INFORMATIVA SUL TEST DELL'ESOMA E DEI PANNELLI GENICI

Introduzione

Il sequenziamento dell'esoma è una modalità di "test genetico". L'analisi dell'esoma è basata sul sequenziamento massivo parallelo, il quale prevede una fase di amplificazione del DNA di partenza, il suo sequenziamento con l'introduzione di elementi marcati con fluorocromi differenti per essere rilevati e un sistema bioinformatico per l'analisi delle variazioni del DNA riscontrate e la relativa interpretazione.

Nella seguente informativa vengono spiegati in dettaglio i seguenti punti relativi a tale metodica:

1) DNA, cromosomi e i geni
2) Quando viene eseguito il sequenziamento dell'esoma e quali geni vengono analizzati
3) Quali sono i possibili risultati derivanti dal sequenziamento dell'esoma
4) L'impatto del progresso delle conoscenze scientifiche sull'interpretazione dei risultati del sequenziamento dell'esoma
5) Che cosa è necessario per eseguire il sequenziamento dell'esoma
6) Utilizzo dei risultati del sequenziamento dell'esoma a scopo di ricerca
7) Eventuali tecniche complementari possibilmente suggerite dal genetista clinico
8) Contatti per maggiori informazioni

1) DNA, cromosomi e i geni

Il DNA, ovvero il nostro materiale genetico, si trova impacchettato all'interno di ogni nostra cellula, organizzato in strutture che prendono il nome di cromosomi. Le cellule del corpo normalmente contengono ***46 cromosomi***, raggruppati in 23 coppie. Ognuna di queste coppie è ereditata per metà dalla madre e per metà dal padre. Le prime 22 coppie di cromosomi sono analoghe nell'uomo e nella donna. La 23ma coppia è denominata coppia dei cromosomi sessuali che sono rappresentati da due cromosomi X nella donna e da un cromosoma X ed un cromosoma Y nell'uomo.
Il DNA è caratterizzato da regioni che prendono il nome di ***geni***, i quali fungono da stampo per la produzione finale di tutte le componenti che determinano le nostre caratteristiche e lo sviluppo di tutti i nostri organi, come il cervello, il cuore, i reni. Ogni gene ha una specifica funzione, sebbene al momento attuale non sia nota la funzione di tutti i geni. Solitamente, forme alternative che un gene può assumere a livello del medesimo sito del DNA sono denominate ***alleli.*** Ognuno di noi, di norma, presenta due alleli, o copie, per ogni gene: uno di derivazione materna e uno di derivazione paterna. Le analisi genetiche includono tutti quei test volti a indagare eventuali variazioni a livello del nostro DNA. La maggior parte delle variazioni del DNA sono variazioni che garantiscono la variabilità tra individui, mentre altre possono essere responsabili di un vero e proprio quadro patologico. Una malattia genetica può insorgere se uno o più dei nostri geni non funziona correttamente. Può essere importante identificare un'alterazione genetica, alla base di una determinata patologia, sia per chiarire i ***rischi di ricorrenza nella famiglia*** sia per ***aumentare le conoscenze relative alle patologie genetiche***. Un'alterazione genetica può avvenire per la prima volta in una persona (essere cioè di "nuova insorgenza", nuova variante), oppure può essere ereditata da uno o da entrambi i genitori.
Quando si parla di variazioni a livello del DNA, si parla di variazione in ***eterozigosi***, se la variazione è presente in uno solo dei due alleli, mentre si parla di variazione in ***omozigosi,*** quando una variazione è presente in entrambi gli alleli.

Al fine di identificare variazioni eventualmente presenti nel DNA esistono diverse tecniche. Tra queste il sequenziamento massivo parallelo è la tecnica più innovativa per sequenziare il DNA. Questa tecnica, meglio conosciuta come ***Next Generation Sequencing (NGS)***, permette di analizzare contemporaneamente le regioni codificanti di uno o più geni e le relative regioni fiancheggianti, al fine di verificare l'eventuale presenza di variazioni del DNA potenzialmente associate ad un ruolo patogenetico. Grazie a nuove tecniche di analisi è possibile effettuare la sequenza di tutti i circa 20.000 geni noti in un singolo esperimento ("sequenziamento dell'esoma"). Tutto ciò si traduce in una notevole diminuzione dei tempi di diagnosi delle malattie genetiche.

2) Quando viene eseguito il sequenziamento dell'esoma e quali geni vengono analizzati

Nella Sua famiglia è presente una patologia verosimilmente di origine genetica, per cui le tecniche d'indagine comunemente utilizzate non hanno permesso di identificare una specifica anomalia genetica causativa. Lo scopo di questo studio è l'identificazione della causa molecolare della patologia di cui soffre Lei e/o uno o più dei Suoi familiari, attraverso l'utilizzo delle nuove tecnologie di analisi del DNA ("sequenziamento dell'esoma").
In prima battuta vengono analizzati solo i geni noti per essere associati a specifiche condizioni genetiche che presentano manifestazioni cliniche simili a quelle presenti nella sua famiglia. Successivamente, nel caso in cui non venga individuata alcuna alterazione, saranno testati tutti i rimanenti geni. Non è pertanto possibile definire a priori se e quando l'analisi permetterà di

individuare il difetto genetico specifico responsabile della condizione. Tali implicazioni verranno ampiamente discusse con lei ed eventuali suoi familiari al fine di una scelta consapevole prima di procedere con l'analisi.

3) Quali sono i possibili risultati derivanti dal sequenziamento dell'esoma

Il sequenziamento dell'intero "esoma" produce un'enorme quantità di dati, che possono presentare problemi di interpretazione e di gestione. In generale, è utile confermare sempre la mutazione identificata tramite metodica NGS tramite sequenziamento Sanger e stabilirne la segregazione nella famiglia, quando sia disponibile. In particolare, l'analisi potrà avere tre esiti possibili:

- Vengono identificate una o più alterazioni genetiche, interpretate come ***possibili cause della patologia*** presente nella Sua famiglia. I Genetisti Clinici che seguono il suo caso saranno disponibili per discutere approfonditamente con Lei e i Suoi familiari le implicazioni del risultato.
- Vengono identificate una o più alterazioni genetiche, ma il loro ***ruolo in relazione alla problematica in esame non è chiaramente interpretabile***. In questo caso, potrà essere necessario analizzare altre famiglie con lo stesso problema o effettuare ulteriori approfondimenti per chiarire il ruolo delle alterazioni identificate. Anche in questa eventualità, Lei sarà informato sui risultati ottenuti e sarà aggiornato nel tempo sui progressi relativi all'interpretazione delle indagini effettuate.
- ***Non viene identificata alcuna alterazione genetica che possa spiegare la problematica*** oggetto della presente indagine. I risultati delle indagini potranno essere rielaborati in futuro alla luce di nuove informazioni riguardanti la patologia in esame ed i geni in questa implicati. La invitiamo, pertanto, a ricontattarci nel tempo (a distanza di 2-3 anni) per approfondire la possibilità di rianalizzare il dato genetico.

Parallelamente a questi tre possibili esiti, rimane una certa ***probabilità di un "risultato inatteso"***, cioè che vengano casualmente identificate delle alterazioni genetiche che non hanno alcuna relazione con la patologia in esame, ma che potrebbero avere rilevanza per la salute Sua o di altri membri della Sua famiglia. Un esempio possono essere le alterazioni genetiche di predisposizione alle patologie oncologiche o neurologiche ad insorgenza in età avanzata, ma anche lo stato di portatore "sano" di patologie genetiche, che non determinerebbe problemi per la Sua salute, ma potrebbe essere rilevante in relazione a rischi riproduttivi (trasmissione di patologie alla prole). Al momento della compilazione del consenso informato, Le sarà richiesto pertanto di decidere se vorrà essere informato o meno su eventuali risultati inattesi. In particolare, potrà scegliere se desidera o non desidera ricevere comunicazione di alterazioni genetiche:

- ***potenzialmente rilevanti per decisioni di tipo riproduttivo***, in quanto potrebbero determinare un rischio aumentato di patologia genetica nella prole;

- ***predisponenti a patologie ad insorgenza nell'adulto***, per le quali la ***conoscenza del rischio può rappresentare un beneficio*** concreto in termini di terapia e/o prevenzione (ad es. per predisposizione ereditaria a tumori o aritmie cardiache);

- ***predisponenti a patologie ad insorgenza nell'adulto***, per le quali però ***la conoscenza del rischio non rappresenterebbe ad oggi un beneficio concreto*** in termini di terapia e/o prevenzione (ad es. patologie neurodegenerative ereditarie).

Non le verranno invece comunicate tutte quelle varianti clinicamente non rilevanti in base alle conoscenze attuali, che non rientrano nelle categorie precedenti. Se lo richiederà, l'eventuale riscontro incidentale di alterazioni genetiche potenzialmente rilevanti per la salute Le verrà comunicato nell'ambito di una Consulenza Genetica dove avrà ampia possibilità di porre domande specifiche sulle implicazioni dei risultati ottenuti. Per quanto riguarda l'analisi dell'esoma su minori, i risultati inattesi NON verranno comunicati, fatto salvo per quelle rarissime condizioni la cui conoscenza può portare ad interventi efficaci nel prevenire l'insorgenza/evoluzione di patologie. Si fa presente che tutte le indagini di laboratorio, inclusi gli studi sul DNA, non sono esenti da limiti che sono espressamente riportati nel referto di laboratorio.

Il sequenziamento dell'esoma può essere condotto in tre configurazioni principali: singolo, duo o trio, a seconda delle esigenze cliniche e della disponibilità dei familiari. Nell'approccio singolo, viene analizzato esclusivamente il DNA del paziente. Si tratta della forma più semplice, utile per identificare varianti potenzialmente responsabili del quadro clinico. L'esoma in duo prevede l'analisi del paziente insieme a un'altra persona, in genere uno dei due genitori, per valutare se eventuali varianti genetiche siano state ereditate. In contesti come la fecondazione assistita, il sequenziamento può essere esteso al confronto tra il DNA di un embrione o feto e quello di uno dei partner genetici, con lo scopo di rilevare precocemente eventuali mutazioni o predisposizioni. L'esoma in trio include il sequenziamento del DNA del paziente insieme a quello di entrambi i genitori biologici. Questo consente un confronto completo tra i tre profili genetici, permettendo l'identificazione affidabile di varianti *de novo*, ovvero mutazioni non presenti nei genitori ma insorte spontaneamente nel figlio, spesso nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. L'approccio trio è particolarmente utile sia in ambito postnatale che prenatale, ad esempio in presenza di anomalie ecografiche fetali, per chiarire l'origine genetica di una condizione sospetta.

4) L'impatto del progresso delle conoscenze scientifiche sull'interpretazione dei risultati del sequenziamento dell'esoma

Le conoscenze relative al genoma umano (ovvero il nostro intero patrimonio genetico) ed alla funzione dei geni in relazione alle patologie sta aumentando rapidamente. Dunque, se il sequenziamento dell'esoma non darà un risultato inequivocabile alla prima analisi, le varianti genetiche identificate potranno essere reinterpretate in futuro alla luce di nuove conoscenze ed una o più alterazioni potranno essere definite come causa della problematica in esame in un secondo tempo. Lei stesso è invitato a contattarci a distanza di tempo (2-3 anni), se il primo risultato dell'analisi proposta non sarà definitivo. D'altro canto, il test che Le viene proposto non esplora tutto il patrimonio genetico, ma solo una parte di questo, benché sia la più importante dal punto di vista delle implicazioni per malattie genetiche. È comunque possibile che il quadro clinico presente nella Sua famiglia sia dovuto a mutazioni in parti del genoma che non sono esplorate con l'analisi esomica effettuata oppure che la mutazione non sia adeguatamente coperta dall'analisi eseguita e pertanto non rilevata.

5) Che cosa è necessario per eseguire il sequenziamento dell'esoma

Nel caso in cui decidesse di eseguire il test, dovrà pertanto fornire il Suo consenso informato all'indagine di sequenziamento dell'esoma che Le viene proposta, mantenendo il diritto di revocarlo in qualsiasi momento. Sarà necessaria l'esecuzione di un prelievo ematico (5-10 ml) - e/o di altro tessuto in situazioni particolari - per l'estrazione del DNA. I campioni sono prelevati presso le sedi di prelievo ambulatoriali per il tramite di professionisti debitamente istruiti dal Titolare del trattamento.
Talvolta è possibile che il campione venga processato presso un Laboratorio esterno, ma in questo caso il campione verrà codificato, nessuno potrà risalire al suo nominativo, ma solo i responsabili dello studio potranno associare il risultato alla Sua persona.
Secondo quanto riportato nel testo del Garante della protezione dei dati personali, i campioni biologici prelevati per l'esecuzione di test genetici sono da conservare per un tempo non superiore a quello necessario allo svolgimento dell'analisi e al perseguimento degli scopi per cui sono stati raccolti; da linee guida della Società Italiano di Genetica Umana (SIGU), per i test molecolari compresi quelli effettuati con metodologia NGS è necessario conservare il DNA ed eventuale altro materiale biologico residuo almeno fino a 15 giorni dalla emissione del referto se il quesito diagnostico è stato risolto, per almeno 10 anni se si tratta di un caso non risolto, che può richiedere ulteriori esami di approfondimento. In ambito oncologico, conservare il DNA/materiale biologico processato residuo dei casi non completamente definiti per almeno 10 anni. Pertanto, se Lei acconsente, il DNA non utilizzato verrà conservato presso la struttura Polo GGB per la durata di 10 anni dalla fine del test.

6) Utilizzo dei risultati del sequenziamento dell'esoma a scopo di ricerca

Le informazioni ottenute dal sequenziamento esomico hanno un rilievo scientifico oltre che diagnostico e potranno condurre ad una migliore comprensione delle cause delle malattie genetiche. I risultati dell'analisi effettuata saranno conservati presso la struttura Polo GGB. Tali dati saranno conservati in forma anonima e solo il medico potrà avere accesso al codice identificativo del paziente. I risultati potrebbero inoltre essere condivisi in forma anonima con altri gruppi di ricerca accreditati ed eventualmente pubblicati in forma anonima.

7) Eventuali tecniche complementari possibilmente suggerite dal genetista clinico

Talvolta, sulla base della storia clinica, lo specialista potrebbe aver bisogno anche di test che mettano in evidenza delle alternazioni genetiche in termini di alterazione del numero di copie (CNV) e/o riarrangiamenti differenti dal solo sequenziamento del DNA. Nel dettaglio possono essere richieste analisi di Array-CGH classico, oppure analisi di SNP-array (in singolo oppure in trio).

- **Array-CGH**: anche noto come cariotipo molecolare, l'array-CGH identifica sbilanciamenti cromosomici submicroscopici confrontando il DNA del paziente con un riferimento sano. I due campioni, marcati con fluorocromi di colore diverso, vengono ibridati competitivamente su un chip contenente migliaia di sonde genomiche. Il rapporto tra le intensità di fluorescenza rivela perdite o acquisizioni di materiale genetico, permettendo di individuare microdelezioni e microduplicazioni con una risoluzione molto superiore rispetto alla citogenetica classica. Tuttavia, la tecnica non rileva riarrangiamenti bilanciati come traslocazioni o inversioni, poiché privi di variazioni quantitative, né identifica mosaicismi cellulari inferiori al 30%. L'analisi si limita esclusivamente alle variazioni del numero di copie in regioni associate a sindromi note o geni-malattia, senza fornire informazioni su patologie derivanti da meccanismi indipendenti dalle alterazioni strutturali del DNA.
- **SNP-array:** l'analisi tramite SNP-array (Single Nucleotide Polymorphism array) rappresenta attualmente una delle metodologie più avanzate e scalabili per la genotipizzazione ad alta risoluzione. Questi dispositivi sono costituiti da chip che integrano migliaia di sonde specifiche, progettate per legarsi a polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) distribuiti uniformemente lungo l'intero genoma umano. A differenza delle tecniche citogenetiche tradizionali, la procedura prevede la marcatura e l'ibridazione del solo DNA del paziente sul supporto solido. Le variazioni nel numero di copie geniche (CNV) vengono identificate attraverso un'analisi comparativa dell'intensità di fluorescenza: il segnale emesso da ogni SNP viene confrontato con i valori di riferimento ottenuti da un set di esperimenti standardizzati su campioni di controllo. Tale approccio permette di

rilevare con estrema precisione microdelezioni, microduplicazioni e regioni di perdita di eterozigosi (LOH), fornendo una mappatura dettagliata delle anomalie strutturali del genoma.

8) Contatti per ulteriori informazioni

Per eventuali ulteriori informazioni o chiarimenti è possibile contattare lo specialista di riferimento o la struttura Polo GGB al n. di telefono 0577-381311

Tempi di refertazione: pannelli genici 35/40 giorni lavorativi dal momento in cui il campione arriva al laboratorio. Esoma (1/2/3 soggetti) fino a 50/55 giorni lavorativi