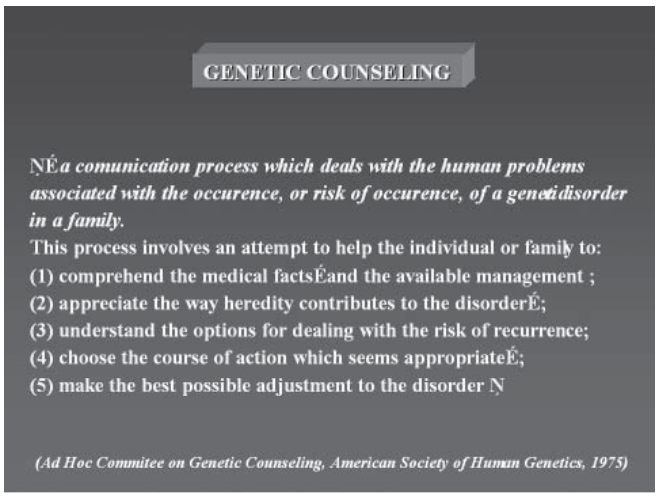
In realtà a partire dagli anni '80, grazie agli straordinari contributi della biologia molecolare si arrivò alla dimostrazione che nessun tumore umano, con rarissime eccezioni, si manifesta a causa di un infezione virale. La patogenesi dei tumori umani è infatti particolarmente complessa, avulsa da cross veicolazioni di vettori esogeni, ma più propriamente connessa alla variabilità genetica e alla capacità mutazionale del DNA. Ormai è assodato che il Cancro nell'uomo è una malattia genetica ed è il risultato di una selezione accurata di accidenti molecolari e di mutazioni nell'ambito di geni chiave che determinano il fenotipo tumorale e alterano la normale omeostasi delle cellule all'interno degli organi differenziati.

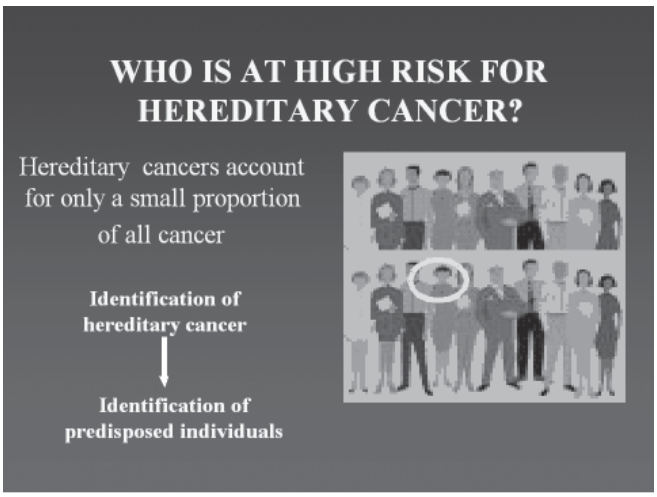
L'ereditarietà del fenotipo cancro

Il Tumore è quindi sempre genetico, cioè determinato da modulazioni della variabilità del DNA che determinano l'alterazione dei meccanismi di controllo della trascrizione genica. Ma se il Cancro è a base genetica, a volte può essere addirittura ereditario.

Ma come può allora un cancro ereditario essere diverso da un cancro sporadico se in effetti le caratteristiche di invasività e di istopatologia sono sempre le stesse? E' diverso nel meccanismo induttivo e nella capacità di alterare uno o più alleli di uno stesso gene. E' ormai noto che nella patogenesi di un tumore sporadico almeno due mutazioni acquisite sul DNA da fenomeni ambientali possono su determinati geni importanti innescare il meccanismo della proliferazione cellulare. Ma per il cancro ereditario basta una sola mutazione acquisita in quanto su un determinato gene viene ereditata dalle cellule germinale la mutazione mono-allelica e quindi la maggiore vulnerabilità del tratto

Corrispondenza a: Prof. Stefano Martinotti, Unità di Patologia Clinica, Ospedale "SS Annunziata", Università di Chieti
ASL Chieti Ortona, Via dei Vestini n. 31, 66013 Chieti. Tel. 0871-358428, fax 0871-358568, e-mail: smartinotti@unich.it





genetico verso l'alterazione. Se tutto questo può essere misurato su una persona sana o meglio ancora su una persona molto giovane, addirittura a livello perinatale o prenatale, nasce la capacità di predire la patologia non ancora in essere, ma ad alta probabilità di manifestarsi.
E le mutazioni sul gene di interesse che determinano il fenotipo tumorale possono quindi essere inquadrate come segue:
Mutazioni germline:
- sono mutazioni presenti nelle cellule germinali (Spermatozoi o Cellula uovo), e saranno presenti in ogni singola cellula del futuro organismo;
- possono essere ereditate secondo le caratteristiche mendeliane;
- sono responsabili delle sindromi oncologiche a ereditarietà familiare;
- riguardano il 5-10% dei tumori sull'intera popolazione.

Mutazioni somatiche:
- si manifestano su cellule differenziate non germline;
- non sono ereditabili;
- sono responsabili dei tumori sporadici;
- riguardano il 90-95% dei tumori sull'intera popolazione.

Tuttavia è fondamentale che nell'ambito della genetica oncologia venga sottolineato il concetto cardine che è alla base della Medicina Predittiva dei Tumori:
"Ciò che si eredita nella lesione germline di un gene responsabile del tumore non è la malattia, ma la predisposizione."
Se non si verificano ulteriori mutazioni genetiche nella cellula somatica non si svilupperà mai il cancro. Pertanto il problema è l'analisi della vulnerabilità, cioè della nostra suscettibilità a fare la patologia, a incorrere nella trasformazione neoplastica, a sviluppare il fenotipo tumorale fino a sperimentarne le più devastanti conseguenze.

Imparare a inquadrare le sindromi oncologiche

Forse tutti i tumori hanno una qualche componente di ereditabilità della predisposizione. Ma di certo al momento solo alcuni tumori sono associabili a sindromi mendeliane e tra questi molti sono particolarmente frequenti e quindi necessitano di un particolare approfondimento genetico.
Riassumiano il quadro generale (Tabella 1).
Tutte queste sindromi ereditarie non differiscono dal punto di vista istopatologico dai loro corrispettivi tumori sporadici, ma come è noto si associato a livello germline a una mutazione monoallelica in uno dei geni corrispondenti elencati. E' sufficiente una lesione nonoallelica nei rispettivi tratti per dare il fenotipo di predisposizione.
Pertanto il loro carattere mendeliano (ai fini della maggiore predisposizione di malattia) è DOMINANTE (Tabella 2).
Queste sindromi genetiche si manifestano solo se le lesioni germline sono presenti in maniera biallelica. Le conseguenze

Tabella 1

Sindromi	*Gene associato*
Cancro della mammella e dell'ovaio	BRCA1, BRCA2
Cancro ereditario non poliposico (HNPCC)	MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2
Poliposi adenomatosa familiare	APC
Sindrome di Li Fraumeni	P53
Retinoblastoma familiare	RB1

Tabella 2

Sindromi	*Gene associato*
Atassia Telangiectasia	ATM
Anemia di Fanconi	FACC, FACA
Sindrome di Bloom	BLM
Xeroderma pigmentoso	XPB, XPD, XPA

della patologia genetica manifesta sono molto legate alla sintomatologia clinica; tuttavia in tutti i pazienti si manifesta anche una spiccata predisposizione a sviluppare determinate neoplasie. In questo senso per il loro carattere mendeliano (e di predisposizione alla patologia tumorale) queste sindromi sono considerate RECESSIVE.
E' sorprendente come in tutti i casi di sindromi oncogenetiche un solo gene mutato a livello germline sia responsabile del carattere patologico. Si tratta di geni che controllano punti chiave dell'omeostasi cellulare in particolare per la maggior parte delle sindromi considerate i geni mutati codificano per proteine inattive che nelle loro forme wild type modulano i livelli di differenziamento cellulare o attenuano la spinta proliferativi delle cellule. In questo senso rappresentano geni oncosoppressori la cui funzione è importante nel frenare i meccanismi molecolari di spinta alla trasformazione neoplastica. Nella tabella che segue è riassunta la funzione del gene e la loro associazione alle varie forme di ereditarietà tumorale (Tabella 3).

La Medicina Predittiva e il Consultorio Genetico

Con l'espansione della tecnologia bio-molecolare ogni gene anche se complesso può essere analizzato e ogni lesione molecolare sulla doppia elica, dalle point mutations alle micro e macrodelezioni può essere facilmente visualizzata sui geni responsabili. La refertazione di un dato molecolare così particolare innesca una serie di problematiche, etiche, tecniche e gestionale del dato stesso in funzione del protocollo terapeutico di medicina preventiva che si dovrà o potrà applicare nei vari casi.
E' fondamentale che in una situazione di calcolo del rischio di malattia il paziente o i pazienti siano ben consapevoli del significato diagnostico clinico e dell'uso del dato molecolare che si dovrà fare per prevenire la patologia tumorale.
Ovviamente lo strumento principe per la gestione della refertazione ad uso e consumo del paziente a rischio si articola nella costituzione di un consultorio genetico-oncologico i cui aspetti operativi e gestionali verranno analiticamente discussi e illustrati.

Che cosa è un consultorio genetico-oncologico

Nei testi e nelle linee guida per la costituzione del consultorio genetico si legge che "il Consultorio genetico è un processo di comunicazione che tratta di problematiche umane connesse con l'occorrenza o il rischio di occorrenza di un disordine genetico in un ambito familiare". Il Consultorio Genetico-oncologico è pertanto un processo di comunicazione per conoscere la probabilità di incorrere nel cancro all'interno di un kindred familiare. Questo processo:
- comprende il meccanismo dell'esamina dei fatti o problematiche mediche e la possibilità di individuarne il correttivo o l'intervento d'azione
- apprezza il modo o l'ordine clinico attraverso il quale il meccanismo ereditario contribuisce al disordine
- interpreta il meccanismo di intesa per la determinazione del rischio di incorrere nella patologia
- sceglie le vie più accurate e strategicamente più valide per contrastare il rischio di malattia
- pone le basi per una prevenzione efficace e per aggiustare il rischio del disordine.

In base alle moderne linee guida sull'uso corretto della genetica del cancro possiamo affermare quindi che è a rischio soltanto una piccola percentuale di tutte le possibili neoplasie diagnosticabile nell'universo umano e che lo scopo del consultorio rimane quello dell'identificazione del cancro familiare ai fini dell'identificazione del predisposto individuo.
Come può essere impostata una corretta validazione del processo conoscitivo nel processo di trasmissione dell'informazione medico-predittiva al paziente? L'essenza del dialogo costruttivo tra medico e paziente è alla base del processo. Questo dialogo costruttivo è tuttavia sempre un processo bidirezionale di reciproco apprendimento e di sperimentazione della comunicazione. Il Medico istruisce il paziente ma nello stesso tempo ne ricava dalla percezione del dialogo stesso la propria educazione alla corretta consulenza specialistica e alla comprensione psicologica del paziente intervistato.
Il goal è l'aiuto all'individuo nel capire la propria condizione genetica e nell'impostare corrette decisioni e valutazio-

Tabella 3

Tumor suppressor genes:
- attenuano la crescita cellulare;
- il cancro nasce per inattivazione biallelica del gene;
- sono responsabili per la maggior parte delle sindromi ereditarie.

Tumor suppressor gene	*Funzione*	*Sindrome*
APC	controlla la connessione cellulare	FAP
VHL	controlla omeostasi cellulare	Von Hippel Lindau
WT1	controlla differenziamento cellulare	Tumore di Wilms
RB1	controlla le chinasi nel ciclo cellulare	Retinoblastoma
NF1	controlla differenziamento	Neurofibromatosi
P53	controlla apoptosi	Li Fraumeni
Men1	controlla differenziamento	Neoplasia endocrina
BRCA1	controlla riparazione del DNA	Tumore mammella
BRCA2	controlla riparazione del DNA	Tumore ovaio
PTCH	controlla adesione cellulare	carcinoma nevoide

ne di comportamento. Tutta questa premessa pone le basi per una valutazione serena dello stato genetico e del calcolo di rischio di malattia.
Il Consultorio genetico si base pertanto su punti chiave di impostazione generale che è poi la refertazione stessa dello stato di analisi predittiva per la determinata patologia. Questi punti possono essere così riassunti e commentati poi sulla base di osservazioni specifiche:

- *Contracting*: ovvero la necessità dell'impostazione di uno stato di comunicazione bidirezionale.
- *Baseline of risk perception*: come può il paziente sentire e calcolare su una scala analogica la percezione del rischio a cui andrà incontro.
- *Pedigree construction and documentation*: costruire insieme al paziente lo stato genetico del proprio kindred familiare, constatando la frequenza di patologia tra i vari membri.
- *Medical and exposure history*: come la storia familiare della patologia possa illuminare il paziente su un proprio stato di predisposizione. La sensazione va colta all'interno del processo bidirezionale comunicativo.
- *Empiric/genetic risk assessment*: la genetica che sottolinea per il paziente il senso di rischio di incorrere nella patologia.
- *Explanation of basic genetics and inheritance*: ovvero l'esatta educazione del paziente nei confronti delle basi genetiche delle malattie.
- *Options for early detection and prevention*: le opportunità di utilizzare la genetica molecolare per una identificazione precoce del rischio di malattia. La possibilità di utilizzare prontamente un protocollo di prevenzione.
- *Discuss risk, limitations and benefits for genetic testing*: discutere con il paziente sull'uso corretto della Medicina Molecolare ai fini conoscitivi del rischio di malattia, commentare insieme i rischi psicologici, i limiti, ma anche i vantaggi.
- *Response to questions, support, and plans for follow up*: ovvero discutere dell'atto ultimo della Medicina Preventiva, cioè il corretto uso di protocolli clinici per la prevenzione e la possibilità di utilizzare protocolli chirurgici di asportazione preventiva di organi sani a rischio di patologia.

Conclusioni

Le note conclusive a corollario di questa dissertazione non possono che porre l'accento sull'uso improprio della genetica oncologica in senso predittivo verso patologie tumorali la cui natura o eziopatogenesi determinerebbe un difficile management da parte del Medico. Molti tumori anche se ereditari non sono facilmente ricollegabili a un unico atto genetico, né tantomeno uno o piccoli cluster genici possono essere facilmente ricollegabili all'insorgenza della malattia. Su questi tumori vanno posti immediatamente i limiti dell'investigazione molecolare quale atto predittivo e educativo del comportamento clinico del paziente. Va infatti sottolineato che solo partendo da una forte base conoscitiva del meccanismo patogenetico della patologia tumorale noi possiamo poi applicare protocolli di indagine molecolare e di refertazione approprito per il corretto uso clinico. Infine le remore bioetiche devono sempre tener conto della ridondanza conoscitiva per la determinazione del processo diagnostico che viene offerto come base per un processo clinico di prevenzione per il paziente.
Concludendo alla base della Medicina Predittiva sta il corretto uso diagnostico molecolare per una valutazione genetica oggettiva e mai dubitativa; il dubbio non farebbe che alimentare il disordine, e il disordine sistematico, nonché oggettivo renderebbe vano il disciplinato uso delle nostre line guida per la prevenzione.